

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

LENYTA OLIVEIRA GOMES

**Participação das endotelinas e seus receptores na neuralgia do
trigêmeo: mecanismos operados em células do gânglio trigeminal**

Florianópolis
2015

LENYTA OLIVEIRA GOMES

Participação das endotelinas e seus receptores na neuralgia do trigêmeo: mecanismos operados em células do gânglio trigeminal

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título 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.

Oliveira Gomes, Lenyta

Participação das endotelinas e seus receptores na neuralgia do trigêmeo: mecanismos operados em células do gânglio trigeminal : Endotelinas e a dor neuropática trigeminal / Lenyta Oliveira Gomes ; orientador, Giles Alexander Rae - Florianópolis, SC, 2015.
85 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Farmacologia da Dor. 3. Neuralgia do Trigêmeo. 4. Dor Orofacial. I. Rae, Giles Alexander. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"Ao meu companheiro de vida, Deison, por ter permanecido incansável ao meu lado durante esta caminhada"

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Giles Rae, pela oportunidade, por todos os ensinamentos que fizeram parte do processo de orientação deste trabalho, os quais, certamente, foram valiosos e indispensáveis. Também agradeço por compartilhar comigo seu conhecimento sobre outras coisas boas da vida como, por exemplo, lugares interessantes para se conhecer ao redor do mundo, bons chocolates para degustar e suas belas fotografias de pássaros.

Ao meu companheiro de vida, Deison Finardi, pelo seu amor, paciência, incentivo, apoio e, principalmente, por me incentivar a acreditar mais no meu potencial. Além disso, eu não poderia deixar de mencionar que a convivência com a sua alma leve, sua alegria, certamente, tornou este período menos difícil e me ajudou a não desistir.

À minha mãe, Eudes, meu maior exemplo de coragem persistência. Obrigada por todo seu apoio e incentivo para com meus estudos durante toda minha vida.

Ao meu pai, Caio, por sempre torcer pelo meu sucesso.

À minha avó Aurora e minha tia Dirce, pelo amor, apoio e incentivo durante toda minha vida.

Às minhas amigas, Nathália e Flaviane, pela amizade de longa data que é essencial na minha vida, pelo apoio, incentivo e por nunca me deixarem desistir dos meus objetivos.

À toda família Finardi (Madalena e Dom; Luana, Piter e Beatriz; Erlon, Sinara, Paola e Lucas; Daniel, Luciene e Amanda), pelo carinho, incentivo e por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Às minhas grandes e amadas amigas Lara, Livia e Mildred pela amizade, carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos de pós-graduação.

Às minhas parceiras de laboratório, Dra. Alessandra, Dra. Stefânea e M.Sc. Samilla, pela amizade, ajuda nos experimentos, apoio e incentivo. Sentirei saudades dos nossos momentos juntos!

À Dra. Ana Paula Luiz por me ter ensinado a técnica cirúrgica de constrição do nervo infraorbital em camundongos e a avaliação da hiperalgesia orofacial ao calor.

À Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro e suas alunas de doutorado, Carina Nones, Caroline Kopruszinski e Renata Reis, por me receberem de forma amável em seu laboratório e por me ensinarem a técnica de injeção intraganglionar no gânglio do trigêmeo.

À Dra. Jade de Oliveira, pela colaboração com os experimentos de imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Antônio Pádua Carobrez, pela doação do D-AP5.

Ao Prof. Dr. Juliano Ferreira e à Profa. Dra. Gabriela Trevisan, pela doação da ³H-RTX e ajuda nos experimentos.

À Profa. Dra. Carla Tasca e seus alunos do Departamento de Bioquímica, pela doação do líquido de cintilação e ajuda na utilização do cintilador.

Ao Pedro, funcionário do Biotério setorial da Farmacologia, pelo seu cuidado com os animais e por sua solicitude.

À Sheila, secretária do Departamento de Farmacologia, por sua solicitude.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia que contribuíram com minha formação ao longo desses anos.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

"A persistência é caminho do êxito"
Charles Chaplin

RESUMO

Este estudo avaliou a habilidade da endotelina-1 (ET-1) em promover hiperalgesia orofacial ao calor em camundongos e a participação dos receptores ET_A e ET_B nesta resposta, através da técnica de injeção intraganglionar (i.g.), via forame infraorbital, no gânglio do trigêmeo (GT). Também foi avaliada a participação dos receptores de endotelinas localizados em células do GT na hiperalgesia orofacial ao calor em camundongos submetidos à constrição do nervo infraorbital (CNIO). A injeção i.g. de ET-1 (1 e 3 pmol) induziu hiperalgesia ao calor por até 4 horas após a administração. Esta resposta foi reduzida pela co-injeção i.g. do peptídeo junto com um antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A (BQ-123; 0,5 nmol) ou ET_B (BQ-788; 0,5 nmol) por até 2 e 3 horas após a injeção, respectivamente. As respostas hiperalgésicas promovidas pela administração i.g. de ET-1 (3 pmol) também foram reduzidas pela co-injeção i.g. do peptídeo com um antagonista seletivo de receptores NMDA para glutamato (D-AP5; 24 nmol) ou de receptores para interleucina-1 β , IL-1ra (300 ng). A CNIO induziu hiperalgesia orofacial ao estímulo de calor entre 2 e 10 dias após a cirurgia. As respostas hiperalgésicas promovidas por CNIO no 5^o dia após a cirurgia foram reduzidas pela injeção i.g. de BQ-123 ou BQ-788 (0,5 nmol, cada) no GT. O pré-tratamento sistêmico por via oral (v.o.) com o antagonista não peptídico dual de receptores ET_A e ET_B para endotelinas, bosentan (100 mg/kg) impediu o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor no 5^o dia após a cirurgia. Da mesma forma, os tratamentos repetidos com bosentan (100 mg/kg; v.o.) nos dias 5, 6 e 7 após CNIO reduziram a hiperalgesia ao calor entre o 6^o e 9^o dia após a cirurgia. A CNIO também induziu o aumento na expressão de GFP por células satélites gliais do GT no 5^o e 10^o dia após a cirurgia, porém, esta alteração não foi modificada pela administração i.g. de BQ-788 (0,5 nmol) no 5^o dia após a cirurgia ou pelos tratamentos repetidos com bosentan (100 mg/kg; v.o.). Estes resultados demonstram que os receptores ET_A e, principalmente, os ET_B presentes em células do GT estão envolvidos nos mecanismos nociceptivos operados por ET-1 no sistema trigeminal e reforçam o fato de que as endotelinas são alvos potencialmente relevantes para o controle da dor neuropática orofacial causada pela neuralgia do trigêmeo.

Palavras-chave: Endotelinas, Neuralgia do Trigêmeo, Gânglio do Trigêmeo.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the ability of endothelin-1 (ET-1) to evoke orofacial heat hyperalgesia when injected into the mouse trigeminal ganglion (TRG) and the roles of ET_A and ET_B receptors in this response. Furthermore, we sought to characterize the role of the endothelin receptor expressed in TRG cells in modulating the thermal hyperalgesia induced by the constriction of the infraorbital nerve (CION) in mice. The intraganglionic (i.g.) injection of ET-1 (1 or 3 pmol) into TRG induced heat hyperalgesic responses up to 4 hours after the administration and these responses were reduced by the i.g. co-injection of the peptide together with the peptidic selective antagonist of endothelin ET_A (BQ-123; 0.5 nmol) or ET_B receptors (BQ-788; 0.5 nmol) up to 2 and 3 hours after the injection, respectively. The hyperalgesic responses induced by the ET-1 (3 pmol) injection were also modulated by the i.g. co-injection with the selective NMDA glutamate receptor antagonist (D-AP5; 24 nmol) or the selective interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra (300 ng). The CION induced orofacial heat hyperalgesic responses from day 2 up to day 10 after surgery. The heat hyperalgesia induced by CION on day 5 after the surgery was reduced by the i.g. injection of BQ-123 or BQ-788 (0.5 nmol each) into the TRG. Oral treatment with the dual non-peptidic endothelin receptor antagonist, bosentan (100 mg/kg) on day 5 after CION surgery inhibited the heat hyperalgesia. Similarly, the repeated oral treatment with bosentan (100 mg/kg) on days 5, 6, and 7 after surgery, reduced the heat hyperalgesic response induced by CION from day 6 up to day 9. CION also increased the GFAP expression on satellite glial cells (SGC) of the TRG on days 5 and 10 after the surgery, indicating the enhanced SGC activation, which was not modified by the i.g. injection of BQ-788 (0.5 nmol) on day 5 after CION or by the repeated systemic treatments with bosentan (100 mg/kg). These findings demonstrate that ET_A and ET_B receptors expressed in TRG cells are related to the nociceptive mechanisms operated by ET-1 in the trigeminal system and confirm previous studies that suggest that the endothelin system represents a therapeutic target for the control of trigeminal neuralgia.

Key words: Endothelins, Trigeminal Neuralgia, Trigeminal Ganglion.

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA_m Ácido ribonucléico mensageiro

CSG Célula Satélite Glial

COX Ciclooxygenase

CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais

CNIO Constrição do nervo infraorbital

ET-1 Endotelina-1

ECE Enzima conversora de endotelina

e.p.m. Erro padrão da média

NGF Fator de crescimento do nervo

TNF α Fator de necrose tumoral – alfa

GRD Gânglio da raiz dorsal

GT Gânglio do trigêmeo

IB₄ Isolectina B₄

I.g. Intraganglionar

IL Interleucina

i.p. Intraperitoneal

NMDA N-metil-D-aspartato

μ g Micrograma

μ l Microlitro

μ m Micrômetro

ng Nanograma

nmol Nanomol

NT Neuralgia do trigêmeo

Sp5 Núcleo do trato espinhal

Sp5O Núcleo do trato espinhal oral

Sp5I Núcleo do trato espinhal interpolar

Sp5C Núcleo do trato espinhal caudal

SNC Sistema nervoso central

TRPV1 Receptor de potencial transitório vanilóide 1

RTX Resiniferatoxina

pmol Picomol

PG Prostaglandina

GFAP Proteína acídica fibrilar glial

NK Receptor de neurocininas

5-HT Serotonina

PBS Solução salina tamponada com fosfato

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1: Ativação da célula satélite glial após dano neural.....	10
Figura 2: Representação esquemática das estruturas anatómicas envolvidas na técnica de injeção no gânglio do trigêmeo.....	22
Figura 3: Efeitos da administração de RTX no gânglio trigeminal de camundongos.....	30
Figura 4: Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor após a injeção i.g. de ET-1 em camundongos sem tratamento prévio.....	31
Figura 5: Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor após a injeção i.g. sarafotoxina S6c em camundongos sem tratamento prévio.....	32
Figura 6: Efeitos da co-injeção i.g. dos antagonistas seletivos de receptores ET _A e ET _B para endotelinas na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1.....	33
Figura 7: Efeitos da injeção i.g. do antagonista de receptores NMDA para glutamato na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1.....	34
Figura 8: Decurso temporal da hiperalgesia térmica em animais submetidos à CNIO.....	35
Figura 9: Influência da injeção i.g. de resiniferatoxina na instalação da hiperalgesia orofacial ao calor induzida pela CNIO.....	37
Figura 10: Efeitos do tratamento agudo com carbamazepina nas respostas hiperalgésicas ao calor induzidas por CNIO.....	38
Figura 11: Efeito da injeção i.g. do antagonista peptídico seletivo de receptores ET _A , BQ-123, para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO.....	40
Figura 12: Efeito da injeção i.g. do antagonista peptídico seletivos de receptores ET _B , BQ-788, para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO.....	41
Figura 13: Efeito da injeção i.g. do antagonista seletivo não peptídico de receptores ET _B , IRL-2500, para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO.....	42
Figura 14: Efeito da injeção i.g. do IL-1ra, um antagonista de receptores para IL-1 β , na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1.....	43

Figura 15: Efeito da injeção i.g. do IL-1ra, um antagonista de receptores para IL-1 β , na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO.....	44
Figura 16: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a CNIO.....	46
Figura 17: Níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	47
Figura 18: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção a i.g. de fluorocitrato em animais submetidos à CNIO.....	48
Figura 19: Níveis Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção i.g. de BQ-788 em animais submetidos à CNIO.....	49
Figura 20: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção a i.g. de fluorocitrato em animais submetidos à CNIO.....	50
Figura 21: Níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção a intraganglionar de fluorocitrato em animais submetidos à CNIO.....	51
Figura 22: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan na instalação da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	52
Figura 23: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan na manutenção da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	53
Figura 23: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina na hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	54
Figura 24: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina na expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	55
Figura 26: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina nos níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	56
Figura 27: Possível ação parácrina da ET-1 no GT e a sua implicação na hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO.....	69

SUMÁRIO

	pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O sistema sensorial trigeminal.....	1
1.2. A neuralgia do trigêmeo.....	2
1.3. A dor na neuralgia do trigêmeo.....	3
1.4. Mecanismos fisiopatológicos da neuralgia do trigêmeo.....	4
1.5 O tratamento da neuralgia do trigêmeo.....	7
1.6.O envolvimento das células satélites gliais na dor neuropática trigeminal.....	8
1.7. O sistema endotelinérgico.....	11
1.8. Endotelinas e a nocicepção.....	13
1.9. O sistema endotelinérgico e a dor neuropática trigeminal.....	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Reagentes e drogas.....	19
3.3. Injeção no gânglio do trigêmeo.....	21
3.4. Injeção de resiniferatoxina no gânglio do trigêmeo-Padronização da técnica de injeção intraganglionar.....	23
3.4.1. Teste comportamental de "eye wipes" em resposta à aplicação tópica de capsaicina.....	23
3.4.2. Análise da concentração de 3H-RTX presente no gânglio do trigêmeo e estruturas adjacentes.....	23
3.5. Estimulação térmica orofacial por calor.....	24
3.6. Constrição do nervo infraorbital.....	24
3.7. Tratamentos.....	25
3.7.1. Injeção de ET-1 e sarafotoxina S6c no gânglio do trigêmeo.....	25
3.7.2. Injeção de RTX no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	25
3.7.3. Injeção de BQ-123 ou de BQ-788 no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	25
3.7.4. Injeção do antagonista IL-1ra para receptores IL-1R para IL-1 β no gânglio do trigêmeo.....	25
3.7.5. Tratamento agudo com carbamezepina.....	25

3.7.6. Injeção do antagonista IL-1ra para receptores IL-1R para IL-1 β após CNIO.....	26
3.7.7. Tratamentos repetidos com bosentan e minociclina.....	26
3.8. Análise dos níveis de ativação de células satélites gliais no gânglio do trigêmeo após CNIO.....	26
3.8.1. Coleta dos gânglios trigeminais após CNIO.....	27
3.8.2. Técnica de imunofluorescência.....	27
3.9. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Padronização da técnica de injeção no gânglio trigeminal através da administração de resiniferatoxina.....	29
4.2. Caracterização das respostas nociceptivas induzidas pela estimulação por calor na face após injeção de ET-1 e sarafotoxina S6c no gânglio do trigêmeo.....	31
4.3. Influência do tratamento com antagonista de receptores ETA e ETB na hiperalgesia ao calor causada pela injeção de ET-1 no gânglio do trigêmeo.....	33
4.4. Participação dos receptores NMDA para glutamato na hiperalgesia térmica induzida pela injeção de ET-1 no gânglio do trigêmeo.....	34
4.5. Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital.....	35
4.6. Participação das fibras aferentes primárias trigeminais que expressam receptores TRPV1 no desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	36
4.7. Influência do tratamento agudo com carbamazepina na hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	37
4.8. Influência da injeção intraganglionar dos antagonistas de receptores ET _A e ET _B para endotelinas na hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	39
4.9. Efeitos da injeção intraganglionar do antagonista de receptores para Interleucina-1 (IL-1ra) na hiperalgesia induzida por ET-1 e CNIO.....	43
4.10. Influência da CNIO no nível de ativação da células satélites gliais no gânglio trigêmeo.....	45
4.11. Efeitos da Injeção intraganglionar de BQ-788 ao aumento da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo induzida por CNIO.....	50
4.12. Efeitos da Injeção intraganglionar de fluorocitrato ao aumento da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo induzida por CNIO.....	50
4.13. Efeitos do tratamento repetido com bosentan no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO.....	52

4.14. Efeitos do tratamento repetido com bosentan e minociclina sobre a hiperalgesia ao calor e o aumento da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo induzidos por CNIO.....	54
5. DISCUSSÃO.....	57
5.1 A resiniferatoxina como ferramenta farmacológica na padronização da técnica de injeção no gânglio do trigêmeo.....	57
5.2. A hiperalgesia orofacial ao calor após a constrição do nervo infraorbital.....	58
5.3. As ações do sistema endotelinérgico em células do gânglio do trigêmeo.....	59
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	71
8. ANEXO	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. O sistema sensorial trigeminal

Como o próprio nome diz, o nervo trigêmeo é formado por três grandes ramos, o oftálmico, o mandibular e o maxilar. O ramo oftálmico inerva testa, pálpebra, córnea, conjuntiva ocular, mucosas sinusais do frontal, etmóide, esfenóide e dorso do nariz. O ramo maxilar inerva lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O ramo mandibular inerva lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua. Enquanto que os dois primeiros ramos são puramente sensoriais, o terceiro ramo é integrado por fibras sensoriais juntamente com fibras motoras responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios (Usunoff *et al.*, 1997).

As fibras aferentes primárias que compõem o nervo trigêmeo apresentam terminações nervosas periféricas livres, ou podem estar associados a estruturas sensoriais especializadas, que detectam estímulos tácteis inócuos ou proprioceptivos e são classificadas de acordo com sua modalidade sensorial, diâmetro e velocidade de condução. As fibras A α e A β , que representam proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar, são altamente mielinizadas (6-22 μ m), de maior calibre e tem a maior velocidade de condução (40-120 m/s). As fibras A δ , possuem diâmetro e velocidade de condução intermediários (1-5 μ m e 4-30 m/s, respectivamente), enquanto que as fibras C, as únicas não mielinizadas, apresentam os menores diâmetro e velocidade de condução (0,3-1,5 μ m e 0,5-2 m/s, respectivamente). Estes dois últimos grupos representam receptores térmicos e nociceptores, isto é, fibras que são ativadas por estímulos nocivos (Almeida *et al.*, 2004; Dubin *et al.*, 2010).

Os corpos celulares das fibras sensoriais trigeminais estão localizados no gânglio do trigêmeo (GT), também denominado gânglio semilunar ou gânglio de Gasser, o qual está localizado na superfície cerebral do osso temporal, também denominada cavidade de Meckel (Marfurt, 1981; Lazarov, 2002; Leclercq *et al.*, 2013). No interior de um GT típico há milhares de neurônios sensoriais, com grande heterogeneidade no que diz respeito à espessura das fibras, ao tamanho dos corpos celulares e a quantidade de mielina envolvendo essas fibras (Lazarov, 2002).

O componente central do sistema trigeminal é formado pelo complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo, o qual pode ser dividido em núcleo sensorial principal (Sp) e núcleo do trato espinhal (Sp5). Este último compreende três subnúcleos diferentes: oral (Sp5O), interpolar (Sp5I) e caudal (Sp5C). Dentre os diferentes subnúcleos, o caudal é o mais importante, uma vez que as fibras sensoriais sensíveis a estímulos nocivos, ou seja, as fibras C e A δ , projetam-se para as lâminas I, II, V e VI deste subnúcleo, o que o torna o principal sítio de processamento das informações nociceptivas provenientes da região orofacial. O subnúcleo caudal se localiza no tronco cerebral e pode se estender até o nível das vértebras espinhais C2 e C3(Woda, 2003).

Uma importante particularidade do Sp5C é a presença de uma substância gelatinosa que se assemelha àquela presente no corno medular posterior, mas está ausente nos outros subnúcleos. Esta substância gelatinosa compreende um grupo de interneurônios envolvidos na inibição da passagem de informações nociceptivas aferentes, e ainda recebe grande parte das terminações centrais das fibras nociceptivas provenientes da região crânio facial. Além disso, o subnúcleo caudal apresenta a maior concentração de mediadores químicos como, por exemplo, glutamato e substância P (SP) e de receptores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva, bem como de mediadores implicados na modulação destas informações, como serotonina (5-HT), encefalina e GABA, em comparação com os outros subnúcleos. Devido à sua continuidade e semelhança estrutural com o corno dorsal da medula espinhal, o subnúcleo caudal também é denominado corno dorsal bulbar (Gobel *et al.*, 1981; Sessle, 2000).

Ao nível do tronco cerebral, a informação nociceptiva pode ainda ser modulada pela ativação de diversas estruturas centrais, incluindo núcleo maior da rafe, substância cinzenta periaquedutal, área pré-tectal anterior e área parabraquial (Chiang *et al.*, 1991; Sessle, 2005). Os neurônios de segunda ordem que partem dos subnúcleos trigeminais são responsáveis por conduzir a informação nociceptiva até os diferentes núcleos do tálamo, sistema límbico e córtex frontal [para revisão ver: (Sessle, 2005; Sessle, 2011)].

1.2. A neuralgia do trigêmeo

Os estudos epidemiológicos sobre a neuralgia do trigêmeo (NT) são escassos e não refletem a prevalência e a incidência da doença na população mundial. Os primeiros dados surgiram em 1968 e apontavam que 107,5 por milhão de homens e 202,2 por milhão de mulheres eram

afetados pela doença (Penman, 1968). Apesar de pesquisas mais recentes, realizadas no continente europeu, ainda apontarem a NT como uma patologia de baixa prevalência, pois apenas 27 pessoas em 100.000 sofriam com a doença, a NT é considerada a forma mais comum de neuropatia crânio facial (Dieleman *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2009).

A NT é incomum antes dos 40 anos de idade, ocorrendo com maior frequência em idosos entre 60 e 70 anos e afeta mais mulheres do que homens, sendo a relação 2:1 (Dieleman *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2009).

Apesar de ser uma doença de pouca prevalência, esta condição pode ser considerada a causa de dor mais severa que uma pessoa possa experimentar. A drástica diminuição na qualidade de vida dos portadores de NT traz como consequência a ansiedade e a depressão, comorbidades comuns da doença e que, em alguns casos, levam ao suicídio (Carlson, 2008; Macianskyte *et al.*, 2011).

1.3. A dor na neuralgia do trigêmeo - Que dor é essa?

“A neuralgia do trigêmeo é um assassino invisível que deita e levanta comigo e até fala comigo. Quando a dor me deixa surrada na cama vem a voz da doença dizendo: se mata, só a morte te livra disso. E como a Fênix me levanto da cama de cinzas, levanto do que restou de mim. A Fênix ressurgida me diz: Passou a crise? Agora volte a viver até a próxima morte”

<http://www.neuralgia-do-trigemeo.com>

Através do relato acima se percebe como a dor causada pela NT é impiedosa e capaz de destruir a vida de uma pessoa, e é por esse motivo que a doença tornou-se conhecida como a desordem do suicídio.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), define a dor como *“uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão”*. Esta definição considera que os fatores emocionais, culturais e cognitivos individuais, podem influenciar a percepção de dor, ou seja, o *“sentir dor”* é um fenômeno subjetivo. Associando esta definição ao contexto da dor provocada pela NT e considerando sua severidade e as características de sua ocorrência, fica evidente como os fatores emocionais podem influenciar não só na percepção da dor, mas também no modo como cada indivíduo que sofre com a NT interpreta a sua condição.

A Sociedade Internacional de Cefaléia (*International Headache Society - IHS*) descreve a NT como uma condição intensamente dolorosa que, geralmente, acomete apenas um dos lados da face. A sua sintomatologia é caracterizada pela ocorrência de ataques de dor lancinante e súbita, paroxísticos e recorrentes, do tipo choque (Headache Classification Committee of the International Headache, 2013). Os ataques de dor são abruptos e costumam persistir por 1 a 2 minutos. Nos casos mais severos, os episódios de dor são tipicamente acompanhados por contração involuntária ou espasmos musculares da região afetada, inicialmente descritos por Nicolaus André (1756) como “*tic douloureux*” (“tics dolorosos”) (Nurmikko *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2013).

Os estímulos responsáveis por desencadear os ataques de dor são geralmente inócuos, como por exemplo, o leve toque da face, a escovação dos dentes, a ativação dos músculos mastigatórios e faciais durante afala e a alimentação, entre outros. Cada episódio de dor é seguido por um período refratário que pode durar de alguns segundos até vários minutos. Quando os episódios de dor tornam-se muito frequentes, os indivíduos com NT ficam incapacitados de realizar suas atividades diárias, e evitam até mesmo alimentar-se e comunicar-se temendo desencadear uma nova crise, o que diminui consideravelmente a sua qualidade de vida [para revisão ver : (Sessle, 2005; Kumar *et al.*, 2013; Leclercq *et al.*, 2013)].

A NT é geralmente causada por lesão ou disfunção em neurônios periféricos do nervo trigêmeo, o V par de nervos cranianos, que é responsável por fornecer a inervação somato-sensorial à cabeça e face. Os episódios de dor normalmente são desencadeados por estimulação de áreas específicas (*trigger points* ou zonas de gatilho), geralmente localizadas no território inervado pelo trigêmeo. A maioria dos casos de NT são causados pela compressão vascular de um dos ramos do nervo trigêmeo na altura da ponte, sendo classificados como NT clássica [para revisão ver: (Nurmikko *et al.*, 2001; Sessle, 2005; Headache Classification Committee of the International Headache, 2013; Leclercq *et al.*, 2013)].

1.4. Mecanismos fisiopatológicos da neuralgia do trigêmeo

A lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso pode resultar em dor neuropática, a qual se caracteriza por dor espontânea, provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos

(hiperalgesia) (Loeser *et al.*, 2008). Conforme comentado anteriormente, a maioria dos casos de NT ocorrem devido à lesão ou disfunção em um dos ramos do nervo trigêmeo o que caracteriza a doença como uma neuropatia craniofacial (IHS, 2013).

Sabe-se que o processo de desmielinização provocado pela compressão do nervo, pode alterar a expressão de canais de sódio e de potássio em neurônios periféricos e centrais. Já foi demonstrado que os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) ou canais de potássio de ampla condutância ativados por cálcio (BK_{ca}) possuem sua expressão reduzida após lesão de neurônios aferentes trigeminais e isso parece contribuir de forma significativa para o aumento da hiperexcitabilidade neuronal, observado em diferentes modelos experimentais de neuralgia do trigêmeo (Takeda *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015). Por outro lado, a expressão de canais de sódio dependentes de voltagem expressos no SNC e periférico encontra-se aumentada após a lesão de nervos ou a axotomia. Dentre os inúmeros tipos de canais de sódio dependentes de voltagem, os sensíveis à tetrodotoxina, Nav 1.3, Nav 1.7 e Nav 1.8 são de particular interesse. Estes canais são encontrados principalmente em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro e parecem ser os principais responsáveis pela geração dos disparos ectópicos, que contribuem à dor espontânea e a sensibilização de neurônios periféricos e do sistema nervoso central [para revisão ver: (Woolf, 1983; Ro *et al.*, 2005)]. Já foi demonstrado que indivíduos portadores de NT apresentam uma maior expressão de canais Nav1.3 no tecido gengival correspondente a região orofacial acometida pela patologia (Siqueira *et al.*, 2009).

Além dos canais iônicos, outros tipos de proteínas também têm sua expressão modificada após a lesão de um nervo [para revisão ver: (Woolf, 2004)]. Um dos receptores que tem seu padrão de expressão alterado após lesão de neurônios trigeminais é o TRPV1. Este receptor é um canal de cátion não seletivo, expresso por neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, que pertence à família de receptores TRP, é ativado por capsaicina, (ingrediente pungente da pimenta vermelha), calor ($>43^\circ\text{C}$), prótons, alguns endocanabinóides e produtos da lipoxigenase [para revisão ver: (Julius, 2013)]. O aumento na expressão os receptores TRPV1, bem como sua ativação têm sido implicados no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia orofacial à estimulação por calor associada a modelos animais de neuralgia trigeminal (Urano *et al.*, 2012; Zakir *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2014).

Ademais, algumas teorias para explicar a causa da neuralgia do trigêmeo foram propostas. Estudos consideram que a desmielinização de

fibras A β trigeminais pode gerar atividade ectópica nas mesmas, que se conectam com neurônios de limiar dinâmico amplo no núcleo do trato espinhal. Tal modificação promove uma ativação em alta frequência destes neurônios, os quais normalmente transmitem as informações geradas nos receptores mecânicos de baixo limiar, que passam a ser codificadas como informações nociceptivas. Este seria um dos mecanismos que contribui para o desenvolvimento da hiperalgesia à estímulos inócuos mecânicos, um dos sintomas comumente observados em pacientes com neuralgia do trigêmeo (Calvin *et al.*, 1977; Truini *et al.*, 2005).

Devor e colaboradores (2002) propuseram a teoria da ignição, a qual é baseada em recentes avanços na compreensão do comportamento elétrico anormal em neurônios aferentes trigeminais, lesionados pela compressão das raízes nervosas do trigêmeo, e novas observações histopatológicas de biópsias de pacientes com neuralgia do trigêmeo, que são submetidos à cirurgia de descompressão microvascular. De acordo com esta hipótese, a NT resulta de anormalidades específicas no aferentes trigeminais na raiz ou GT. A lesão aumenta a excitabilidade dos axônios do neurônios trigeminais, o que consequentemente da origem aos ataques paroxístico, que explica os principais sinais e sintomas de neuralgia do trigêmeo (Devor *et al.*, 2002).

Por outro lado, a teoria das projeções convergentes admite que impulsos contínuos e recorrentes, provenientes de fibras aferentes que inervam a cabeça e a nuca, convergem no subnúcleo caudal induzindo a liberação de neurotransmissores e substâncias vasoativas nesta região, o que promove a ativação de neurônios de segunda ordem, os quais transmitem sinais nociceptivos para regiões como tálamo, sistema límbico e córtex somato-sensorial que interpretam a informação nociceptiva como dor [para revisão ver : (Montano *et al.*, 2015)].

Uma outra hipótese para a causa da neuralgia do trigêmeo foi proposta através da teoria da biorressonância. Esta teoria considera que quando a frequência de vibração de estruturas localizadas ao redor do trigêmeo torna-se próxima da frequência natural do nervo, a ressonância do mesmo ocorre. Desta forma, a biorressonância pode causar lesões nos neurônios trigeminais e assim conduzir a uma transmissão anormal do impulsos nervoso que pode resultar em dor orofacial (Jia *et al.*, 2010).

Na tentativa de melhor compreender os mecanismo fisiopatológico envolvidos na neuralgia do trigêmeo, bem como identificar potenciais alvos terapêuticos efetivos, alguns modelos experimentais foram padronizados e avaliados em animais. A constrição do nervo infraorbital em é um dos modelos animais utilizados para o

estudo da neuralgia do trigêmeo. Este nervo é predominantemente sensorial, corresponde a quase toda divisão maxilar do trigêmeo e é formado por 18 a 25 feixes nervosos, os quais contêm aproximadamente 20.000 fibras mielinizadas (60%) e 13.000 fibras não mielinizadas (40%) (Golden *et al.*, 1993). Estudos prévios demonstraram que camundongos e ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital desenvolvem hiperalgesia a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Vos *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 2003; Luiz *et al.*, 2010). Ademais, foram padronizados dois outros modelos de neuralgia do trigêmeo em camundongos, que consistem na ligação parcial do nervo infraorbital (Xu *et al.*, 2008) e na ligação total do nervo mental (Seino *et al.*, 2009). Em ambos os estudos, os animais apresentam hiperalgesia mecânica persistente.

1.5. Tratamento da neuralgia do trigêmeo

Atualmente, o tratamento farmacológico da NT é comumente baseado no uso de fármacos anticonvulsivantes e a escolha da melhor indicação terapêutica é, geralmente, embasada por evidências clínicas sobre nível de efetividade de cada tratamento. A carbamazepina é o fármaco de primeira escolha, uma vez que estudos clínicos demonstram que a sua utilização é efetiva em 60 a 80% dos casos de NT. No entanto, sabe-se que o uso prolongado do fármaco está associado com reações adversas que incluem sonolência, sedação, desconforto gastro-intestinal e hepatotoxicidade, com recorrência dos sintomas em até 50% dos pacientes. Além disso, a carbamazepina também atua como um indutor de enzima hepáticas. Ainda, há possibilidade da ocorrência de efeitos colaterais mais graves, como agranulocitose e anemia aplásica [para revisão ver: (Cruccu *et al.*, 2008; Di Stefano *et al.*, 2014)].

Estudos clínicos também demonstram que o tratamento com o análogo cetônico da carbamazepina, a oxcarbazepina, parece ser efetivo em até 50% dos casos de NT. Além de possuir menor interação com outras drogas o fármaco parece ser melhor tolerado pelo pacientes. Outro anticonvulsivante empregado no tratamento da NT é a lamotrigina. No entanto, os dados clínicos que embasam a sua indicação são menos consistentes [para revisão ver: (Cruccu *et al.*, 2008; Di Stefano *et al.*, 2014)].

Os efeitos analgésicos da carbamazepina, oxcarbazepina e lamotrigina parecem ser decorrentes do bloqueio da geração de potenciais de ação em alta frequência, o mesmo mecanismo envolvido nos seus efeitos anti-epilépticos. Os alvos para ação destes

anticonvulsivantes na dor neuropática são os canais de sódio, cuja expressão e distribuição alteradas geram a hiperexcitabilidade das fibras aferentes primárias lesionadas (Rogawski *et al.*, 2004).

Além dos anticonvulsivantes, o baclofeno, um agonista de receptores GABA_B tem sido utilizado para tratar a NT (Zhang *et al.*, 2013). O baclofeno atua em receptores GABA_B localizados nas terminações pré-sinápticas centrais das fibras aferentes primárias inibindo a liberação de glutamato, SP e CGRP por estas fibras, prevenindo, desta forma, a ativação de neurônios nociceptivos de segunda ordem (Price *et al.*, 1984; Landry *et al.*, 2009).

Ademais, uma outra terapia vem sendo utilizada no tratamento da dor causada pela NT, a Toxina Botulínica do tipo A (BTX-A). Estudos mostram que a administração de pequenas quantidades de BTX-A em regiões, como o arco zigomático, é suficiente para promover o alívio dor, em indivíduos com NT (Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

Para pacientes com NT que sejam intolerantes ou refratários à terapêutica medicamentosa, existe ainda opção de tratamento através de intervenções cirúrgicas, as quais podem ser percutâneas ou abertas (Cruccu *et al.*, 2008; Krafft, 2008). As técnicas percutâneas são menos invasivas e consistem em compressão por balão, rizotomia por radiofrequência ou por glicerol, ou radiocirurgia estereotáxica com raios gama. Apesar de causarem poucos efeitos colaterais, essas técnicas promovem perda da sensibilidade em grande parte dos pacientes, uma vez que o alívio da dor é promovido através de lesões provocadas no nervo, que acabam induzindo uma sensação de dormência (Cruccu *et al.*, 2008; Krafft, 2008).

O procedimento cirúrgico aberto compreende a descompressão microvascular, a qual envolve a exploração da fossa craniana posterior. Dentre todas as técnicas cirúrgicas citadas até agora, a descompressão microvascular é a única capaz de reduzir a sensação de dor sem provocar dano neural, além de promover um alívio mais duradouro que as técnicas percutâneas. No entanto, por ser um procedimento aberto, oferece um maior risco de complicações graves, como meningite e morte (Ong e Keng, 2003; Cruccu *et al.*, 2008).

1.6. O envolvimento das células gliais na dor neuropática trigeminal

Tem sido proposto que a interação entre células gliais e neurônios no subnúcleo caudal do trigêmeo é um elemento fundamental no desenvolvimento da dor neuropática trigeminal e na sua manutenção. A maior parte dos estudos a respeito deste tema implica, os astrócitos e

a microglia como as principais células gliais envolvidas neste processo [para revisão ver:(Chiang *et al.*, 2011)].

Em condições normais, ambos os tipos celulares desempenham funções importantes para manter a homeostase das atividades neuronais. Porém, após dano neuronal, estas células tornam-se ativadas, sofrendo diversas alterações funcionais e morfológica como, por exemplo, o aumento de cálcio intracelular e a fosforilação das proteínas quinases ativadas, entre outras. Todas essas alterações levam a um aumento na liberação mediadores pro-inflamatórios gliais, como por exemplo, fator de crescimento neural derivado do cérebro (BDNF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), entre outros, que irão interagir não só com neurônios, mas também com ambas as células gliais podendo levar ao desenvolvimento de um quadro de dor [para revisão ver: (Ji *et al.*, 2013)].

Em modelos animais de neuralgia do trigêmeo, a ativação de astrócitos e da microglia no subnúcleo caudal do trigêmeo parece estar diretamente relacionada com o processo de sensibilização dos neurônios trigeminais que leva ao desenvolvimento de hiperalgisia orofacial. Estudos demonstraram que a lesão em neurônios aferentes primários trigeminais induz um aumento na ativação de astrócitos e microglia no subnúcleo caudal (Sp5C), e que estes estariam envolvidos no desenvolvimento da hiperalgisia orofacial, bem como no aumento da excitabilidade de neurônios desta região (Piao *et al.*, 2006; Okada-Ogawa *et al.*, 2009).

Todavia, ainda que os astrócitos e microglia tenham se tornado o principal foco de estudo neste tema, outros trabalhos realizados nesta área apontam também à comunicação parácrina entre células satélites gliais (CSG) com neurônios nos gânglios sensoriais, como um importante mecanismo para as alterações na excitabilidade neuronal que acontecem na dor neuropática [para revisão ver: (Takeda *et al.*, 2009)].

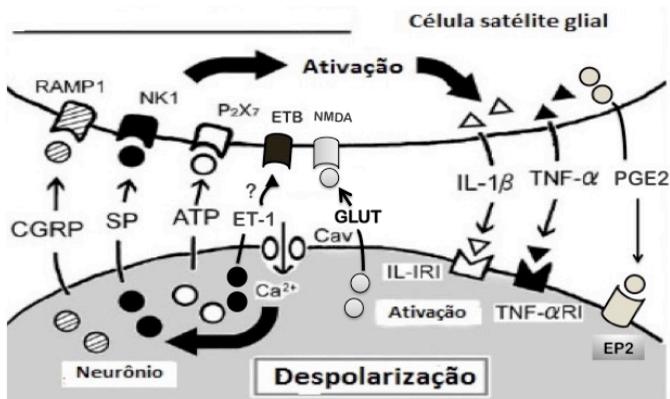
Conforme comentado anteriormente, a exemplo do gânglio da raiz dorsal (GRD), o GT é formado por corpos celulares dos neurônios aferentes primários que transmitem informações sensoriais da periferia para o SNC (Aldskogius *et al.*, 1986; Lazarov, 2002). Nos gânglios sensoriais, o corpo celular de cada neurônio, geralmente, é circundado por 2 ou 3 CSG, formando unidades funcionais distintas. As CSG possuem morfologia laminar e a sua disposição ao redor dos corpos celulares lhes confere uma característica denominada "*envelope*". As células estão localizadas a cerca de 20 nm de distância do soma, existindo, obviamente, uma razão para tal proximidade. Apesar das CSG

possuírem morfologia diferente dos astrócitos, elas compartilham algumas de suas características e funções como, por exemplo, o transporte e metabolismo de glutamato e glicose e são importantes na manutenção do equilíbrio iônico local (Pannese, 1981).

Diferente do SNC, os gânglios sensoriais não possuem sinapses. Desta forma, a comunicação neuronal ganglionar ocorre de forma parácrina, através de mediadores, neurotransmissores e íons liberados pelo soma dos neurônios e ou pelas CSG [para revisão ver: (Hanani, 2005; Takeda *et al.*, 2009)]. Estudos demonstraram que, quando os axônios dos neurônios sensoriais periféricos trigeminais são lesados, ocorre liberação de íons K^+ no espaço extracelular intraganglionar, que é determinante para o aumento da excitabilidade neuronal, a qual, por sua vez, é primariamente regulada por canais de potássio do tipo (Kir.4.1) e (SK3) presentes, exclusivamente, nas CSG (Devor *et al.*, 1990; Cherkas *et al.*, 2004; Vit *et al.*, 2006).

Ainda, o estudo realizado por Vit e colaboradores (2006) também demonstrou que a redução da proteína conexina 43 (Cx43), encontrada somente em CSG, esta relacionada com o desenvolvimento de comportamento nociceptivo orofacial em ratos. Esta proteína, é responsável por formar as junções comunicantes que interligam as CSG e são essenciais para a redistribuição de íons K^+ entre elas (Huang *et al.*, 2005).

Além das proteínas citadas anteriormente, as CSG também expressam receptores para CGRP (RAMP1), SP (NK1), ATP (P_2X_7) e endotelinas (ET_B) que, quando estimulados promovem a ativação das CSG do GT (Matsuka *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Feldman-Goriachnik *et al.*, 2011). Ademais, estudos tem demonstrado que, quando ativadas, as CSG podem liberar prostaglandinas e citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α que, por sensibilizarem os nociceptores trigeminais, causam hiperalgesia orofacial, como demonstrado na **Figura 1** (Takeda *et al.*, 2005a;2005b;2007;2008).



(Adaptado de -Takeda et al., 2009)

Figura 1: Ativação da célula satélite glial após dano neural. Após a lesão dos neurônios aferentes primários, ocorre aumento do influxo de cálcio, que induz a liberação de CGRP, SP, e ATP e glutamato (GLUT) pelos neurônios dos gânglios sensoriais. Esses mediadores agem em seus respectivos receptores localizados nas células satélites gliais (CSG), ativando-as. As CSG passam a liberar citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α e prostaglandina E₂, que ativam seus receptores localizados nos neurônios, promovendo a despolarização neuronal e consequente aumento da sua excitabilidade.

1.7. O sistema endotelinérgico

As endotelinas (ETs) constituem uma família de peptídeos com, aproximadamente, 27 anos de história. A endotelina-1 (ET-1) é o representante mais importante desta família, que também inclui a ET-2 e a ET-3, todas constituídas por 21 aminoácidos. Os peptídeos foram descobertos e clonados por Yanagisawa e colaboradores (1988) e Inoue e colaboradores (1989). Desde então, inúmeros estudos tem demonstrado que as ETs produzem efeitos variados em múltiplos tecidos e sistemas.

Embora as células endoteliais vasculares sejam a principal fonte de ET-1, os genes que codificam os três peptídeos são expressos, em graus variados, por uma ampla variedade de células incluindo, miócitos cardíacos, células musculares lisas vasculares, intestinais e tubulares renais, gliais, pituitária, macrófagos, mastócitos, linfócitos e neurônios, entre outras (Kedzierski *et al.*, 2001).

A síntese da ET-1 ocorre a partir de um polipeptídeo com aproximadamente 212 aminoácidos denominado pré-pró-endotelina-1, o

qual é clivado por convertases ou peptidases dando origem à big-endotelina-1, um peptídeo que pode conter de 37 a 41 aminoácidos, dependendo da espécie. O segundo passo para a síntese da ET-1 é a clivagem da big-endotelina-1 por endopeptidases específicas, denominadas enzimas conversoras de endotelina (ECE), sendo conhecidas pelo menos duas isoformas, ECE₁ e ECE₂. De forma semelhante, ocorre a síntese de ET-2 e ET-3 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 após sofrerem a ação da ECE dão origem a ET-2 e ET-3, respectivamente (Nussdorfer *et al.*, 1999).

Em mamíferos, as ações das endotelinas são mediadas através de dois receptores específicos, denominados ET_A e ET_B, os quais foram clonados há 25 anos atrás por Arai e colaboradores (1990) e o por Sakurai e colaboradores (1990), respectivamente. Ambos os receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G. Os receptores ET_A acoplam-se principalmente a G_{q/11} e G_{q12/13} já, os ET_B, estão acoplados a G_{i/o} e G_{q/11} (Rashid *et al.*, 2004). Enquanto o receptor ET_A apresenta maior afinidade pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3 o receptor ET_B possui afinidade semelhante pelas três isoformas (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990; Sakamoto *et al.*, 1991). As ações de ambos os receptores são mediadas através da ativação da enzima fosfolipase C, a qual por sua vez, induz a formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol, causando a mobilização de cálcio intracelular e posterior ativação de vias que podem ou não envolver a participação da proteína quinase C (PKC) (Masaki *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2002).

A ligação da ET-1 aos seus receptores é considerada praticamente irreversível, mas, após a ligação com o peptídeo, tanto os receptores ET_A quanto os ET_B são rapidamente internalizados. Os receptores ET_A são reciclados e retornam à superfície da membrana. Este processo contribui, por exemplo, para sua capacidade de induzir respostas contráteis de longa duração em vasos sanguíneos. Por outro lado, os receptores ET_B são encaminhados para os lisossomos, onde são degradados e, este processo é importante para a função de depuração da ET-1 circulante desempenhada por este receptor (Bremnes *et al.*, 2000).

Experimentalmente, os receptores ET_A são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123, ou não peptídicos, como o atrasentan, entre outros. Já os receptores ET_B são ativados seletivamente por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala^{1,3,11,15}] 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, IRL- 2500 entre outros (Masaki *et al.*, 1999; Davenport *et al.*, 2006; Maguire *et al.*, 2014).

As endotelinas tornaram-se especialmente conhecidas devido aos seus efeitos vasoativos. Porém, com o passar dos anos descobriu-se que as ETs são fundamentais não só para manutenção de funções fisiológicas importantes, mas também estão envolvidas no desenvolvimento de alguns processos patológicos, como por exemplo: falência renal congestiva, hipertensão, sepse, asma, falência renal e neoplasia (Rubanyi *et al.*, 1994; Giannessi *et al.*, 2001; Lalich *et al.*, 2007). Estas descobertas incentivaram o desenvolvimento de antagonistas de receptores de endotelinas que, atualmente, estão aprovados para uso clínico.

O bosentan (Tracleer[®]) é um antagonista dual (ou misto) de receptores ET_A e ET_B de uso oral, que foi introduzido na clínica para o tratamento da hipertensão pulmonar e representa um dos maiores avanços na terapia desta condição que anteriormente era realizada, essencialmente, com análogos da prostaciclina (Ichimura *et al.*, 2011). Recentemente, o macitentan (Opsumit[®]), também antagonista dual de receptores ET_A/ET_B de uso oral, passou a representar a nova geração de antagonistas de ETs aprovado para tratamento da hipertensão pulmonar. O fármaco foi desenvolvido a partir da estrutura molecular do bosentan, porém, possui maior eficácia e tolerabilidade [para revisão ver: (Maguire *et al.*, 2014)].

Além do controle da hipertensão pulmonar o bosentan também demonstra eficácia para tratar ulcerações digitais em pacientes com Síndrome de Raynaud primária ou decorrente de esclerose múltipla. Nestes casos, 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).

1.8. Endotelinas e a nocicepção

A primeira evidência de que as endotelinas possuíam características algícas foi apresentada por Ferreira e colaboradores em (1989). Neste estudo, foi demonstrado que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos, incapacitação articular em cães, e sensação de prurido e hiperalgesia mecânica no antebraço de humanos. Também em humanos, Dahlof e colaboradores (1990) demonstraram que a infusão de ET-1 na artéria braquial causava dor profunda e hiperalgesia mecânica no antebraço.

Após estas descobertas, vários trabalhos subsequentes evidenciaram que as endotelinas são não só potentes peptídeos vasoativos, mas também algogênicos endógenos importantes na modulação da nocicepção. Assim, o sistema endotelinérgico emergiu como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor crônica (para revisão ver: (Smith *et al.*, 2014).

Os receptores de ETs estão distribuídos nas diferentes estruturas que compõem as vias de transmissão da nocicepção. Os receptores ET_A estão localizados em fibras aferentes primárias de pequeno, médio e grande calibres, no GRD e neurônios e células da glia (Vigne *et al.*, 1993; Stanimirovic *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1995; Lysko *et al.*, 1995). Os receptores ET_B também são encontrados, no DRG, em células satélites gliais e células de Schwann que revestem neurônios mielinizados, mas não nos neurônios propriamente (Pomonis *et al.*, 2001; Berti-Mattera *et al.*, 2006; Chichorro *et al.*, 2010). A razão de receptores ET_A/ET_B no DRG é de 3:2 (Plant *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos pelos quais a ET-1 induz respostas nociceptivas esta relacionado a um aumento da ativação de canais de sódio dependentes de voltagem e resistentes à tetrodotoxina. Este mecanismo parece ser mediado por receptores ET_A (Zhou *et al.*, 2002). Já, a ativação de receptores ET_B por ET-1 induz aumento dos níveis de AMPc e ativação de proteína quinase C, e estes mecanismos parecem estar envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida pelo peptídeo em ratos (da Cunha *et al.*, 2004). Ainda, a hiperalgesia mecânica desencadeada pela ET-1 na pata posterior de ratos depende, de maneira significativa, de vias de sinalização envolvendo, entre outras, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) p38, ERK1/2 e JNK (Motta *et al.*, 2006).

A administração de ET-1 em roedores parece estar associada a evocação de comportamento nociceptivo espontâneo. A injeção de ET-1 na pata de ratos é capaz de induzir comportamento nociceptivo que parece ser mediado pela ativação de receptores ET_A (Piovezan *et al.*, 2000). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que altas doses de ET-1 podem estar relacionadas a efeitos anti-nociceptivos e anti-hiperalgésicos. Esta ação parece ocorrer via ativação de receptores ET_B em ratos e camundongos (Piovezan *et al.*, 2000; Khodorova *et al.*, 2002).

O efeito resultante da ativação de receptores ET_B sobre as 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). Corroborando esses achados,

Gomes e colaboradores (2012) demonstraram que a injeção intradérmica de ET-1 na bochecha de camundongos induziu comportamento nociceptivo e pruritoceptivo, os quais foram potencializados pelo bloqueio seletivo de receptores ET_B. O estudo ainda mostrou que ambos os comportamentos evocados foram revertidos pela co-injeção do peptídeo com um agonista seletivo de receptores μ -opióide (Gomes *et al.*, 2012).

Baamonde e colaboradores (2004) demonstraram que ambos os receptores, ET_A e ET_B medeiam a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina ou por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos, mas apenas os receptores ET_A parecem estar envolvidos com a hiperalgesia térmica. Porém, também foi demonstrado que a hiperalgesia térmica promovida por ET-1 pode ocorrer de forma similar em animais nocautes condicionados para receptores ET_A e em animais do tipo selvagens, sugerindo que as respostas hiperalgésicas evocadas pelo peptídeo podem ocorrer independente destes receptores. Por outro lado, a deleção de ET_A demonstrou reduzir significativamente o comportamento nociceptivo evocado por capsaicina, implicando a participação dos receptores vanilóides de potencial transitório 1 (TRPV1) na hiperalgesia térmica induzida por ET-1 (Stosser *et al.*, 2010). Os receptores TRPV1, foram encontrados co-localizados com receptores ET_A no GRD, corroborando o fato de que a ET-1 potencializa as correntes geradas de capsaicina via ET_A e, essa ação, parece ser mediada pela ativação da proteína quinase C ϵ (Plant *et al.*, 2006).

Estudos realizados em humanos reforçam o potencial hiperalgésico da ET-1. Quando administrada por via intradérmica, baixas doses (12,5 - 50 μ g) de ET-1 causam coceira intensa, eritema, hiperalgesia mecânica à estímulo frio por até 2 horas. Este efeito parece estar relacionado à sensibilização de fibras C (Hans *et al.*, 2007; Namer *et al.*, 2008).

As ETs e seus receptores também têm sido implicados no desenvolvimento e na manutenção de respostas nociceptivas associadas a modelos animais de dor neuropática. Estudos mostraram que a lesão unilateral do nervo ciático de ratos, foi capaz de potencializar a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de ET-1. Esse efeito foi revertido pelo bloqueio seletivo de receptores ET_A, mas não de ET_B. Ainda, a lesão também parece elevar a expressão do RNAm para ET-1 e de ambos os receptores nos nervos espinhais (Klass *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2010).

1.9. O sistema endotelinérgico e a dor neuropática trigeminal

A presença das endotelinas no sistema trigeminal foi descrita pela primeira vez por Milner e colaboradores (2000), que identificaram a presença de RNAm para (ET-1) em uma subpopulação de neurônios sensíveis à capsaicina no GT de ratos. Anos após esta descoberta, Chichorro e colaboradores (2010) não só confirmaram estes dados, como também demonstraram a presença adicional de RNAm para ET-3 no GT dos roedores. Além disso, durante este período, vários estudos desenvolvidos pelo mesmo grupo descreveram alguns mecanismos operados pelas endotelinas e seus receptores, os quais são importantes no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia orofacial a estímulos mecânico e térmicos induzida por um modelo de neuralgia trigeminal em ratos (Chichorro *et al.*, 2006a; Chichorro *et al.*, 2006b; Chichorro *et al.*, 2009; Chichorro *et al.*, 2010).

Os receptores de endotelinas foram identificados tanto no GT de humanos quanto de ratos (Chichorro *et al.*, 2009; Uddman *et al.*, 2006). No GT de ratos, os receptores ET_A estão expressos tanto em fibras C não peptidérgicas quanto em fibras A de médio a grande calibres. Já os receptores ET_B foram encontrados somente em fibras C não peptidérgicas e células satélites em todas as três divisões do GT (Chichorro *et al.*, 2009). Ambos os receptores encontram-se distribuídos em diferentes proporções em cada uma das três regiões do gânglio. Tanto os ET_A quanto os ET_B estão predominantemente expressos nos corpos celulares dos neurônios que compõe os ramos maxilar e mandibular (aproximadamente 12% e 6%, respectivamente). Por outro lado, apenas uma pequena parcela dos neurônios do ramo oftálmico contém esses receptores (5% e 1%, respectivamente) (Chichorro *et al.*, 2010).

Até o momento, os estudos acerca dos possíveis mecanismos envolvidos na hiperalgesia mediada por ET-1, em modelos animais de neuralgia do trigêmeo, apontam a interação de ambos os receptores endotelinérgicos com receptores TRPV1. Chichorro e colaboradores (2010) demonstraram, em ratos, que cerca de 30% dos neurônios que expressam receptores TRPV1 no GT co-expressam tanto receptores ET_A quanto ET_B. Além disso, o estudo *in vitro* realizado por Yamamoto e colaboradores (2013) demonstrou que os receptores de endotelinas expressos em neurônios do GT de ratos são funcionais e descreveu os mecanismos operados por estes receptores para promover a ativação dos neurônios trigeminais. O estudo mostrou que a ação de ET-1 em receptores ET_A do GT leva à ativação de canais TRPV1 via estimulação

de proteína quinase C, enquanto que a ação do peptídeo em receptores ET_B parece promover o aumento de cálcio intracelular (Yamamoto et al., 2013).

Ademais, outras ações para ET-1 no GT têm sido propostas. Conforme comentado anteriormente, a comunicação parácrina entre neurônios e CSG nos gânglios sensoriais é importante para o desenvolvimento da dor neuropática orofacial (Takeda et al., 2009). Neste contexto, cabe citar o estudo *in vitro* realizado por Feldman-Goriachnik e Hananni (2011), o qual demonstrou, pela primeira vez, que os receptores ET_B localizados em culturas de CSG do GT de camundongos são responsivos à ET-1. Estes receptores, quando ativados, promovem um aumento nos níveis de cálcio intracelular, sugerindo que as endotelinas, quando liberadas por neurônios do gânglio sensorial, também podem interagir com as CSG e, desta forma, contribuir para o processo nociceptivo, induzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios por estas células. Dentre estes mediadores, é possível citar a IL-1 β , uma vez que a ação parácrina do mediador, liberado por CSG, em neurônios do GT parece contribuir com o desenvolvimento e a manutenção da hiperalgesia orofacial (Takeda et al., 2007; Takeda et al., 2008). Ademais, a relação entre ET-1 e o aumento dos níveis do RNAm para a interleucina, em células da cavidade oral, também já foi demonstrado (Rikimaru et al., 2009).

Obviamente, os últimos estudos citados trazem evidências consistentes sobre a funcionalidade dos receptores de endotelinas localizados no GT e sobre a participação dos mesmos nos mecanismos que envolvem a transmissão dos estímulos nociceptivos no sistema trigeminal. Assim, de acordo com estes achados e considerando que ainda não existem estudos *in vivo* demonstrando a real contribuição do sistema endotelinérgico no GT para o processamento da informação nociceptiva orofacial, a hipótese deste estudo é: A ET-1, quando injetada diretamente no gânglio trigeminal de camundongos pode causar hiperalgesia orofacial por ativar os receptores endotelinérgicos, localizados em neurônios e células satélites gliais do GT.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a contribuição do sistema endotelinérgico no gânglio trigeminal para o processamento nociceptivo orofacial.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Padronizar a técnica de injeção no gânglio trigeminal;
- ✓ Investigar a habilidade da ET-1 exógena em promover hiperalgisia térmica orofacial quando injetada no gânglio trigeminal;
- ✓ Avaliar a participação do receptores ET_A e ET_B para endotelinas nas modulação das respostas hiperalgésicas ao calor induzidas pela injeção de ET-1 no gânglio trigeminal;
- ✓ Verificar o envolvimento do glutamato e da interleucina- 1β nas respostas hiperalgésicas ao calor induzidas pela injeção de ET-1 no gânglio trigeminal;
- ✓ Investigar a participação dos receptores ET_A e ET_B , localizados em células do gânglio do trigêmeo, na hiperalgisia térmica ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital;
- ✓ Analisar possíveis alterações induzidas pela constrição do nervo infraorbital na ativação de células satélites gliais, i.e. alterações na expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo de camundongos, através da técnica de imunofluorescência;
- ✓ Analisar a possível participação dos receptores ET_B na ativação de células satélites gliais no gânglio do trigêmeo, i.e. alterações na expressão de GFAP, no gânglio do trigêmeo, induzidas pela constrição do nervo infraorbital, através da técnica de imunofluorescência;
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento sistêmico repetido com um antagonista dual dos receptores ET_A e ET_B no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgisia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Em todos os experimentos, foram utilizados camundongos *Mus musculus* machos, da linhagem *Swiss*, com 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. No mínimo 3 dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério do laboratório de peptídeos para a sala de ambientação e agrupados em um número máximo de 20 animais por caixa. Os experimentos foram realizados sempre durante a fase clara do ciclo em sala silenciosa, mantendo-se o controle da temperatura. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo recebido o número de protocolo CEUA PP88051.

3.2. Reagentes e drogas

Foram empregados os seguintes reagentes, drogas e soluções:

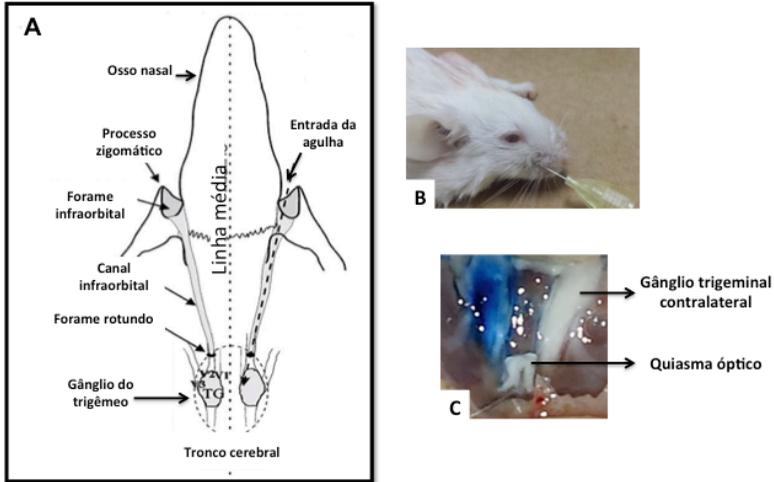
- ✓ Anticorpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar glial de camundongos (GFAP, Cell Signaling Technology, Inc., California, USA);
- ✓ Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Flúor 488 (Molecular Probes, Oregon, USA);
- ✓ Bosentan (Tracleer[®], Actelion, Auschwill, Suíça), antagonista não peptídico dual de receptores ET_A/ET_B ;
- ✓ BQ-123(ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]),(American Peptides, Califórnia, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A para endotelinas;
- ✓ BQ-788(N-cis-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- γ -metileucil-D-1-metoxycarbonil-D-norleucina) (AmericanPeptides, Califórnia, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET_B para endotelinas;
- ✓ Capsaicina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), agonista seletivo de receptores TRPV1;

- ✓ Carbamazepina (Sigma gma, St. Louis, MO, USA), anticonvulsivante;
- ✓ Endotelina-1 (American Peptides, Natick, MA, USA), agonista natural de receptores ET_A e ET_B;
- ✓ Cloridrato de Cetamina (Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil), anestésico geral, antagonista de receptores NMDA para glutamato;
- ✓ Minociclina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), antibacteriano da classe das tetraciclinas;
- ✓ D-AP5, (Ácido-D(-)-2-Amino-5-fosfonopentanóico) (Sigma, St. Louis, MO, USA), antagonista competitivo de receptores NMDA;
- ✓ Fluorocitrato (Sal de bário do ácido DL-fluorocítrico), (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- ✓ Hidrato de cloral (Sigma, St. Louis, MO, USA), anestésico geral;
- ✓ IL-1ra, recombinante humana (R&D Biosystems, Minneapolis, USA) antagonista de receptores de IL-1 do tipo I (IL-1RI);
- ✓ IRL- 2500 (R&D Biosystems, Minneapolis, USA), antagonista não peptídico seletivo de receptores ET_B;
- ✓ Isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), anestésico geral inalatório;
- ✓ Oxitetraciclina (Terramicina[®], Pfizer, Guarulhos, Brasil), antibacteriano;
- ✓ Resiniferatoxina (Alomone Labs, Inc, Jerusalém, Israel), agonista seletivo ultrapotente de receptores TRPV1;
- ✓ ³H-Resiniferatoxina (Perkin-Elmer, Inc, USA), agonista seletivo de receptores TRPV1 marcado com isótopo radioativo Trítio (30Ci/mmol)
- ✓ Salina tamponada com fosfato (0,01M), cloreto de potássio (0,0027M), cloreto de sódio (0,137M) em tabletes (*phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- ✓ Sarafotoxina (S6c)([Ala^{1,3,11,15}] ET-1), (Tocris Bioscience, Bristol, UK), agonista seletivo de receptores ET_B;
- ✓ Xilazina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha), relaxante muscular de ação central, agonista seletivo de receptores α₂-adrenérgico.

O Bosentan, Carbamazepina e Minociclina foram diluídos em PBS momentos antes dos experimentos. Na preparação da Capsaicina foram utilizados 10% de Tween 80 e 80% de PBS, e as diluições subseqüentes foram feitas em PBS. As soluções estoque de ET-1 (10^{-4} M), Sarafotoxina S6c (10^{-4} M), BQ-123 (10^{-2} M), BQ-788 (10^{-2} M) e IRL-2500 (10^{-3} M), Fluorocitrato (10^{-3} M) foram preparadas em PBS. A solução estoque de do IL-1ra (600 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi preparada em PBS estéril e albumina sérica bovina 0,1%. Todas as soluções estoque foram mantidas a uma temperatura de -20°C e diluídas para as concentrações desejadas momentos antes dos experimentos com o mesmo veículo utilizado para dissolvê-las.

3.3. Injeção no gânglio do trigêmeo

A injeção no GT de camundongos foi realizada conforme descrito em ratos por (Neubert *et al.*, 2005), com modificações. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (2% em 100% de CO_2) e em seguida posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica. A cabeça foi cuidadosamente estabilizada por uma das mãos do experimentador e a porção rostral-anterior do processo zigomático direito do osso maxilar foi apalpada. O acesso ao GT foi realizado através de uma agulha gengival estéril 25 gauge, curta (INJEX). Devido à pequena dimensão do GT de camundongos, volumes acima de 0,5 μl podem extravasar e permear outras estruturas adjacentes ao gânglio. Assim, para que fosse possível obter um controle fino do pequeno volume de solução injetada, a agulha foi acoplada a uma seringa Hamilton (10 μl) através de uma cânula de polietileno (PE 10) (CLAY ADAMS). No momento da administração, a agulha foi posicionada a um ângulo de $\sim 10^{\circ}$ relativo à linha medial da cabeça e, posteriormente, inserida na porção identificada do processo zigomático, seguindo pelo forame infraorbital, terminando logo após o forame rotundo, na porção medial do GT, conforme ilustrado na figura (2A e B). O volume final de cada solução injetada foi de 0,5 μl .



(Adaptado de Neubert et al., 2005)

Figura 2: Representação esquemática das estruturas anatômicas envolvidas na técnica de injeção no gânglio do trigêmeo. O **painel A** mostra a entrada da agulha através do forame infraorbital passando pelo forame rotundo e terminando no gânglio trigeminal. O **painel B** mostra uma imagem da posição da agulha inserida no forame infraorbital de um camundongo. No **painel C** pode-se observar uma imagem de um gânglio do trigêmeo corado com 0,5 μ l do corante Azul de Evans administrado através da técnica de injeção i.g., pelo forame infraorbital. O gânglio contralateral e quiasma óptico não foram atingidos pela injeção do corante.

3.4. Injeção de resiniferatoxina no gânglio do trigêmeo – Padronização da técnica de injeção intraganglionar

Antes de iniciar a administração i.g. das drogas utilizadas nos tratamentos realizados neste estudo, a precisão da técnica de injeção executada pelo experimentador foi avaliada. Para isso, utilizou-se como ferramenta farmacológica a resiniferatoxina (RTX). A RTX é um potente agonista ultra-potente de receptores TRPV1 que, quando administrada em altas doses, induz morte de neurônios que expressam esses receptores, mediada pelo aumento de cálcio intracelular, reduzindo assim as respostas nociceptivas causadas pela administração de capsaicina na região orofacial (Kurai *et al.*, 2004). Neste sentido, para avaliar os efeitos neurotóxicos seletivos da injeção i.g. utilizou-se o teste comportamental de "eye-wipes", que consiste na mensuração das respostas nociceptivas induzidas pela aplicação tópica de capsaicina nos olhos dos animais (Diogenes *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2008). Ainda, com a mesma finalidade inicial, realizou-se um outro experimento visando quantificar a concentração de RTX marcada com Trítio (^3H -RTX), presente no GT e ou em estruturas adjacente, após a sua injeção i.g.

3.4.1. Teste comportamental de "eye-wipes" em resposta a aplicação tópica de capsaicina

Neste teste, os animais foram tratados com uma única injeção i.g. de RTX (50 ng/sítio) ou veículo (PBS) no GT direito. No 4º dia após a administração de RTX, os animais receberam administração tópica de capsaicina (0,01%/10 μl) ou veículo (PBS) na córnea do olho ipsilateral à injeção e o número de acessos de limpeza direcionados ao olho tratado foi contado durante 1 minuto. Uma hora após o término do experimento, procedeu-se a avaliação, da mesma forma, do número de acessos de limpeza direcionados ao olho contralateral à injeção de RTX.

3.4.2. Análise da concentração de ^3H -RTX presente no gânglio do trigêmeo e estruturas adjacentes

Para realizar esta análise, cada animal foi previamente tratado com uma injeção i.g. de ^3H -RTX contendo (64 pmoles de RTX e 0,05 pmoles ^3H -RTX/0,5 μl) no GT direito. Cinco minutos após a administração, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e os GTs ipsi e contralateral à injeção, bem como o tronco cerebral foram removidos e transferidos para um frasco contendo 50 μl de PBS. Posteriormente, foram adicionados 3 ml de líquido de cintilação (Optiphase Hisale 3) em cada frasco. Após 24 horas, os frascos foram

posicionados em um aparelho cintilador (LS 6500 - Beckman Coulter) e a quantidade de ^3H -RTX presente em cada amostra foi mensurada.

3.5. Estimulação térmica orofacial por calor

Neste teste, adaptado a partir do método descrito em camundongos por Luiz e colaboradores (2010), os animais foram contidos delicadamente pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante ($\sim 50^\circ$) foi posicionada aproximadamente 1 cm da área de inserção das vibrissas, do lado direito da face. Em seguida, foi registrado a latência em segundos para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas. Foram incluídos nos experimentos apenas os animais que apresentaram respostas entre 9 e 15 s a partir da aplicação do estímulo. Reduções na latência de resposta frente a estimulação por calor foram consideradas como indicativos de hiperalgesia orofacial. Para avaliação do efeito de diferentes tratamentos, após a administração de cada substância, os animais foram estimulados apenas do lado ipsilateral à injeção i.g. em intervalos de 30 ou 60 minutos.

3.6. Constrição do nervo infraorbital

A constrição do nervo infraorbital (CNIO) foi realizada, através do método proposto inicialmente por (Luiz *et al.*, 2010). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50e 10 mg/kg, respectivamente, i.m.) e foi realizada a assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à físsura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas por aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constrito. Ao término da cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (oxitetraciclina, 60 mg/kg, i.m.) e mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia. A avaliação do decurso temporal das alterações de reatividade à estimulação térmica induzidas por CNIO foi realizada estimando-se as latências de resposta ao calor antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e nos dias 2,5 e 10 após a cirurgia.

3.7. Tratamentos

3.7.1. Injeção de ET-1 e Sarafotoxina (S6c) no gânglio do trigêmeo

Neste experimento, diferentes grupos de animais sem manipulação prévia (*naives*), foram tratados com uma única injeção de ET-1 (0,3, 1 e 3 pmol/sítio), sarafotoxina S6c (3; 10 e 30 pmol/sítio) ou PBS no GT direito. Para avaliar a participação dos receptores de endotelinas, ET_A e ET_B, na mediação da hiperalgesia orofacial ao calor induzida por ET-1, cada grupo de animais recebeu uma co-injeção i.g. de ET-1 (3 pmol) junto com BQ-123 ou BQ-788 (0,5 nmol/sítio cada) ou PBS. As respectivas latências de resposta à estimulação por calor foram avaliadas somente do lado ipsilateral à injeção, antes da administração (Tempo 0), aos 30 minutos após e, posteriormente, a cada 1 hora após a injeção (Chichorro, 2006c; Mota *et al.*, 2009).

3.7.2. Injeção de RTX no gânglio do trigêmeo após CNIO

Vinte e quatro horas após a cirurgia de CNIO, diferentes grupos experimentais receberam uma única injeção de RTX (50 ng/sítio) ou veículo (PBS) no GT ipsilateral a cirurgia sob anestesia. As respectivas latências de resposta ao estímulo de calor foram avaliadas antes da cirurgia (basal) enquanto que, a instalação da hiperalgesia ao calor promovida por CNIO foi avaliada somente do lado ipsilateral, no quinto dia após a cirurgia (Kurai *et al.*, 2004; Neubert *et al.*, 2005).

3.7.3. Injeção de BQ-123 ou de BQ-788 no gânglio do trigêmeo após CNIO

No 5^o dia após a cirurgia de CNIO, diferentes grupos experimentais receberam uma única injeção i.g. de BQ-123 ou BQ-188 (0,05 ou 0,5 nmol/sítio cada) ou veículo (PBS) no GT ipsilateral à cirurgia. As latências de resposta frente a aplicação do estímulo de calor, foram avaliadas antes da cirurgia (basal), antes da injeção no 5^o dia (tempo 0) e posteriormente a ela, a cada 30 minutos (Chichorro *et al.*, 2009).

3.7.4. Injeção do antagonista de receptores para IL-1 β , IL-1ra, no gânglio do trigêmeo

Neste experimento, diferentes grupos de animais, sem manipulação prévia, foram tratados com uma única injeção de IL-1ra (300 ng/sítio), ou veículo no GT direito. As respectivas latências de resposta à estimulação por calor foram avaliadas somente do lado ipsilateral à injeção, antes da administração (Tempo 0) e a cada 1 hora

após a injeção (Souza *et al.*, 2013)

3.7.5. Tratamento agudo com Carbamazepina após CNIO

Grupos distintos de animais submetidos à CNIO receberam tratamento sistêmico, por via oral, de Carbamazepina (60 mg/kg) ou de veículo (PBS) no 5^o após a cirurgia. As respostas hiperalgésicas frente a aplicação do estímulo de calor foram avaliadas antes da cirurgia (basal), antes da administração (tempo 0) e posteriormente a cada 1 hora do lado ipsilateral à cirurgia (Luiz, 2011).

3.7.6. Injeção do antagonista de receptores para IL-1 β , IL-1ra, no gânglio do trigêmeo após CNIO

Os diferentes grupos de animais submetidos à CNIO receberam uma injeção de IL-1ra (300 ng) ou de veículo no 5^o após a cirurgia no GT direito. As respostas hiperalgésicas frente a aplicação do estímulo de calor foram avaliadas antes da cirurgia (basal), antes da injeção (tempo 0) e posteriormente a cada 1 hora do lado ipsilateral à cirurgia (Souza *et al.*, 2013).

3.7.7. Tratamentos repetidos com bosentan ou minociclina

Para avaliar os efeitos do tratamento repetido com bosentan (100 mg/kg) ou minociclina (40 mg/kg), diferentes grupos de animais foram tratados por via oral com os respectivos fármacos ou veículo (PBS) 1 hora antes da cirurgia e, posteriormente, uma vez ao dia, do 1^o ao 4^o dia após CNIO. As respectivas latências de resposta à aplicação do estímulo de calor foram avaliadas antes da cirurgia (basal) e o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor promovido por CNIO foi avaliado uma única vez ao dia e apenas no dia 2 (antes da administração daquele dia) e no dia 5 (24 horas após a última administração) após a cirurgia. Alternativamente, outros grupos de animais submetidos a CNIO receberam tratamentos repetidos com bosentan (100 mg/kg), minociclina (40 mg/kg) ou veículo (PBS) no 5^o após a cirurgia e, posteriormente, uma vez ao dia nos dias 6, 7. As latências de respostas à aplicação do estímulo de calor foram avaliadas antes da cirurgia, no dia 2, nos dias 5, 6 e 7, antes do tratamento e a cada dia subsequente até o dia 10 (Donate *et al.*, 2012; Raghavendra *et al.*, 2003).

3.8. Análise dos níveis de ativação de células satélites gliai no gânglio do trigêmeo após CNIO

Os níveis de ativação das CSG presentes no GT foram analisados através da quantificação da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) encontrada no GT dos animais no 5^o e 10^o dia após CNIO, através da realização da técnica de imunofluorescência.

3.8.1. Coleta dos gânglios trigeminais após CNIO

Os GTs de animais falso-operados ou constrictos foram coletados no 5^o ou 10^o dia após CNIO. No mesmo período, porém em um bloco diferente de experimentos, os GTs de animais submetidos à CNIO e tratados com uma injeção i.g. de BQ-788 (0,5 nmol), Fluorocitrato (300 pmol) ou veículo (PBS) foram retirados 3 horas após a administração (Souza *et al.* 2013). Em uma outra série de experimentos, os GTs de animais constrictos que receberam tratamentos repetidos com Bosentan (100 mg/kg; v.o.) ou Minociclina (40 mg/kg; v.o.) ou veículo (uma vez ao dia, do 5^o ao 7^o dia após a CNIO) foram coletados 24 horas após o último tratamento, no 8^o dia após a CNIO.

3.8.2. Técnica de imunofluorescência

Antes da coleta dos GTs, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca sob anestesia com hidrato de cloral 1%. O procedimento de perfusão foi realizado com salina 0,9% seguido de paraformaldeído 4% (PFA) tamponado com PBS. Em seguida foi realizada cirurgia para extração dos GTs, os quais, uma vez removidos, foram armazenados em solução de PFA 4% em geladeira por, aproximadamente, 2 horas. Logo após, a solução PFA foi trocada por soluções de sacarose 10, 20 e 30%, sendo que os GTs permaneceram em cada solução de sacarose até a sedimentação, sempre armazenado sem geladeira. Posteriormente, os tecidos foram congelados em Tissue Tek e cortados em criostato para fornecer seções de 12 µm de espessura. As lâminas foram lavadas com PBS (1 ml) por 3 vezes. Em seguida, realizou-se o bloqueio e permeabilização com PBS+ soro de cavalo 5% e Triton X100 à 2% por 2 horas. O anticorpo primário (anti – GFAP, 1:300) foi incubado "overnight" em geladeira em PBS contendo soro de cavalo 1% e Triton X100 0,5%. Sequencialmente, as lâminas foram novamente lavadas com PBS (1 ml) por 3 vezes. Logo após, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488) em PBS contendo 1% de soro de cavalo em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida as lâminas foram

lavadas, para retirar o excesso de anticorpo secundário, por mais 3 vezes com PBS(1 ml). Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem (CC/Mount – Sigma Aldrich, MO, USA). As imagens de marcação com o anticorpo secundário conjugado a Alexa 488 foram capturadas em microscópio confocal de varredura (modelo SP5 Leica Microsystems). A expressão de GFAP foi quantificada através das médias da intensidade de fluorescência das imagens obtidas, 5 imagens por gânglio, utilizando-se usando o software de domínio público Image J. Foram quantificadas 2 seções de cada gânglio (N= 3 a 5 gânglios por grupo).

3.9. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Graph Pad Prism 6.0[®]. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão das médias de 8 a 10 animais por grupo para os estudos comportamentais, ou grupos de 3-5 animais nos estudos de imunohistoquímica. Os dados obtidos nos experimentos foram analisados com testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) uma via ou ANOVAd e duas vias ou ANOVA de medidas repetidas seguidas do teste *post-hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student para amostras não pareadas. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As imagens obtidas por microscopia foram quantificadas usando o software de domínio público Image J.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da técnica de injeção no gânglio do trigêmeo através da administração de resiniferatoxina

A injeção prévia de RTX no GT preveniu a manifestação do comportamento nociceptivo evocado, 4 dias depois, pela aplicação tópica de capsaicina no olho ipsilateral à injeção. Como mostra a figura 3A, quando comparado ao grupo controle tratado com veículo, o grupo de animais que recebeu a injeção i.g. de RTX (50 ng/0,5 μ l) apresentou uma redução significativa de 93 % no número de acessos de limpeza direcionados ao olho ipsilateral à injeção. Ainda, a injeção de RTX no GT mostrou ter afetado a sensibilidade nociceptiva apenas do lado ipsilateral à injeção, uma vez que não houve diferença significativa no número de acessos de limpeza direcionados ao olho contralateral à injeção, entre os grupos tratados com veículo ou com RTX. Isto sugere que a RTX injetada no GT direito não atingiu estruturas mais distantes daquele gânglio. Este fato pode ser confirmado pelos resultados observados na figura 3B, a qual demonstra que a maior parte da ^3H -RTX (marcada com o isótopo radioativo) ficou restrita ao GT ipsilateral à injeção não atingindo o GT contralateral e o troncocerebral.

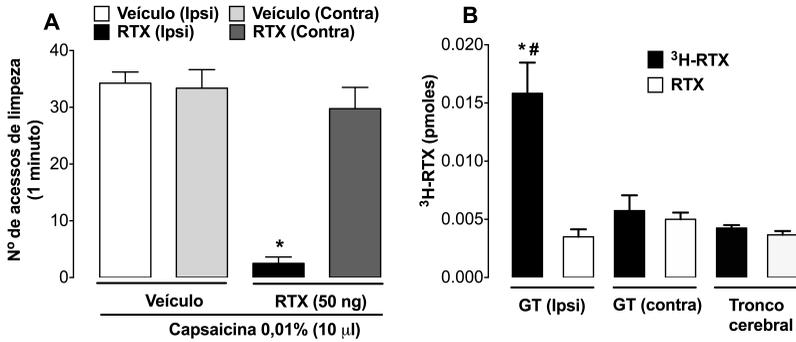


Figura 3: Efeitos da administração de RTX no gânglio trigeminal de camundongos. Os animais foram tratados uma única injeção i.g. de RTX (64 pmoles) mais $^3\text{H-RTX}$ (0,05 pmoles/0,5 μ l) ou apenas RTX (64 pmoles/0,5 μ l) no GT direito. Após 5 min, os GTs e o tronco cerebral foram coletados e as amostras processadas para análise em um cintilador, o que ocorreu 24 horas depois. Os valores representam a média \pm e.p.m. da concentração de $^3\text{H-RTX}$ estimada (n= 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquillas denotam $P < 0,05$ em relação as quantidades de RTX ou $^3\text{H-RTX}$ mensuradas no GT contralateral à injeção e tronco cerebral (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

4.2. Caracterização das respostas nociceptivas induzidas pela estimulação da face por calor após injeção de ET-1 e sarafotoxina S6c no gânglio do trigêmeo

A injeção de ET-1 (1 e 3 pmol) no GT induziu o desenvolvimento de hiperalgesia à aplicação do calor na região orofacial que foi significativo nos primeiros 30 minutos e persistiu por até 4 horas após a administração do peptídeo (Figura 4). Por outro lado, a injeção de sarafotoxina S6c induziu hiperalgesia orofacial em doses um pouco maiores (10 e 30 pmol), a qual foi significativa entre 1 e 2 horas após a sua injeção (Figura 5).

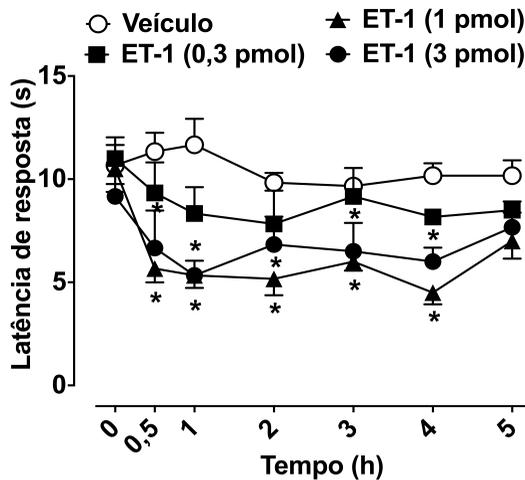


Figura 4: Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor após a injeção i.g. de ET-1 em camundongos sem tratamento prévio. Os animais receberam uma injeção de ET-1 (0,3; 1 e 3 pmol/0,5 μ l) ou veículo (PBS) no gânglio trigeminal direito e foram submetidos à estimulação térmica antes (tempo 0) e nos tempos indicados após os tratamentos. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante à aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação aos animais tratados com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

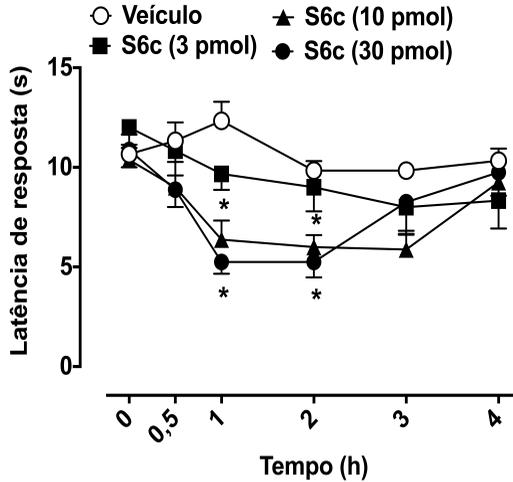


Figura 5: Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor após a injeção i.g. sarafotoxina S6c em camundongos sem tratamento prévio. Os animais receberam uma injeção de sarafotoxina Sc6 (3; 10; 30 pmol/0,5 μ l) ou veículo (PBS) no gânglio trigeminal direito e foram submetidos a estimulação térmica antes (tempo 0) e nos tempos indicados após os tratamentos. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação aos animais tratados com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

4.3. Influência do tratamento com antagonistas de receptores para endotelinas ET_A e ET_B na hiperalgesia ao calor causada pela injeção de ET-1 no gânglio do trigêmeo

A co-injeção i.g. do antagonista peptídico seletivo para receptores ET_A , BQ-123 (0,5 nmol) com ET-1 (3 pmol) reduziu a hiperalgesia induzida por ET-1 de 30 minutos até 2 horas após a administração, enquanto que a co-injeção de ET-1 (3 pmol) com o antagonista peptídico seletivo para receptores ET_B BQ-788 (0,5 nmol) promoveu redução significativa dos efeitos hiperalgésicos induzidos por ET-1 entre 1 e 2 horas após a injeção (Figura 6).

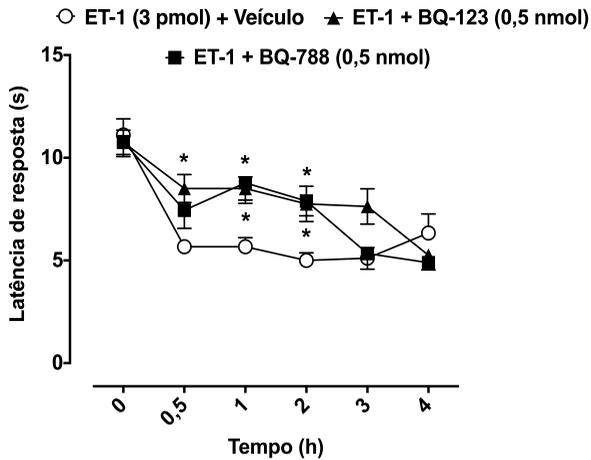


Figura 6: Efeitos da co-injeção i.g. dos antagonistas peptídicos seletivos de receptores ET_A e ET_B para endotelinas na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1. Os animais receberam uma co-injeção de ET-1 (3 pmol) com BQ-123 ou BQ-178 (0,5 nmol cada) ou veículo (PBS) no gânglio trigeminal direito e foram submetidos à estimulação térmica antes (tempo 0) e nos intervalos de tempo indicados após o tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça ($n= 8$ a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P<0,05$ em relação aos animais tratados com ET-1+veículo (ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

4.4. Participação dos receptores NMDA para glutamato na hiperalgesia térmica induzida pela injeção de ET-1 no gânglio do trigêmeo

A co-injeção do antagonista competitivo de receptores NMDA para glutamato, D-AP5 (24 nmol) juntamente com ET-1 (3 pmol) no GT inibiu o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida pelo peptídeo a partir de 30 minutos e por até 2 horas após a administração (Figura 7). Esses resultados indicam o envolvimento do glutamato nos mecanismos celulares necessários para a ação hiperalgéica da ET-1 no GT.

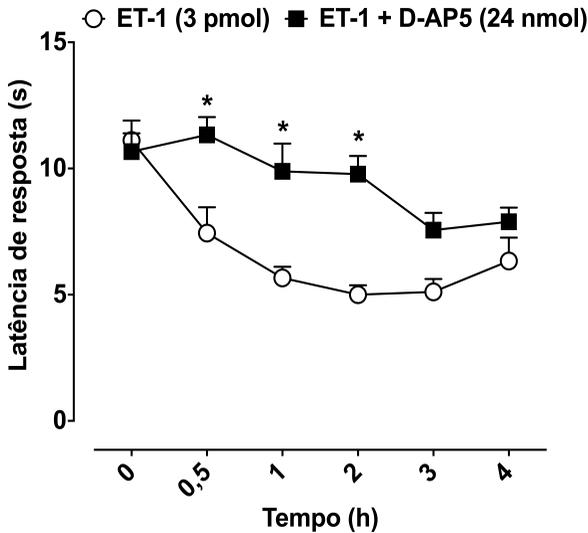


Figura 7: Efeitos da injeção i.g. do antagonista de receptores NMDA para glutamato na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1. Os animais receberam uma co-injeção de ET-1 (3 pmol) com D-AP5 (24nmol) ou veículo (PBS) no gânglio trigeminal direito e foram submetidos à estimulação térmica antes (tempo 0) e nos intervalos de tempo indicados após o tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante à aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça ($n= 8$ a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P<0,05$ em relação aos animais tratados com veículo (ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

4.5. Decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital

A constrição do nervo infraorbital (CNIO) causou reduções significativas nas latências de resposta frente a aplicação do estímulo de calor no lado ipsilateral à cirurgia. O desenvolvimento das respostas hiperalérgicas já foi eficiente no 2º dia após a cirurgia e as mesmas persistiram pelo menos até o 10º dia (Figura 8).

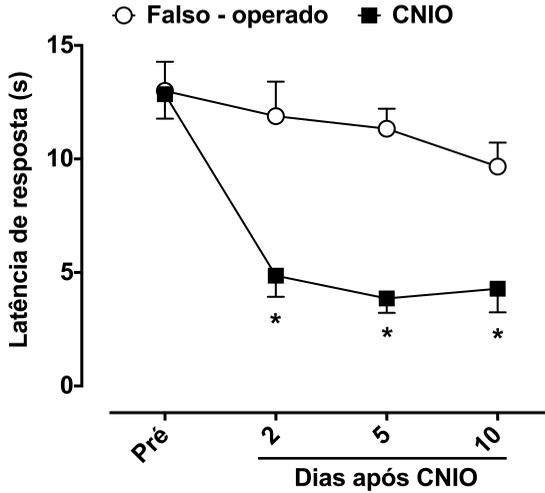


Figura 8: Decurso temporal da hiperalgesia térmica em animais submetidos à CNIO. As respostas dos animais dos grupos constricto e falso-operado à estimulação térmica foram avaliadas antes (pré) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o nervo não foi constricto. O gráfico mostra o decurso temporal da hiperalgesia frente a aplicação do calor no lado ipsilateral à cirurgia. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça ($n= 8 - 10$ animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

4.6. Participação das fibras aferentes primárias trigeminais que expressam receptores TRPV1 no desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO

Existem evidências de que as fibras aferentes primárias que expressam receptores TRPV1 desempenham um importante papel na via de transmissão de informação nociceptiva originadas por estímulos térmicos nocivos (Urano *et al.*, 2012; Zakir *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2014). Em vista disso, avaliou-se o envolvimento dessas fibras no desenvolvimento da hiperalgesia orofacial ao calor induzida pela CNIO através da injeção i.g. de RTX (50 ng/ 0,5 µl) no GT de animais constrictos. Como mostra a figura 9, a injeção da toxina 24 horas após CNIO impediu o estabelecimento da hiperalgesia ao calor nos animais constrictos no 5^o dia após a cirurgia, tornando as respostas deste grupo semelhantes àquelas observadas no grupo de animais falso-operados. Por outro lado, o grupo de animais constrictos tratados com veículo desenvolveu normalmente respostas hiperalgésicas ao calor no mesmo período avaliado.

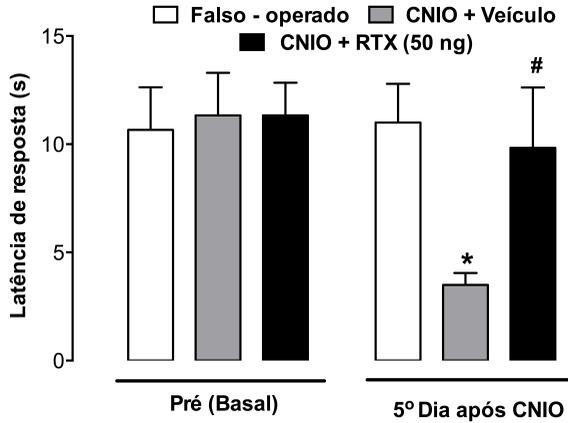


Figura 9: Influência da injeção i.g. de RTX na instalação da hiperalgesia orofacial ao calor induzida pela CNIO. Os animais foram tratados com uma injeção de RTX (50 ng/ 0,5 μ l) ou veículo (PBS) no gânglio trigeminal direito e foram submetidos a estimulação térmica antes (basal) e no 5º dia após a cirurgia. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação aos animais falso-operados ou tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

4.7. Influência do tratamento agudo com carbamazepina na hiperalgesia ao calor induzida por CNIO

A administração oral do anticonvulsivante carbamazepina (60 mg/kg), um bloqueador de canais de sódio, reduziu significativamente a hiperalgesia ao calor induzida por CNIO no 5º dia após a cirurgia. Como mostra a figura 10, o efeito anti-hiperalgésico do tratamento foi observado a partir de 1 hora após a administração e persistiu até a 4ª hora depois.

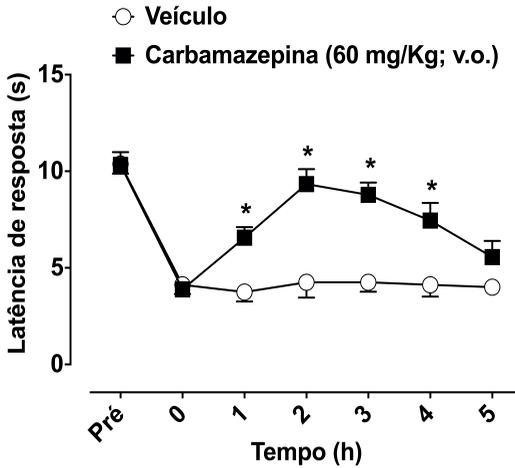


Figura 10. Efeitos do tratamento agudo com carbamazepina nas respostas hiperalgésicas ao calor induzidas por CNIO. No 5º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com carbamazepina (60mg/kg; v.o.) ou veículo (PBS) e foram submetidos a estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes da administração (tempo 0) e em intervalos de 1 hora após o tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni).

4.8. Influência do injeção dos antagonistas de receptores ET_A e ET_B para endotelinas no gânglio trigeminal na hiperalgesia térmica causada por CNIO

Conforme mostra a figura 11 o bloqueio dos receptores ET_A por BQ-123, no 5^o dia após CNIO, promoveu um efeito anti-hiperalgésico mais pronunciado na dose de 0,5 nmol, que inibiu as respostas hiperalgésicas entre 30 minutos e 3 horas após o tratamento. Já o bloqueio dos receptores ET_B pela injeção de BQ-788 causou efeito mais prolongado na mesma dose, reduzindo as respostas hiperalgésicas promovidas por CNIO por até 4 horas após sua administração, enquanto que a dose de (0,05 nmol), só foi efetiva entre 90 minutos e 3h30 minutos após a injeção (Figura 12). Por outro lado, o antagonista não peptídico seletivo para receptores ET_B, IRL 2500, mostrou-se menos efetivo em promover efeitos anti-hiperalgésicos na dose de 0,5 nmol, uma vez que o respectivo tratamento só reduziu a hiperalgesia ao calor na primeira hora após a injeção. Por outro lado a dose de (5 nmol) foi capaz de diminuir a hiperalgesia induzida por CNIO entre 30 minutos e 2 horas após a injeção (Figura 13).

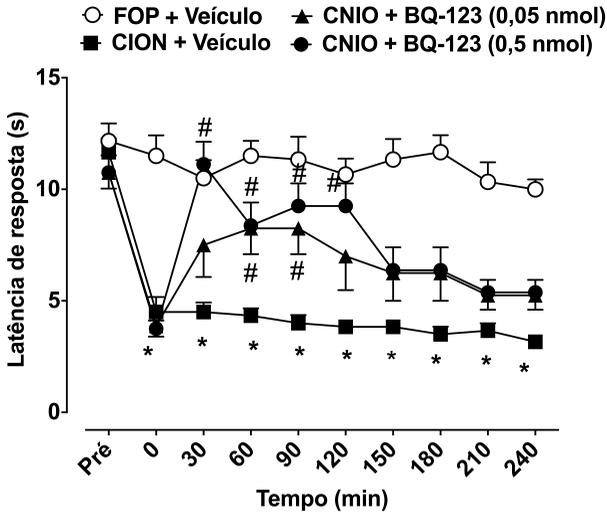


Figura 11: Efeito da injeção i.g. do antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A , BQ-123, para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO. No 5º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com BQ-123 (0,05 ou 0,5 nmol/ 0,5 μ l) e submetidos a estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes da injeção (tempo 0) e nos intervalos de tempo indicados. Animais dos grupos controle constricto e falso-operado (FOP) foram tratados com veículo. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos falso-operado (FOP) e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

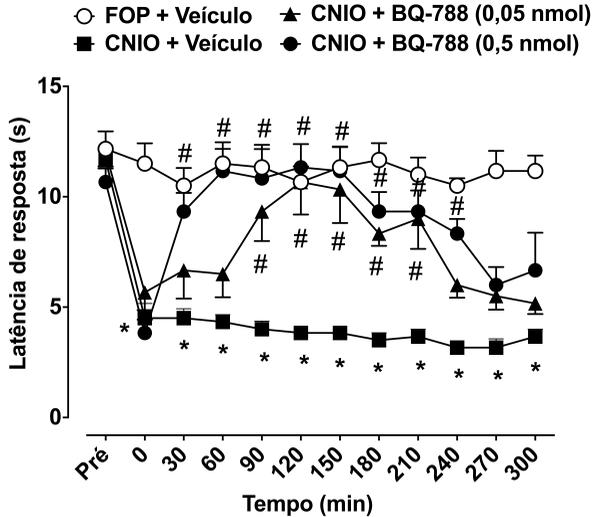


Figura 12: Efeito da injeção i.g. do antagonista peptídico seletivos de receptores ET_B , BQ-788 para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO. No 5º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com BQ-788 (0,05 ou 0,5 nmol/ 0,5 μ l) e submetidos à estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes da injeção (tempo 0) e nos intervalos de tempo indicados. Animais dos grupos controle constricto e falso-operado (FOP) foram tratados com veículo. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante à aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça ($n= 8$ a 10 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam $P<0,05$ em relação aos grupos falso-operado (FOP) e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

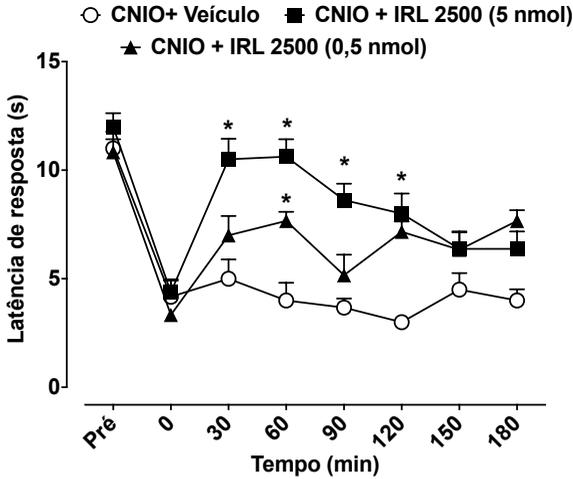


Figura 13: Efeito da injeção i.g. do antagonista seletivo não peptídico de receptores ET_B , IRL-2500 para endotelinas na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO. No 5º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com IRL-2500 (0,5 ou 5 nmol/0,5 μ l) e submetidos a estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes da injeção (tempo 0) e nos intervalos de tempo indicados. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça ($n= 8$ a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos constricto tratados com veículo (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

4.9 Efeitos da injeção no gânglio trigeminal do antagonista de receptores para Interleucina-1 (IL-1ra) na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1 e CNIO

A co-injeção i.g. de IL-1ra (300 ng), um antagonista seletivo de receptores para IL-1 β , juntamente com ET-1 (3 pmol) reduziu a hiperalgesia ao calor promovida pelo peptídeo a partir da 1^a hora, mantendo seu efeito até a 3^a hora após a administração (Figura 14). O efeito anti-hiperalgésico do antagonista de IL-1 β também foi observado no tratamento dos animais submetidos à CNIO. No 5^o dia após a cirurgia, os animais que receberam uma única injeção i.g. de IL-1ra (300ng) tiveram suas latências de resposta aumentadas quando comparados ao grupo tratado com veículo, por até 2 horas após a injeção (Figura 15).

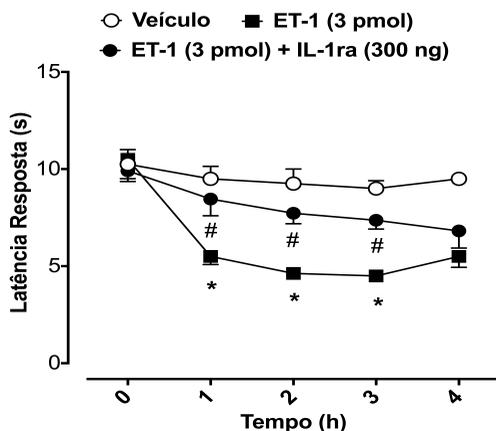


Figura 14: Efeito da injeção i.g. do IL-1ra, um antagonista de receptores para IL-1 β , na hiperalgesia ao calor induzida por ET-1. Os animais receberam uma co-injeção de ET-1 (3 pmol) com IL-1ra (300 ng) ou veículo no gânglio trigeminal direito e foram submetidos a estimulação térmica antes (tempo 0) e em intervalos de 1 hora após os tratamentos. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Os asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos tratados com veículo para IL-1ra ou ET-1+veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni).

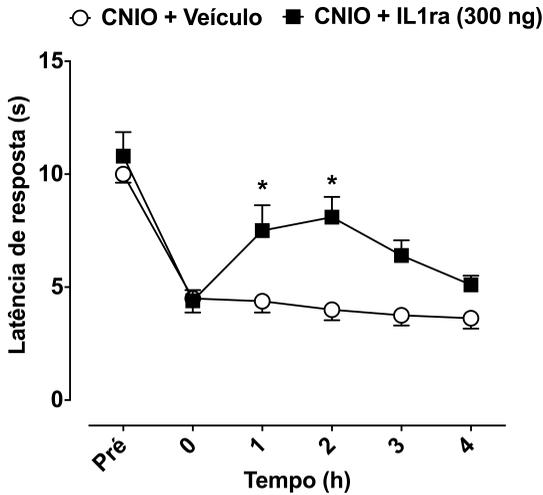


Figura 15: Efeito da injeção i.g. do IL-1ra, um antagonista de receptores para IL-1 β , na hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO. No 5º dia após CNIO, os animais foram tratados com uma única injeção i.g. de IL-1ra (300 ng) ou veículo e foram submetidos a estimulação térmica antes da cirurgia (pré), antes da injeção (tempo 0) e em intervalos de 1 hora após o tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8 a 10 animais por grupo). Os asteriscos indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo constricto tratado com veículo (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni).

4.10. Influência da CNIO no nível de ativação das células satélites gliais no gânglio do trigêmeo

O nível de ativação de células satélites gliais (CSG) foi avaliado através da quantificação dos níveis de expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) encontrados no GT. Como mostra a figura 16 e 17 a CNIO promoveu um aumento significativo na expressão de GFAP no GT de animais constrictos de 61,5% e 61% no 5º dia após a cirurgia, quando comparados ao grupo falso-operado. Estes resultados indicam que a CNIO é capaz de aumentar o níveis de ativação das CSG localizadas no GT.

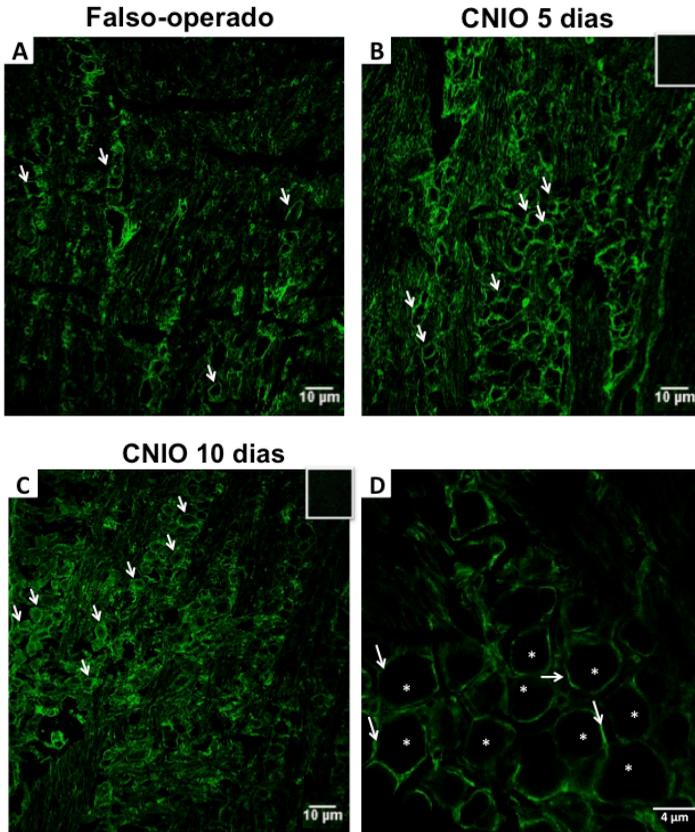


Figura 16: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a CNIO. Os painéis **A**, **B** e **C** mostram células imunoreativas para GFAP (setas) em gânglios de animais falso-operado e constrictos no 5º dia e 10º dia após a cirurgia, respectivamente. O **painel D** mostra uma imagem, em maior aumento, dos corpos celulares de neurônios do gânglio trigeminal (asteriscos) envolvidos por células imunorreativas para GFAP (setas). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (aumento 20 X, escala 10 μm). Em B e D as inserções nos cantos superiores direitos dos painéis B e D mostram as imagens relativas à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. O software Image J foi utilizado para quantificação.

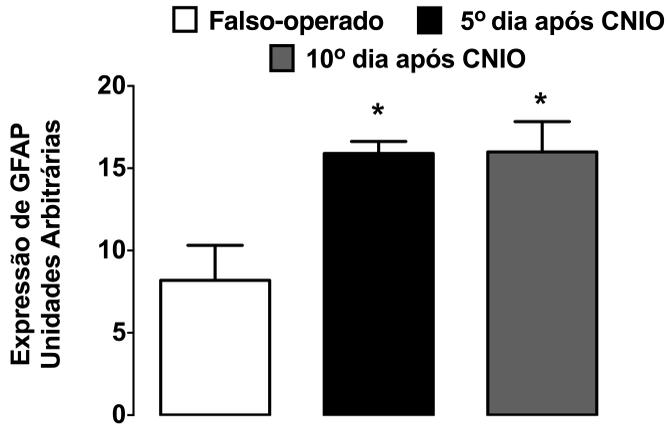


Figura 17: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO. O gráfico mostra os níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo no 5º e 10º dia após CNIO. Os valores representam média \pm e.p.m. da intensidade total de fluorescência observada em cada gânglio (3 a 5 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos falso-operado (ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni).

4.11. Efeitos da injeção intraganglionar de BQ-788 na ativação de células satélites gliais no gânglio do trigêmeo induzida por CNIO

A injeção i.g. de BQ-788 (0,5 nmol) no 5^o dia após CNIO não promoveu alterações significativas no nível de expressão de GFAP no GT dos animais submetidos a cirurgia, quando comparado ao grupo tratado com o veículo correspondente (Figura 18 e 19).

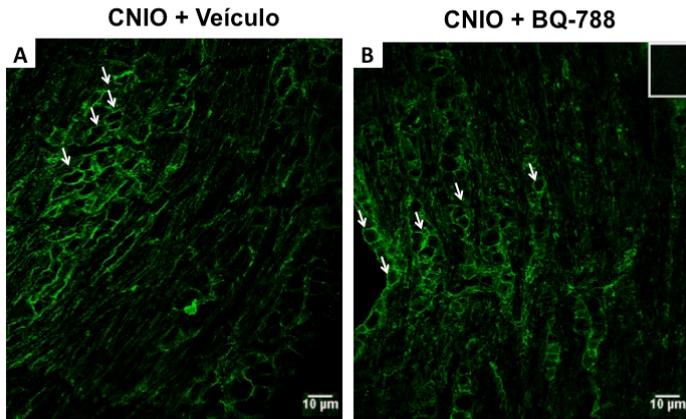


Figura 18: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção i.g. de BQ-788 em animais submetidos 5 dias antes a CNIO. Os painéis A e B mostram células imunorreativas para GFAP após o tratamento com veículo e BQ-788, respectivamente. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (aumento 20 X, escala 10 µm). A inserção no canto superior direito do painel B mostra a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. O software Image J foi utilizado para quantificação.

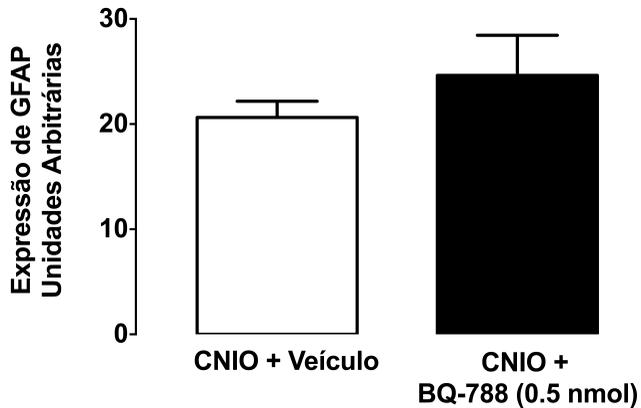


Figura 19: Níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção i.g. de BQ-788 em animais submetidos 5 dias antes a CNIO. O gráfico mostra os níveis da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo de animais constrictos, 3 horas depois da injeção i.g. de BQ-788 (0,5 nmol/0,5 μ l) ou veículo (5º dia após CNIO). Os valores representam média \pm e.p.m. da intensidade total de fluorescência observada em cada gânglio (3 a 5 animais por grupo) (teste t de Student para amostras não pareadas).

4.12. Influência da injeção intraganglionar de fluorocitrato no aumento da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo induzida por CNIO

Neste experimento, o fluorocitrato (300 pmol) foi utilizado como um controle positivo de inibição de CSG. Conforme mostram as figura 20 e 21, a injeção i.g. da droga no 5^o após CNIO foi capaz de reduzir em até 33% a expressão de GFAP no GT dos animais submetidos a cirurgia de constrição, quando comparado ao grupo tratado com o veículo.

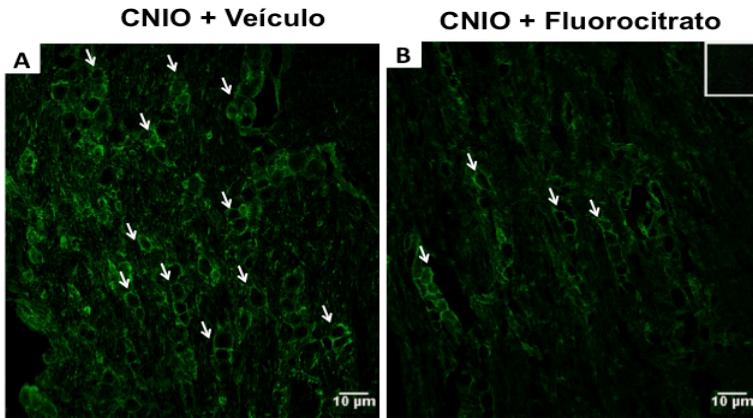


Figura 20: Expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção a i.g. de fluorocitrato em animais submetidos 5 dias antes a CNIO. Os painéis A e B mostram células imunorreativas para GFAP após o tratamento com veículo e fluorocitrato, respectivamente. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (aumento 20 X, escala 10 µm). A inserção no canto superior direito do painel B mostra a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. O software Image J foi utilizado para quantificação.

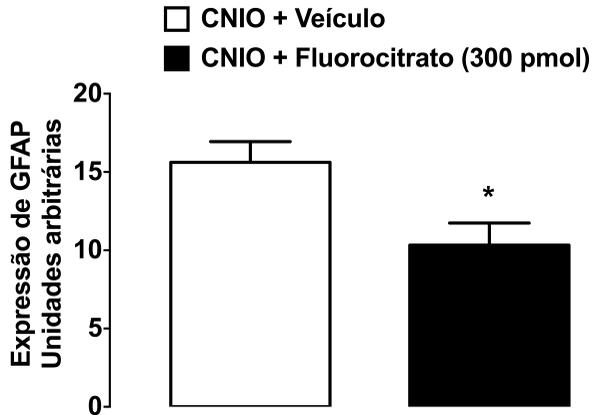


Figura 21: Níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após a injeção a i.g. de fluorocitrato em animais submetidos 5 dias antes a CNIO. O gráfico mostra os níveis da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo de animais constrictos, 3 horas depois da injeção i.g. de fluorocitrato (300 pmol/0,5 μ l) ou veículo no 5º dia após CNIO. Os valores representam média \pm e.p.m. da intensidade total de fluorescência observada em cada gânglio (3 a 5 animais por grupo). O asterisco denota $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo (teste t de Student para amostras não pareadas).

4.13. Efeitos do tratamento repetido com bosentan no desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO

A administração repetida diária de bosentan (100 mg/kg, v.o.) começando 1 hora antes e nos dias 1, 2, 3 e 4 após a CNIO, preveniu a instalação da hiperalgesia à estimulação térmica nos 2^o e 5^o dia após a cirurgia (Figura 22). Da mesma forma, administrações diárias repetidas de bosentan (100 mg/kg, v.o.) no 5^o, 6^o e 7^o dia após a CNIO reduziram significativamente a hiperalgesia ao calor por até 48 horas após a última administração (Figura 23).

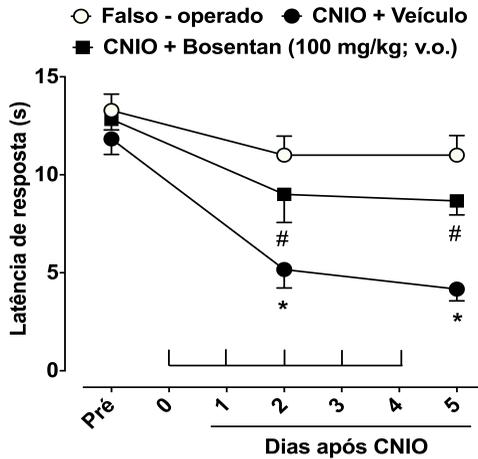


Figura 22: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan na instalação da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO. Os animais foram tratados com bosentan (100 mg/kg; v.o.), ou veículo correspondente 1 hora antes da cirurgia e uma vez ao dia nos dia 1, 2,3 e 4 após CNIO. Foram submetidos a estimulação térmica antes da cirurgia (pré) e no 2^o e 5^o dia após CNIO. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante à aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8-10 animais por grupo). As barras pretas indicam os dias em que os tratamentos foram realizados. Asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos falso- operado e CNIO tratado com veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

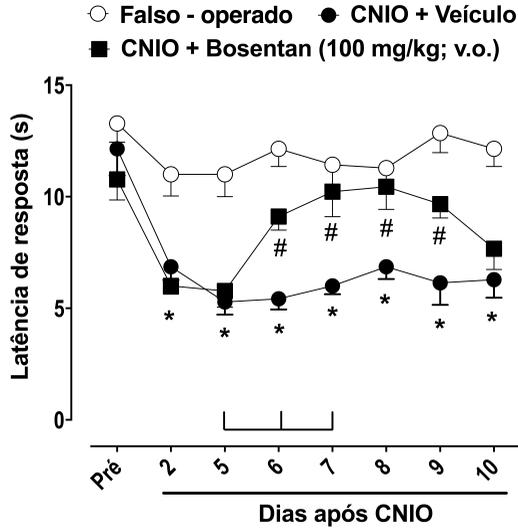


Figura 23: Efeitos do tratamento repetido com bosentan na manutenção da hiperalgesia ao calor induzida por CNIO. Os animais foram tratados com Bosentan (100 mg/kg; v.o.), ou o veículo correspondente uma vez ao dia do 5º ao 7º dia pós CNIO. Foram submetidos a estimulação térmica em intervalos de 24 horas após os tratamentos até o 10º dia após CNIO. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante a aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8-10 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam $P < 0,05$ em relação aos grupos falso-operado e CNIO tratado com veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

4.14. Efeitos do tratamento repetido com bosentan ou minociclina sobre a hiperalgesia ao calor e o aumento da expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo induzidos por CNIO

Como pode ser observado na figura 24, a administração repetida de bosentan (100 mg/kg; v.o.) ou do conhecido inibidor de ativação glial minociclina (40 mg/kg; i.p.) no 5º, 6º e 7º dia após CNIO reduziu de forma significativa a hiperalgesia ao calor causada por CNIO por até 24 horas após a última administração. No entanto, nenhum dos tratamentos modificou a expressão de GFAP no GT no 8º dia após CNIO (24 horas após o último tratamento) (Figuras 25 e 26) .

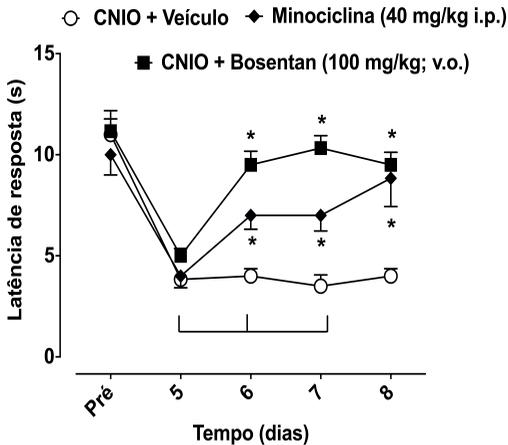


Figura 24: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina na hiperalgesia ao calor induzida por CNIO. Os animais foram tratados com bosentan (100 mg/kg; v.o.), minociclina (40 mg/kg; i.p.) ou veículo correspondente do 5º ao 7º dia após CNIO. Foram submetidos à estimulação térmica antes da cirurgia (pré) e em intervalos de 24 horas após os tratamentos até o 8º dia após CNIO. As barras indicam os dias em que foram realizados os tratamentos com Bosentan e Minociclina. Os valores representam média \pm e.p.m. da latência de resposta ante à aplicação do calor para induzir comportamentos de retirada da cabeça (n= 8-10 animais por grupo). Asteriscos denotam $P < 0,05$ em relação ao grupo CNIO tratado com veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

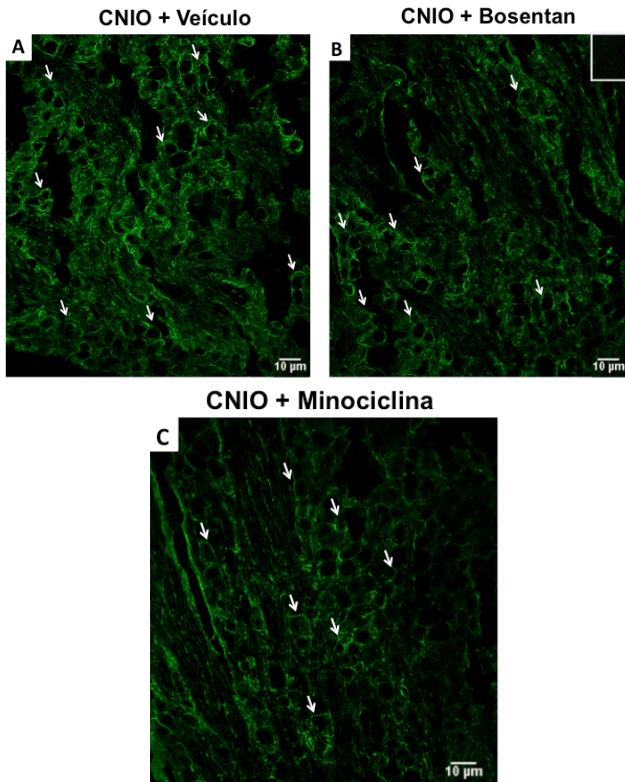


Figura 25: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina na expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO. No 8º dia após CNIO, os gânglios do trigêmeo dos animais tratados com bosentan, minociclina ou veículo foram removidos e processados para imunofluorescência e os níveis da expressão de GFAP mensurados. Os painéis (A, B e C) mostram células imunorreativas para GFAP após os tratamentos. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (aumento 20 X, escala 10 μm). O software Image J foi utilizado para quantificação. A inserção no canto superior direito do painéis B mostra imagen relativas à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação.

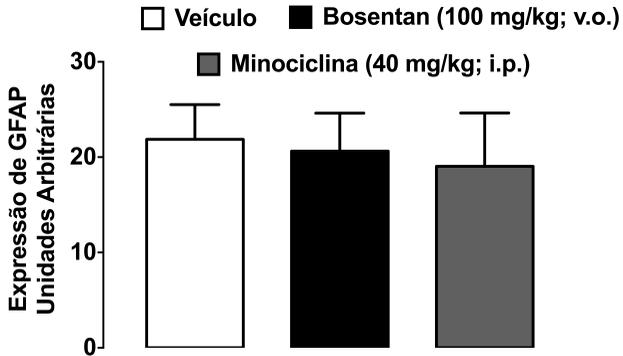


Figura 26: Efeitos dos tratamentos repetidos com bosentan e minociclina nos níveis de expressão de GFAP no gânglio do trigêmeo após CNIO. No 8º dia após CNIO, os gânglios do trigêmeo dos animais tratados com bosentan, minociclina ou veículo foram removidos e processados para imunofluorescência e os níveis da expressão de GFAP mensurados. Os valores representam média \pm e.p.m. da intensidade total de fluorescência observada em cada gânglio (3 a 5 animais por grupo).

5. DISCUSSÃO

5.1. A resiniferatoxina como ferramenta farmacológica na padronização da técnica de injeção no gânglio do trigêmeo

A administração de substâncias diretamente nos gânglios sensoriais, sejam GRD ou GT, constitui uma ferramenta experimental extremamente útil quando se deseja caracterizar a participação de proteínas, neurotransmissores e ou mediadores inflamatórios, expressos, produzidos ou liberados por células que compõe esta região, em respostas comportamentais ou mecanismos nociceptivos associados a modelos animais de dor neuropática. Protocolos que envolvem técnicas cirúrgicas foram os primeiros a serem testados e utilizados para este fim. Porém, apesar de sua funcionalidade, a aprendizagem da técnica do procedimento cirúrgico geralmente é difícil e a recuperação dos animais nem sempre é satisfatória. Além disso, a necessidade de anestesia geral limita ou impede a avaliação precisa das respostas nociceptivas comportamentais à administração aguda de substâncias nestas regiões (Zhou *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Obata *et al.*, 2004).

Neste sentido, o desenvolvimento de protocolos experimentais que utilizam estruturas anatômicas superficiais, como vias de acesso aos gânglios sensoriais, permitiram o estudo aprofundado da participação destas estruturas nos mecanismos nociceptivos responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção das dores neuropáticas (Ferrari *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2013). Desta forma, para avaliar os efeitos da ET-1 exógena e de seus antagonistas em células do GT, utilizou-se um modelo de injeção i.g., via forame infraorbital, previamente descrito em ratos por Neuber e colaboradores (2005). Esta técnica utiliza uma via direta, o canal infraorbital e o forame rotundo, para administrar substâncias diretamente no GT sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Além disso, permite a avaliação de respostas comportamentais logo após o término da injeção, uma vez que a realização da técnica requer apenas uma anestesia inalatória de curta duração.

Neste estudo, um ultra potente agonista de receptores TRPV1, a RTX, foi utilizada como ferramenta farmacológica para demonstrar a precisão da administração de determinadas substâncias no GT. A toxina é utilizada principalmente para o estudo da contribuição das vias sensíveis à capsaicina no desenvolvimento de respostas nociceptivas. A administração de altas doses do agonista, em animais neonatos ou adultos, leva à destruição dos neurônios de pequeno a médio diâmetro

que expressam receptores TRPV1, através do influxo maciço de íons cálcio para o interior destas células, o que promove efeito citotóxico pronunciado (Holzer, 1991; Hiura, 2000).

O estudo realizado por Karai e colaboradores (2004) demonstrou que a injeção unilateral de RTX (20 ou 200 ng) no GT de ratos, através de cirurgia estereotáxica, foi capaz de reduzir por até um ano após a administração o número de acessos de limpeza em resposta à aplicação tópica de capsaicina no olho ipsilateral à injeção. Este efeito, ocorreu devido à deleção permanente de aproximadamente 80% dos neurônios TRPV1 positivos do GT. Corroborando estes achados, nossos dados mostraram que a injeção de RTX (50 ng) no GT aboliu a resposta nociceptiva ocular de camundongos à capsaicina, somente no lado ipsilateral à injeção, sugerindo que a RTX injetada ficou restrita ao gânglio ipsilateral, não atingindo estruturas adjacentes a ele.

Estes resultados tornam-se ainda mais consistentes quando comparados com os dados obtidos após a administração de ³H-RTX no GT. Os resultados deste experimento mostraram que, após a injeção i.g. a toxina marcada ficou, essencialmente retida no gânglio ipsilateral à injeção, não atingindo outras estruturas adjacentes analisadas, como o tronco cerebral e o GT contralateral. Assim, somados, estes dados demonstram a precisão na execução da técnica de injeção no GT via forame infraorbital, bem como a seletividade do método escolhido, para a administração localizada de fármacos nessa estrutura.

5.2. A hiperalgesia orofacial ao calor após a constrição do nervo infraorbital

A CNIO foi proposta como um modelo para o estudo da dor associada à neuralgia do trigêmeo, sendo originalmente padronizada em ratos por Vos e Maciewicz (1991). Mais adiante, em 1994, foi demonstrado que animais submetidos a este procedimento apresentavam aumento do tempo de comportamento de grooming facial espontâneo do 1º ao 15º dia após a cirurgia, seguido de hiperalgesia mecânica bilateral, a qual foi persistente por pelo menos 130 dias (Vos *et al.*, 1994).

Em 1997, Imamura e colaboradores demonstraram que a CNIO de ratos induzia hiperalgesia orofacial bilateral ao calor, a qual foi mais proeminente do lado operado e persistiu por até 12 dias após a cirurgia. Por outro lado, no estudo realizado por Chichorro e colaboradores (2009) a CNIO promoveu hiperalgesia orofacial ao calor somente do lado operado, porém com decurso temporal e intensidade de resposta semelhantes àquelas observadas por Imamura *et al.*, (1997).

Um pouco mais tarde, Luiz e colaboradores (2010) padronizaram a cirurgia de CNIO em camundongos com o intuito de avaliar a participação das cininas na neuralgia do trigêmeo. O estudo observou que os animais submetidos à CNIO desenvolviam hiperalgesia a estímulos térmicos de calor a partir do 2º dia após a cirurgia, que persistia até o 17º dia, e manifestava-se apenas do lado operado. Diferentemente dos resultados de Imamura e colaboradores (1997), mas corroborando os achados de Luiz *et. al.*, (2010) e Chichorro *et al.*, (2009), nossos dados mostram o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor apenas no lado operado. Ainda que o presente estudo tenha evidenciado um decurso temporal um pouco mais curto, que se apresentou do 2º ao 10º dia após a CNIO, a intensidade das respostas da hiperalgesia ao calor obtidas neste período são semelhantes àquelas observadas nos estudos citados anteriormente.

Como mencionado na Introdução, os receptores TRPV1 parecem mediar a hiperalgesia orofacial ao calor induzida por um modelo de neuralgia trigeminal (Urano *et al.*, 2012). Além disso, o estudo realizado por Chichorro e colaboradores (2014) demonstrou que a injeção de RTX no gânglio do trigêmeo, através de cirurgia extereotóxica em ratos, preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia orofacial ao calor induzida pela administração de carragenina por até 6 horas. Ainda, o mesmo estudo mostrou que a injeção da toxina no GT reduziu as respostas hiperalérgicas ao calor do 3º ao 9º dia após a cirurgia de CNIO. Estes achados sugerem que os neurônios do GT que expressam receptores TRPV1 são fundamentais para o desenvolvimento de hiperalgesia orofacial ao calor de origem inflamatória ou neuropática. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os de Chichorro *et. al.*, (2014), uma vez que a injeção de RTX no GT, ainda que em uma dose mais baixa, também reduziu a hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO.

5.3. As ações do sistema endotelinérgico em células do gânglio do trigêmeo

Corroborando as evidências a respeito das ações das endotelinas e seus receptores em neurônios do sistema trigeminal, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a ET-1, quando injetada diretamente no GT de camundongos *naïves* é capaz de promover uma hiperalgesia orofacial ao calor persistente, que perdura por até 4 horas após a injeção. Este dado assemelha-se aos de estudos anteriores, que avaliaram o potencial hiperalérgico da ET-1 em neurônios aferentes primários

trigeminais frente a estímulos mecânicos e térmicos. Estes estudos demonstraram que a administração de ET-1 no lábio superior de ratos causa hiperalgesia ao frio e ao calor, bem como à estimulação mecânica, a qual persistiu por até 5 horas após a administração (Chichorro *et al.*, 2006a; 2006c). Ademais, foi demonstrado que a injeção de ET-1, ET-3 e IRL-1620 (um agonista seletivo de receptores ET_B) induzem comportamento nociceptivo quando injetados em regiões inervadas por diferentes ramificações do trigêmeo como lábio superior e articulação temporomandibular (Chichorro *et al.*, 2010). Desta forma, quando associados a estes achados, nossos resultados reforçam as evidências de que o peptídeo possa atuar no sistema trigeminal como importante mediador da hiperalgesia orofacial.

Além disso, também foi demonstrado neste estudo que a hiperalgesia orofacial ao calor causada pela injeção de ET-1 no GT é mediada tanto por receptores ET_A quanto ET_B. Conforme mencionado anteriormente, ambos os receptores estão localizados no GT em neurônios de pequeno a grande diâmetros, mas as CSG expressam apenas receptores ET_B. Um estudo eletrofisiológico realizado por Yamamoto e colaboradores (2013) sugere possíveis mecanismos de ação pelos quais a ET-1 promove a ativação de neurônios do GT. Ao ativar receptores ET_A o peptídeo parece causar um aumento nas correntes induzidas por capsaicina, que é prevenido pelo bloqueio prévio destes receptores, mas não de receptores ET_B. Esta resposta demonstrou ser dependente da ativação da proteína quinase C (PKC), sugerindo que as ações da ET-1 mediada por receptores ET_A no GT dependem da co-ativação de receptores TRPV1 e a enzima PKC.

Por outro lado, nosso estudo mostra que a hiperalgesia ao calor provocada pela injeção de ET-1 no GT também pode ocorrer independente da participação de receptores ET_A, uma vez que a injeção i.g. do agonista seletivo para receptores ET_B, sarafotoxina S6c, também induziu respostas hiperalgésicas em animais sem manipulação prévia. De acordo com Yamamoto e colaboradores (2013), ao contrário dos receptores ET_A, a ativação de receptores ET_B por ET-1 não modula as correntes induzidas por capsaicina em neurônios do GT, mas induz aumento na liberação de cálcio intracelular por essas células.

Além do envolvimento dos receptores endotelinérgicos, sabe-se que o glutamato é um mediador importante nas respostas hiperalgésicas evocadas por ET-1. Kodhorova e colaboradores (2009) demonstraram que hiperalgesia mecânica provocada pela injeção de ET-1 na pata de ratos é reduzida pela administração prévia ou co-injeção do antagonista competitivo seletivo de receptores NMDA de glutamato, o D-AP5,

juntamente com o peptídeo. O antagonismo destes receptores demonstrou reduzir a resposta hiperalgésica evocada por ET-1 por até 1 hora após a sua administração. Ainda, o estudo mostrou que a injeção do peptídeo é capaz de aumentar liberação de glutamato pelos nociceptores e esta ação parece ser dependente da ativação de receptores ET_A (Khodorova *et al.*, 2009).

Em 2008, Xiao e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que o glutamato pode ser liberado pelo soma de neurônios aferentes primários do GT. Corroborando este estudo, o trabalho realizado por Kung e colaboradores (2013) demonstrou de forma consistente que a transmissão glutamatérgica intraganglionar tanto no GRD quanto no GT pode ser um fator importante para o início e a manutenção da dor neuropática. De forma detalhada, o estudo demonstrou que o soma dos neurônios aferentes primários de ambos tipos de gânglios sensoriais liberam glutamato quando despolarizados e que tanto neurônios, como CSG, do GRD expressam receptores para glutamato como, NMDA, AMPA, cainato e metabotrópicos, os quais podem ser ativados por seus agonistas seletivos, em ambos os tipos de células. Além disso, também foi demonstrado que, após a lesão de nervos espinhais ou trigeminais, há um aumento na expressão de glutamato no soma dos neurônios afetados e também nos de neurônios vizinhos a eles. Ademais, Laursen e colaboradores (2014) corroboraram estes achados demonstrando, através de técnicas eletrofisiológicas, que a injeção de glutamato no GT é capaz de aumentar a excitabilidade das fibras aferentes trigeminais que inervam a região orofacial. Adicionalmente, o estudo realizado por Ferrari e colaboradores (2014), demonstrou que a sensibilização de neurônios aferentes primários provocada pela PGE₂ é dependente da ativação de receptores NMDA expressos em CSG do GRD, evidenciando o importante papel do sistema glutamatérgico na comunicação parácrina entre neurônios e CSG na transmissão da informação nociceptiva periférica.

Neste sentido, o presente estudo avaliou a participação do receptores NMDA para glutamato no desenvolvimento da hiperalgesia ao calor induzida pela injeção de ET-1 no GT. Nossos resultados mostraram que a hiperalgesia orofacial evocada pela ET-1 é dependente da ativação destes receptores, uma vez que o seu bloqueio por D-AP5 reduziu por até 2 horas a resposta hiperalgésica causada pelo peptídeo. Embora experimentos adicionais ainda sejam necessários para melhor caracterizar a participação do glutamato nas ações mediadas por ET-1 em neurônios do GT, este resultado sugere que a transmissão glutamatérgica esta implicada nos mecanismos nociceptivos

desencadeados por ET-1 em neurônios sensoriais do sistema trigeminal.

Após a descoberta de que a ET-1 poderia também funcionar como um importante alógeno endógeno, muitos estudos surgiram demonstrando seu relevante papel como mediador da nocicepção (para revisão ver: Smith *et al.*, 2014). Contribuindo com estes achados, nosso grupo destacou-se por publicar alguns estudos nesta área (Piovezan *et al.*, 2000; da Cunha *et al.*, 2004; Daher *et al.*, 2004; Trentin *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2009a; Motta *et al.*, 2009b; Claudino *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012). Com relação à neuralgia do trigêmeo, estudos realizados em nosso grupo foram os primeiros a demonstrar que as endotelinas contribuem de maneira significativa para alterações na responsividade de animais à estimulação mecânica e, principalmente, térmica da região orofacial, induzidas por CNIO. O primeiro estudo demonstrou que apenas os receptores ET_B estão envolvidos na manutenção da hiperalgisia mecânica provocada pela CNIO. Neste caso, os tratamentos com o antagonista seletivo não peptídico de receptores ET_A (atrasentan) ou o antagonista dual (bosentan) foram inefetivos em reduzir a hiperalgisia, a qual só foi significativamente reduzida pelo tratamento com o antagonista seletivo não peptídico de receptores ET_B (A-192621), que manteve seu efeito por até 2 horas após a administração (Chichorro *et al.*, 2006a). Em um outro estudo, também publicado em 2006, Chichorro e colaboradores mostraram o importante papel dos receptores ET_A e ET_B na modulação da hiperalgisia ao frio induzida por CNIO em ratos. Este estudo demonstrou que a administração sistêmica de atrasentan, A-192621 ou bosentan foi capaz de reduzir as respostas hiperalgésicas ao estímulo frio por até 2,5 e 6 horas após a administração, respectivamente (Chichorro *et al.*, 2006b).

Mais adiante, outro estudo mostrou que ambos os receptores de endotelinas modulam também a hiperalgisia orofacial ao calor induzida por CNIO em ratos (Chichorro *et al.*, 2009). Neste caso, observou-se que a co-administração dos antagonistas peptídicos seletivos (BQ-123 e BQ-788) aboliu a hiperalgisia ao calor, além de causar efeito mais prolongado que quaisquer dos antagonistas administrados separadamente. Em adição, o bloqueio dos receptores ET_B com A-192621 reduziu as respostas hiperalgésicas dos animais constritos e este efeito persistiu por até 3 horas. Ainda, também foi observada a redução significativa da hiperalgisia ao calor com o tratamento sistêmico dos animais com atrasentan (Chichorro *et al.*, 2009).

Assim, o conjunto de estudos mencionados demonstram de forma consistente a importante participação do sistema endotelinérgico na modulação da hiperalgisia orofacial causada pela neuralgia

trigeminal em ratos. Considerando que os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a ET-1 e seus receptores podem ativar neurônios do GT e assim, promover hiperalgesia orofacial ao calor em camundongos, nos sentimos instigados a investigar se os receptores endotelinérgicos localizados no GT poderiam estar envolvidos na manutenção da hiperalgesia orofacial ao estímulo de calor induzida por CNIO.

Os resultados desse bloco de experimentos mostraram que a injeção de BQ-123 no GT no 5^o dia após a CNIO elevou a latência de resposta dos animais constrictos a níveis basais nos primeiros 30 minutos após sua administração e causou uma redução significativa da hiperalgesia ao calor por até 2,5 horas após a injeção. Surpreendentemente, a injeção de BQ-788 reverteu a hiperalgesia ao calor já nos primeiros 30 minutos e este efeito persistiu por até 4 horas após sua administração. Por outro lado, o antagonista não peptídico seletivo para receptores ET_B, IRL2500, foi efetivo apenas em doses significativamente maiores, reduzindo as respostas hiperalgésicas por até 2,5 horas após sua injeção. A menor potência antihiperalgésica do IRL-2500 possivelmente se deve ao fato de que a sua afinidade pelo receptor ET_B, [constante de dissociação (K_D) deste antagonista (K_D :78,2 nM)] é menor do que aquela apresentada pelo BQ-788 (K_D : 9,8 nM) (Russell *et al.*, 1996).

Conforme mencionado na introdução, os receptores ET_B foram identificados em CSG do GT e existem diversas evidências que implicam estas células na transmissão de informações nociceptivas (Takeda *et al.*, 2009). Em nosso estudo demonstramos que a constrição do nervo infraorbital causou um aumento na expressão de GFAP em CSG do GT no 5^o e 10^o dia após a cirurgia, o que caracteriza o aumento da ativação destas células neste período. Este resultado, associado aos dados da literatura, que sustentam a participação das CSG na hiperalgesia orofacial causada pela neuralgia do trigêmeo, levou-nos a hipotetizar que a participação dos receptores ET_B na hiperalgesia orofacial ao calor pudesse ser decorrente da ativação destes receptores presentes em CSG do GT, bem como envolver a liberação de citocinas inflamatórias.

Neste sentido, já foi demonstrado que, atuando em receptores ET_B, a ET-1 é capaz de ativar células de Schwann, e que a ativação desses receptores em astrócitos induz a liberação de IL-6 e TNF α (Pomonis *et al.*, 2001; Morga *et al.*, 2000). Corroborando estes estudos, cabe citar novamente o estudo realizado por Feldman-Goriachnik e Hananni (2011). Neste trabalho, os autores mostraram que o aumento de cálcio intracelular promovido por ET-1 nas CSG pode ser prevenido

pelo bloqueio prévio dos receptores ET_B com seus antagonistas seletivos, peptídico (BQ-788) e não peptídico (IRL 2500). Por outro lado, o antagonista peptídico seletivo para receptores ET_A (BQ-123) não teve nenhum efeito sob a ação da ET-1 nas CSG, sugerindo uma possível participação dos receptores ET_B na liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas CSG.

No presente estudo foi demonstrado que a injeção i.g. de BQ-788 não foi capaz de reduzir a expressão de GFAP pelas CSG do GT dos animais no 5º dia após CNIO. Por outro lado a administração i.g. de fluorocitrato, um inibidor de astrócitos (Okada-Ogawa *et al.*, 2009), reduziu a expressão de GFAP por essas células no 5º dia após CNIO. Desta forma, estes resultados sugerem que o efeito antihiperálgico do tratamento agudo com o antagonista dos receptores ET_B não está relacionado à ativação de CSG no GT. Porém, não se descarta a possibilidade de que o bloqueio desses receptores possa contribuir para uma redução na liberação de mediadores pró-inflamatórios por essas células, ou por neurônios do GT como, por exemplo, a IL-1 β . Um estudo desenvolvido recentemente em nosso grupo mostrou que a hiperálgia mecânica, induzida por ET-1 na pata de camundongos, está relacionada com o aumento dos níveis desta citocina na região (Schroeder, 2014).

A IL-1 é um polipeptídeo produzido por uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, sinoviócitos, mastócitos, células da glia e neurônios (Bianchi *et al.*, 1998). Essa interleucina apresenta-se em duas isoformas ativas, IL-1 β e IL-1 α as quais são agonistas de receptores específicos associados à membrana plasmática, bem como de receptores solúveis, sendo o IL-1ra um antagonista natural dos receptores de IL-1 (Dinarello, 1996). Alguns estudos tem implicado a isoforma IL-1 β no desenvolvimento de hiperálgia orofacial (Takeda *et al.*, 2007a; 2007b; 2008). Através das técnicas de *patch clamp* e imunohistoquímica, Takeda e colaboradores (2007) demonstraram que a injeção de CFA na região orofacial de ratos induz um aumento na expressão de IL-1 β nas CSG, bem como de seu receptor IL1R no soma de neurônios de pequeno diâmetro do GT. Além disso, a IL-1 β parece contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal provocada pelo processo inflamatório.

Outro estudo publicado pelo mesmo grupo demonstrou que a administração do antagonista IL-1ra foi capaz de reduzir a hiperálgia mecânica induzida por inflamação na região orofacial, e que este mecanismo está diretamente relacionado com a inibição da liberação de IL-1 β pelas CSG do GT (Takeda *et al.*, 2008). Segundo Neeb e

colaboradores (2011), o mecanismo parácrino pelo qual a IL-1 β contribui para a sensibilização de neurônios trigeminais esta relacionado com o aumento da síntese da enzima ciclooxigenase 2 em CSG e com consequente liberação de PGE₂ por essas células.

Os resultados apresentados no presente estudo, mostrando que a injeção de IL-1ra no GT reduziu a hiperalgesia orofacial ao calor de animais constrictos por até 2 horas após a administração, corroboram os achados de Takeda e colaboradores (2008) reforçando o papel da IL-1 β no desenvolvimento da hiperalgesia orofacial. Surpreendentemente, também observou-se que a co-injeção do antagonista IL-1ra, juntamente com ET-1, reduziu por até 3 horas as respostas hiperalgêicas provocadas pela administração do peptídeo no GT, sugerindo uma participação efetiva da IL-1 β nos mecanismos nociceptivos operados pela ET-1 e seus receptores no GT. Ademais, já foi demonstrado que a ET-1 é capaz de promover um aumento no RNAm para IL-1 β em células epiteliais e fibroblastos da cavidade oral, o qual mostrou-se dependente da ativação dos receptores endotelinêrgicos (Rikimaru *et al.*, 2009). Assim, é possível que o efeito antihiperalgésico promovido pela injeção i.g. de BQ-788 seja decorrente, ao menos em parte, do bloqueio receptores ET_B em CSG ou neurônios do GT, pois, conforme comentado, a ativação desses receptores promove o aumento de cálcio intracelular em ambas as células. Além disso, sabe-se que este cátion, por sua vez, modula a ativação de diferentes proteínas e a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos que estão relacionados com a nocicepção (Evans *et al.*, 1996; Matsuka *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2013).

Para que o uso de uma substância seja considerado potencialmente relevante para o tratamento de patologias dolorosas crônicas, deve-se levar em consideração não só o seu efeito analgésico, mas também a sua biodisponibilidade por uma via que seja mais apropriada para o paciente, assim como a sua tolerabilidade durante o tratamento. Neste sentido, o bosentan foi o primeiro antagonista de endotelinas aprovado para uso clínico em 2001. Apesar do bosentan ser clinicamente utilizado para o tratamento da hipertensão pulmonar, alguns estudos sugerem que o fármaco possui potencial terapêutico para tratamento de dores crônicas. O estudo realizado por Imhof e colaboradores (2011) demonstrou que o tratamento diário com bosentan foi eficaz em reduzir o edema e a hiperalgesia mecânica associados a um modelo murino de artrite reumatoide. Posteriormente, além de corroborar o estudo anterior, (Donate *et al.*, 2012) também demonstrou que a ação antinociceptiva do bosentan parece estar associada a redução

na produção de citocinas inflamatórias. Além disso, Chichorro e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento agudo com o bosentan foi efetivo em reduzir a hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO em ratos.

No presente estudo foi observado que o tratamento prévio de camundongos com bosentan impediu a instalação da hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO. Além disso, elucidou-se que o bloqueio persistente dos receptores ET_A e ET_B , por bosentan nos dias 5, 6 e 7 após CNIO, reduziu as respostas hiperalgésicas ao calor não só nesse período, mas também por até 48 horas após a última administração do fármaco. Por outro lado, o tratamento repetido com bosentan não alterou a expressão de GFAP pelas CSG no GT, a qual também não foi modulada pelo tratamento repetido com minociclina, um antibiótico, da classe das tetraciclina, que possui ação inibitória sob células gliais (Raghavendra *et al.*, 2003). No entanto, as administrações repetidas de bosentan mostraram-se mais efetivas em reduzir a hiperalgesia orofacial no início do tratamento do que aquelas realizadas com minociclina.

Os mecanismo de ação antihiperalgésica da minociclina ainda não esta bem definido. Especula-se que esta ação possa estar relacionada com a inibição de células gliais e consequente redução na produção de citocinas inflamatórias (Raghavendra *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2013; Mei *et al.*, 2013; Pevida *et al.*, 2013). Porém, em nosso estudo, muito nos surpreendeu o fato do fármaco ter modulado a hiperalgesia ao calor sem alterar a expressão de GFAP pelas CSG. Todavia, o estudo realizado por Yoon e colaboradores (2012) demonstrou que a minociclina foi efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) sem alterar a expressão de GFAP em astrócitos na medula espinhal e em células satélites do GRD. O mesmo estudo mostra ainda que, no modelo experimental utilizado, a ação antihiperalgésica da minociclina esta relacionada com a inibição de macrófagos no GRD e da microglia na medula espinhal. Desta forma, o efeito antinociceptivo da minociclina observado em nosso estudo pode estar relacionado com sua ação inibitória sobre outras células do GT como, por exemplo, macrófagos ou também pela inibição de astrócitos e microglia no subnúcleo caudal do trigêmeo, uma vez que, assim como o bosentan, o fármaco também atravessa a barreira hematoencefálica (Yoon *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm implicado o sistema endotelinérgico, principalmente os receptores ET_B , na proliferação e ativação de astrócitos no SNC (Koyama *et al.*, 1999; Schinelli *et al.*, 2001; Rogers *et*

al., 2003). Gadea e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com bosentan é capaz reduzir a proliferação e a ativação destas células após a desmielinização neuronal induzida por lisolectina no SNC. Assim, um fato a ser considerado é que o bosentan atravessa a barreira hematoencefálica e pode agir no SNC. Sabe-se que o subnúcleo caudal do trigêmeo constitui o principal sítio de processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial (Sessle, 2005), e que a ativação de mecanismos neuronais ou de células gliais neste local estão relacionados com a hiperalgesia orofacial causada pela neuralgia do trigêmeo. Assim, a modulação de mecanismos nociceptivos no subnúcleo caudal também pode ser uma via pela qual o bosentan poderia exercer seu efeito antihiperalgésico. No entanto, ainda não existem estudos a cerca da modulação nociceptiva envolvendo as endotelinas e seus receptores nesta região do sistema trigeminal. Desta forma, nossos dados permitem sugerir que a analgesia de longa duração proveniente do bloqueio persistente dos receptores ET_A e ET_B possa estar relacionada com o bloqueio de mecanismos neuronais, periféricos e/ou centrais, necessários para a manutenção da hiperalgesia orofacial.

A busca por desvendar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção das dores crônicas, como a causada pela neuralgia do trigêmeo, é fundamental para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença. Nesse sentido, este estudo demonstra que os receptores ET_A e, principalmente, os ET_B presentes em células do GT estão envolvidos nos mecanismos nociceptivos operados por ET-1 no sistema trigeminal e reforçam o fato de que as endotelinas são alvos potencialmente relevantes para o controle da dor neuropática orofacial causada pela neuralgia do trigêmeo.

6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou pela primeira vez que a ET-1, ao ativar seus receptores ET_A e ET_B expressos em células do GT, é capaz de induzir o desenvolvimento de hiperalgesia orofacial ao calor em camundongos. Além disso, nossos resultados demonstraram que os receptores endotelinérgicos presentes no GT, principalmente os receptores ET_B, estão implicados na manutenção da hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO.

Apesar de alguns estudos sugerirem uma possível relação entre os receptores de endotelinas, principalmente os receptores ET_B, e a ativação de células gliais, como astrócitos e CSG, nossos resultados mostraram que esses receptores parecem não modular a ativação das CSG que ocorre no GT após a constrição do nervo infraorbital. Nossos resultados também mostraram que a hiperalgesia de longa duração causada pela injeção de ET-1 no GT parece ser dependente da ação do glutamato e da IL-1 β em células do GT. Desse modo, não se exclui a possibilidade de que o bloqueio dos receptores ET_B localizados nessas células, ou em neurônios do GT seja capaz de reduzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios, neurotransmissores e/ou neuropeptídeos por ambos os tipos celulares, e assim contribuir para a redução da hiperalgesia orofacial. A figura 27 apresenta uma versão esquemática dos principais achados deste trabalho e dos potenciais mecanismos implicados na hiperalgesia orofacial induzida por ET-1 no GT ou por CION.

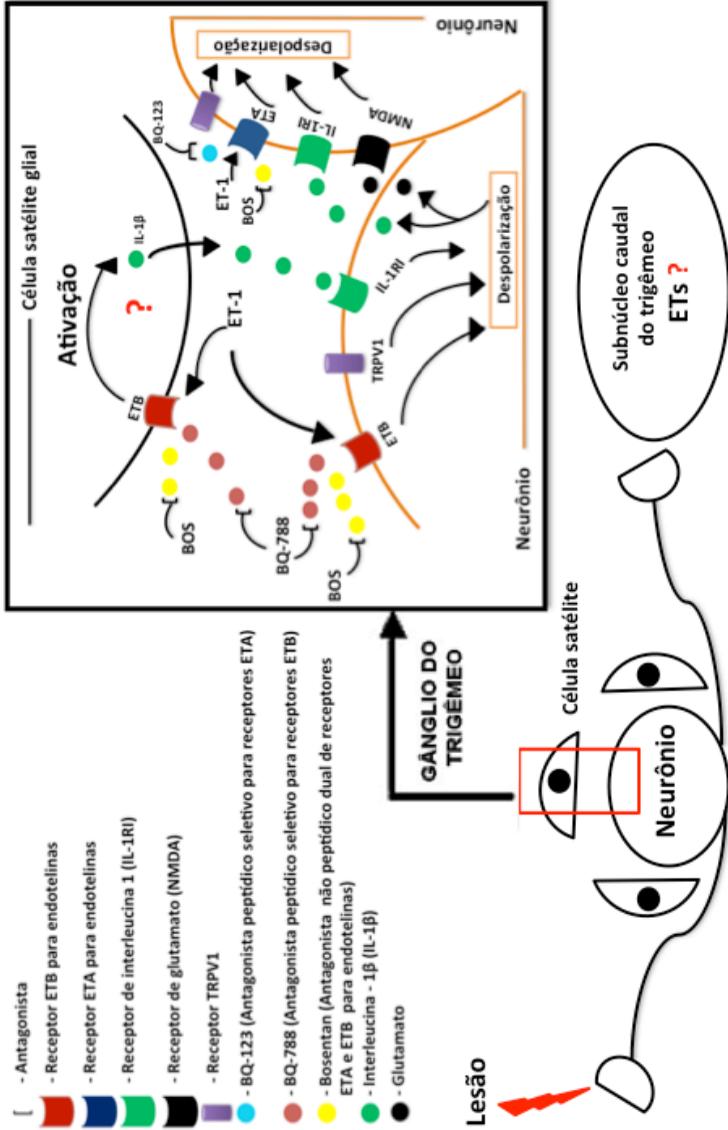


Figura 27: Possível ação parácrina da ET-1 no GT e a sua implicação na hiperalgesia orofacial ao calor induzida por CNIO: A ET-1 quando injetada no GT de animais é capaz de causar hiperalgesia orofacial ao calor por atuar em seus receptores ET_A e ET_B localizados nas células do GT. Esta resposta parece ser dependente da ação da IL-1 β e glutamato em seus respectivos receptores. Possivelmente, a ativação dos receptores endotelinérgicos contribui para a sensibilização neuronal, com conseqüente liberação de glutamato e IL-1 β destas células, os quais, ao agir em seus receptores localizados no próprio neurônio e em neurônios vizinhos, causam despolarização e aumento da excitabilidade neuronal. A injeção de BQ-123 e BQ-788 no GT foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor após CNIO, assim como o tratamento sistêmico com bosentan. No entanto, o bloqueio dos receptores ET_B por BQ-788 ou bosentan não alterou a ativação das CSG. A ação das endotelinas (ETs) no subnúcleo caudal do trigêmeo e a sua implicação no desenvolvimento e manutenção da neuropatia do trigeminal ainda deve ser investigada.

7. REFERÊNCIAS

- Aldskogius, H., Elfvin, L. G., and Forsman, C. A. (1986). Primary sensory afferents in the inferior mesenteric ganglion and related nerves of the guinea pig. An experimental study with anterogradely transported wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase conjugate. *J Auton Nerv Syst* 15, 179-90.
- Almeida, T. F., Roizenblatt, S., and Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000, 40-56.
- Anderson, L. C., Vakoula, A., and Veinote, R. (2003). Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Arch Oral Biol* 48, 161-9.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348, 730-2.
- Baamonde, A., Lastra, A., Villazon, M., Bordallo, J., Hidalgo, A., and Menendez, L. (2004). Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 245-51.
- Berti-Mattera, L. N., Gariepy, C. E., Burke, R. M., and Hall, A. K. (2006). Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. *Exp Neurol* 201, 399-406.
- Bianchi, M., Dib, B., and Panerai, A. E. (1998). Interleukin-1 and nociception in the rat. *J Neurosci Res* 53, 645-50.
- Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., and Attramadal, H. (2000). Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275, 17596-604.
- Calvin, W. H., Loeser, J. D., and Howe, J. F. (1977). A neurophysiological theory for the pain mechanism of tic douloureux. *Pain* 3, 147-54.
- Carlson, C. R. (2008). Psychological considerations for chronic orofacial pain. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 20, 185-95, vi.
- Cherkas, P. S., Huang, T. Y., Pannicke, T., Tal, M., Reichenbach, A., and Hanani, M. (2004). The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain* 110, 290-8.
- Chiang, C. Y., Dostrovsky, J. O., Iwata, K., and Sessle, B. J. (2011). Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist* 17, 303-20.

Chiang, C. Y., Dostrovsky, J. O., and Sessle, B. J. (1991). Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res* 544, 71-8.

Chichorro, J. G., Fiuza, C. R., Bressan, E., Claudino, R. F., Leite, D. F., and Rae, G. A. (2010). Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: role of ETA and ETB receptors. *Brain Res* 1345, 73-83.

Chichorro, J. G., Zampronio, A. R., Cabrini, D. A., Franco, C. R., and Rae, G. A. (2009). Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides* 43, 133-42.

Chichorro, J. G., Zampronio, A. R., and Rae, G. A. (2006a). Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 1136-40.

Chichorro, J. G., Zampronio, A. R., Souza, G. E., and Rae, G. A. (2006b). Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain* 123, 64-74.

Chichorro JG (2006c). Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

Claudino, R. F., Marcon, R., Bento, A. F., Chichorro, J. G., and Rae, G. A. (2010). Endothelins implicated in referred mechanical hyperalgesia associated with colitis induced by TNBS in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 88, 661-7.

Cruccu, G., Gronseth, G., Alksne, J., Argoff, C., Brainin, M., Burchiel, K., Nurmikko, T., Zakrzewska, J. M., American Academy of Neurology, S., and European Federation of Neurological, S. (2008). AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *Eur J Neurol* 15, 1013-28.

Cruz, L. S., Kopruszinski, C. M., and Chichorro, J. G. (2014). Intraganglionic resiniferatoxin prevents orofacial inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Behav Pharmacol* 25, 112-8.

Da Cunha, J. M., Rae, G. A., Ferreira, S. H., and Cunha Fde, Q. (2004). Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 501, 87-94.

Daher, J. B., Souza, G. E., D'Orleans-Juste, P., and Rae, G. A. (2004). Endothelin ETB receptors inhibit articular nociception and priming induced by carrageenan in the rat knee-joint. *Eur J Pharmacol* 496, 77-85.

Davenport, A. P., and Maguire, J. J. (2006). Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*, 295-329.

De Oliveira, A. M., Viswanathan, M., Capsoni, S., Heemskerk, F. M., Correa, F. M., and Saavedra, J. M. (1995). Characterization of endothelinA receptors in cerebral and peripheral arteries of the rat. *Peptides* 16, 139-44.

Devor, M., Amir, R., and Rappaport, Z. H. (2002). Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. *Clin J Pain* 18, 4-13.

Devor, M., and Wall, P. D. (1990). Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. *J Neurophysiol* 64, 1733-46.

Di Stefano, G., La Cesa, S., Truini, A., and Cruccu, G. (2014). Natural history and outcome of 200 outpatients with classical trigeminal neuralgia treated with carbamazepine or oxcarbazepine in a tertiary centre for neuropathic pain. *J Headache Pain* 15, 34.

Dieleman, J. P., Kerklaan, J., Huygen, F. J., Bouma, P. A., and Sturkenboom, M. C. (2008). Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain* 137, 681-8.

Dinarelli, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-147.

Diogenes, A., Patwardhan, A. M., Jeske, N. A., Ruparel, N. B., Goffin, V., Akopian, A. N., and Hargreaves, K. M. (2006). Prolactin modulates TRPV1 in female rat trigeminal sensory neurons. *J Neurosci* 26, 8126-36.

Donate, P. B., Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Junta, C. M., Lima, F. O., Vieira, S. M., Peres, R. S., Bombonato-Prado, K. F., Louzada, P., Jr., Ferreira, S. H., Donadi, E. A., Passos, G. A., and Cunha, F. Q. (2012). Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-alpha in the induction of endothelin system genes. *Inflamm Res* 61, 337-48.

Dubin, A. E., and Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120, 3760-72.

Evans, A. R., Nicol, G. D., and Vasko, M. R. (1996). Differential regulation of evoked peptide release by voltage-sensitive calcium channels in rat sensory neurons. *Brain Res* 712, 265-73.

Feldman-Goriachnik, R., and Hanani, M. (2011). Functional study of endothelin B receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia. *Neuroreport* 22, 465-9.

Ferrari, L. F., Cunha, F. Q., Parada, C. A., and Ferreira, S. H. (2007). A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. *J Neurosci Methods* 159, 236-43.

Ferreira, S. H., Romitelli, M., and de Nucci, G. (1989). Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5, S220-2.

Giannessi, D., Del Ry, S., and Vitale, R. L. (2001). The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43, 111-26.

Gobel, S., Falls, W. M., and Humphrey, E. (1981). Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. *J Neurosci* 1, 1163-79.

Golden, J. P., Rana, J. Z., Davis, J., Zahm, D. S., and Jacquin, M. F. (1993). Organization of the proximal, orbital segment of the infraorbital nerve at multiple intervals after axotomy at birth: a quantitative electron microscopic study in rat. *J Comp Neurol* 338, 159-74.

Gomes, L. O., Hara, D. B., and Rae, G. A. (2012). Endothelin-1 induces itch and pain in the mouse cheek model. *Life Sci* 91, 628-33.

Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 457-76.

Hans, G., Deseure, K., Robert, D., and De Hert, S. (2007). Neurosensory changes in a human model of endothelin-1 induced pain: a behavioral study. *Neurosci Lett* 418, 117-21.

Headache Classification Committee of the International Headache, S. (2013). The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33, 629-808.

Huang, T. Y., Cherkas, P. S., Rosenthal, D. W., and Hanani, M. (2005). Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res* 1036, 42-9.

Ichimura, Y., Asano, Y., Hatano, M., Tamaki, Z., Takekoshi, T., Kogure, A., Tomita, M., Kawashima, T., Miyazaki, M., Taniguchi, T., Takahashi, T., Mitsui, H., Sugaya, M., Yao, A., Kinugawa, K., and Sato, S. (2011). Significant attenuation of macrovascular involvement by bosentan in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis with multiple digital ulcers and gangrene. *Mod Rheumatol* 21, 548-52.

- Ji, R. R., Berta, T., and Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl 1, S10-28.
- Jia, D. Z., and Li, G. (2010). Bioresonance hypothesis: a new mechanism on the pathogenesis of trigeminal neuralgia. *Med Hypotheses* 74, 505-7.
- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29, 355-84.
- Karai, L., Brown, D. C., Mannes, A. J., Connelly, S. T., Brown, J., Gandal, M., Wellisch, O. M., Neubert, J. K., Olah, Z., and Iadarola, M. J. (2004). Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 113, 1344-52.
- Kedzierski, R. M., and Yanagisawa, M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 851-76.
- Khan, A. A., Diogenes, A., Jeske, N. A., Henry, M. A., Akopian, A., and Hargreaves, K. M. (2008). Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience* 155, 503-9.
- Khodorova, A., Fareed, M. U., Gokin, A., Strichartz, G. R., and Davar, G. (2002). 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* 22, 7788-96.
- Khodorova, A., Navarro, B., Jouaville, L. S., Murphy, J. E., Rice, F. L., Mazurkiewicz, J. E., Long-Woodward, D., Stoffel, M., Strichartz, G. R., Yukhananov, R., and Davar, G. (2003). Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med* 9, 1055-61.
- Khodorova, A., Richter, J., Vasko, M. R., and Strichartz, G. (2009). Early and late contributions of glutamate and CGRP to mechanical sensitization by endothelin-1. *J Pain* 10, 740-9.
- Klass, M., Hord, A., Wilcox, M., Denson, D., and Csete, M. (2005). A role for endothelin in neuropathic pain after chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Anesth Analg* 101, 1757-62.
- Koopman, J. S., Dieleman, J. P., Huygen, F. J., de Mos, M., Martin, C. G., and Sturkenboom, M. C. (2009). Incidence of facial pain in the general population. *Pain* 147, 122-7.
- Koyama, Y., Takemura, M., Fujiki, K., Ishikawa, N., Shigenaga, Y., and Baba, A. (1999). BQ788, an endothelin ET(B) receptor antagonist, attenuates stab wound injury-induced reactive astrocytes in rat brain. *Glia* 26, 268-71.

Krafft, R. M. (2008). Trigeminal neuralgia. *Am Fam Physician* 77, 1291-6.

Kumar, S., Rastogi, S., Kumar, S., Mahendra, P., Bansal, M., and Chandra, L. (2013). Pain in trigeminal neuralgia: neurophysiology and measurement: a comprehensive review. *J Med Life* 6, 383-8.

Lalich, M., McNeel, D. G., Wilding, G., and Liu, G. (2007). Endothelin receptor antagonists in cancer therapy. *Cancer Invest* 25, 785-94.

Landry, M., and Nagy, F. (2009). [GABA(B) receptors and sensitization to pain]. *J Soc Biol* 203, 87-97.

Lazarov, N. E. (2002). Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 66, 19-59.

Leclercq, D., Thiebaut, J. B., and Heran, F. (2013). Trigeminal neuralgia. *Diagn Interv Imaging* 94, 993-1001.

Li, J., Vause, C. V., and Durham, P. L. (2008). Calcitonin gene-related peptide stimulation of nitric oxide synthesis and release from trigeminal ganglion glial cells. *Brain Res* 1196, 22-32.

Liu, C. Y., Lu, Z. Y., Li, N., Yu, L. H., Zhao, Y. F., and Ma, B. (2015). The role of large-conductance, calcium-activated potassium channels in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Cephalalgia* 35, 16-35.

Loeser, J. D., and Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137, 473-7.

Luiz, A. P., Schroeder, S. D., Chichorro, J. G., Calixto, J. B., Zampronio, A. R., and Rae, G. A. (2010). Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides* 44, 87-92.

Luiz, AP (2011). Uma nova visão da participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas na dor neuropática orofacial. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.

Lysko, P. G., Elshourbagy, N. A., Pullen, M., and Nambi, P. (1995). Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture. *Brain Res Dev* 88, 96-101.

Macianskyte, D., Januzis, G., Kubilius, R., Adomaitiene, V., and Sciupokas, A. (2011). Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. *Medicina (Kaunas)* 47, 386-92.

Maguire, J. J., and Davenport, A. P. (2014). Endothelin@25 - new agonists, antagonists, inhibitors and emerging research frontiers: IUPHAR Review 12. *Br J Pharmacol* 171, 5555-72.

Marfurt, C. F. (1981). The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 203, 785-98.

Martinez, V., Szekely, B., Lemarie, J., Martin, F., Gentili, M., Ben Ammar, S., Lepeintre, J. F., Garreau de Loubresse, C., Chauvin, M., Bouhassira, D., and Fletcher, D. (2013). The efficacy of a glial inhibitor, minocycline, for preventing persistent pain after lumbar discectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *Pain* 154, 1197-203.

Masaki, T., Miwa, S., Sawamura, T., Ninomiya, H., and Okamoto, Y. (1999). Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* 375, 133-8.

Matsuka, Y., Edmonds, B., Mitirattanakul, S., Schweizer, F. E., and Spigelman, I. (2007). Two types of neurotransmitter release patterns in isolectin B4-positive and negative trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 144, 665-74.

Matsuka, Y., Neubert, J. K., Maidment, N. T., and Spigelman, I. (2001). Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. *Brain Res* 915, 248-55.

Mei, X. P., Sakuma, Y., Xie, C., Wu, D., Ho, I., Kotani, J., and Xu, L. X. (2013). Depressing Interleukin-1beta Contributed to the Synergistic Effects of Tramadol and Minocycline on Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. *Neurosignals* 22, 30-42.

Montano, N., Conforti, G., Di Bonaventura, R., Meglio, M., Fernandez, E., and Papacci, F. (2015). Advances in diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. *Ther Clin Risk Manag* 11, 289-99.

Motta, E. M., Calixto, J. B., and Rae, G. A. (2006). Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 1141-5.

Motta, E. M., Chichorro, J. G., D'Orleans-Juste, P., and Rae, G. A. (2009a). Roles of endothelin ETA and ETB receptors in nociception and chemical, thermal and mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in the rat hindpaw. *Peptides* 30, 918-25.

Motta, E. M., Chichorro, J. G., and Rae, G. A. (2009b). Role of ET(A) and ET(B) endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. *Neurosci Lett* 457, 146-50.

Namer, B., Hilliges, M., Orstavik, K., Schmidt, R., Weidner, C., Torebjork, E., Handwerker, H., and Schmelz, M. (2008). Endothelin 1 activates and sensitizes human C-nociceptors. *Pain* 137, 41-9.

Neubert, J. K., Mannes, A. J., Keller, J., Wexel, M., Iadarola, M. J., and Caudle, R. M. (2005). Peripheral targeting of the trigeminal ganglion via the infraorbital foramen as a therapeutic strategy. *Brain Res Brain Res Protoc* 15, 119-26.

Nurmikko, T. J., and Eldridge, P. R. (2001). Trigeminal neuralgia--pathophysiology, diagnosis and current treatment. *Br J Anaesth* 87, 117-32.

Nussdorfer, G. G., Rossi, G. P., Malendowicz, L. K., and Mazzocchi, G. (1999). Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. *Pharmacol Rev* 51, 403-38.

O'Callaghan, D. S., Savale, L., Yaici, A., Natali, D., Jais, X., Parent, F., Montani, D., Humbert, M., Simonneau, G., and Sitbon, O. (2011). Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 12, 1585-96.

Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Mizushima, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A., and Noguchi, K. (2004). Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body. *Neuroscience* 126, 1011-21.

Okada-Ogawa, A., Suzuki, I., Sessle, B. J., Chiang, C. Y., Salter, M. W., Dostrovsky, J. O., Tsuboi, Y., Kondo, M., Kitagawa, J., Kobayashi, A., Noma, N., Imamura, Y., and Iwata, K. (2009). Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29, 11161-71.

Pannese, E. (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 65, 1-111.

Pevida, M., Lastra, A., Hidalgo, A., Baamonde, A., and Menendez, L. (2013). Spinal CCL2 and microglial activation are involved in paclitaxel-evoked cold hyperalgesia. *Brain Res Bull* 95, 21-7.

Piao, Z. G., Cho, I. H., Park, C. K., Hong, J. P., Choi, S. Y., Lee, S. J., Lee, S., Park, K., Kim, J. S., and Oh, S. B. (2006). Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121, 219-31.

Piovezan, A. P., D'Orleans-Juste, P., Souza, G. E., and Rae, G. A. (2000). 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* 129, 961-8.

Plant, T. D., Zollner, C., Kepura, F., Mousa, S. S., Eichhorst, J., Schaefer, M., Furkert, J., Stein, C., and Oksche, A. (2007). Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain* 3, 35.

Plant, T. D., Zollner, C., Mousa, S. A., and Oksche, A. (2006). Endothelin-1 potentiates capsaicin-induced TRPV1 currents via the endothelin A receptor. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 1161-4.

Pomonis, J. D., Rogers, S. D., Peters, C. M., Ghilardi, J. R., and Mantyh, P. W. (2001). Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. *J Neurosci* 21, 999-1006.

Price, G. W., Wilkin, G. P., Turnbull, M. J., and Bowery, N. G. (1984). Are baclofen-sensitive GABAB receptors present on primary afferent terminals of the spinal cord? *Nature* 307, 71-4.

Raghavendra, V., Tanga, F., and DeLeo, J. A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 624-30.

Rashid, A. J., O'Dowd, B. F., and George, S. R. (2004). Minireview: Diversity and complexity of signaling through peptidergic G protein-coupled receptors. *Endocrinology* 145, 2645-52.

Rikimaru, T., Awano, S., Mineoka, T., Yoshida, A., Ansai, T., and Takehara, T. (2009). Relationship between endothelin-1 and interleukin-1beta in inflamed periodontal tissues. *Biomed Res* 30, 349-55.

Ro, L. S., and Chang, K. H. (2005). Neuropathic pain: mechanisms and treatments. *Chang Gung Med J* 28, 597-605.

Rogawski, M. A., and Loscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med* 10, 685-92.

Rogers, S. D., Peters, C. M., Pomonis, J. D., Hagiwara, H., Ghilardi, J. R., and Mantyh, P. W. (2003). Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia* 41, 180-90.

Rubanyi, G. M., and Polokoff, M. A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46, 325-415.

Russell, F. D., and Davenport, A. P. (1996). Characterization of the binding of endothelin ETB selective ligands in human and rat heart. *Br J Pharmacol* 119, 631-6.

Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Takuwa, Y., Yanagisawa, H., and Masaki, T. (1991). Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 656-63.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348, 732-5.

Schinelli, S., Zanassi, P., Paolillo, M., Wang, H., Feliciello, A., and Gallo, V. (2001). Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci* 21, 8842-53.

Seino, H., Seo, K., Maeda, T., and Someya, G. (2009). Behavioural and histological observations of sensory impairment caused by tight ligation of the trigeminal nerve in mice. *J Neurosci Methods* 181, 67-72.

Sessle, B. J. (2000). Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 57-91.

Sessle, B. J. (2005). Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol* 71, 117-36.

Sessle, B. J. (2011). Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 97, 179-206.

Siqueira, S. R., Alves, B., Malpartida, H. M., Teixeira, M. J., and Siqueira, J. T. (2009). Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. *Neuroscience* 164, 573-7.

Smith, T. P., Haymond, T., Smith, S. N., and Sweitzer, S. M. (2014). Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. *J Pain Res* 7, 531-45.

Souza, G. R., Talbot, J., Lotufo, C. M., Cunha, F. Q., Cunha, T. M., and Ferreira, S. H. (2013). Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11193-8.

Stanimirovic, D. B., Yamamoto, T., Uematsu, S., and Spatz, M. (1994). Endothelin-1 receptor binding and cellular signal transduction in cultured human brain endothelial cells. *J Neurochem* 62, 592-601.

Steen, V., Denton, C. P., Pope, J. E., and Matucci-Cerinic, M. (2009). Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 48 Suppl 3, iii19-24.

Stosser, S., Agarwal, N., Tappe-Theodor, A., Yanagisawa, M., and Kuner, R. (2010). Dissecting the functional significance of endothelin A receptors in peripheral nociceptors in vivo via conditional gene deletion. *Pain* 148, 206-14.

Takeda, M., Takahashi, M., and Matsumoto, S. (2008). Contribution of activated interleukin receptors in trigeminal ganglion neurons to hyperalgesia via satellite glial interleukin-1beta paracrine mechanism. *Brain Behav Immun* 22, 1016-23.

Takeda, M., Takahashi, M., and Matsumoto, S. (2009). Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 784-92.

Takeda, M., Tanimoto, T., Kadoi, J., Nasu, M., Takahashi, M., Kitagawa, J., and Matsumoto, S. (2007). Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. *Pain* 129, 155-66.

Takeda, M., Tanimoto, T., Nasu, M., Ikeda, M., Kadoi, J., and Matsumoto, S. (2005). Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain* 116, 375-85.

Takeda, M., Tsuboi, Y., Kitagawa, J., Nakagawa, K., Iwata, K., and Matsumoto, S. (2011). Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. *Mol Pain* 7, 5.

Trentin, P. G., Fernandes, M. B., D'Orleans-Juste, P., and Rae, G. A. (2006). Endothelin-1 causes pruritus in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 1146-51.

Truini, A., Galeotti, F., and Cruccu, G. (2005). New insight into trigeminal neuralgia. *J Headache Pain* 6, 237-9.

Urano, H., Ara, T., Fujinami, Y., and Hiraoka, B. Y. (2012). Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. *Int J Med Sci* 9, 690-7.

Usunoff, K. G., Marani, E., and Schoen, J. H. (1997). The trigeminal system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 136, I-X, 1-126.

Vigne, P., Breittmayer, J. P., and Frelin, C. (1993). Competitive and non competitive interactions of BQ-123 with endothelin ETA receptors. *Eur J Pharmacol* 245, 229-32.

Vit, J. P., Jasmin, L., Bhargava, A., and Ohara, P. T. (2006). Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neur Glia Biol* 2, 247-57.

Vos, B. P., Strassman, A. M., and Maciewicz, R. J. (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14, 2708-23.

Werner, M. F., Trevisani, M., Campi, B., Andre, E., Geppetti, P., and Rae, G. A. (2010). Contribution of peripheral endothelin ETA and ETB receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Eur J Pain* 14, 911-7.

Woda, A. (2003). Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. *J Dent Res* 82, 764-8.

Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306, 686-8.

Wu, C. J., Lian, Y. J., Zheng, Y. K., Zhang, H. F., Chen, Y., Xie, N. C., and Wang, L. J. (2012). Botulinum toxin type A for the treatment of trigeminal neuralgia: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cephalgia* 32, 443-50.

Yamamoto, T., Ono, K., Hitomi, S., Harano, N., Sago, T., Yoshida, M., Nunomaki, M., Shiiba, S., Watanabe, S., Nakanishi, O., and Inenaga, K. (2013). Endothelin receptor-mediated responses in trigeminal ganglion neurons. *J Dent Res* 92, 335-9.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-5.

Zakir, H. M., Mostafaezur, R. M., Suzuki, A., Hitomi, S., Suzuki, I., Maeda, T., Seo, K., Yamada, Y., Yamamura, K., Lev, S., Binshtok, A. M., Iwata, K., and Kitagawa, J. (2012). Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. *PLoS One* 7, e44023.

Zhang, H., Lian, Y., Ma, Y., Chen, Y., He, C., Xie, N., and Wu, C. (2014). Two doses of botulinum toxin type A for the treatment of trigeminal neuralgia: observation of therapeutic effect from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hdch Pain* 15, 65.

Zhang, J., Yang, M., Zhou, M., He, L., Chen, N., and Zakrzewska, J. M. (2013). Non-antiepileptic drugs for trigeminal neuralgia. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD004029.

Zhou, X. F., Deng, Y. S., Chie, E., Xue, Q., Zhong, J. H., McLachlan, E. M., Rush, R. A., and Xian, C. J. (1999). Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur J Neurosci* 11, 1711-22.

Zhou, X. F., Deng, Y. S., Xian, C. J., and Zhong, J. H. (2000). Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 12, 100-5.

Zhou, Z., Davar, G., and Strichartz, G. (2002). 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* 22, 6325-30.

Parecer de aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC)

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00851

Título

Estudo do envolvimento da endotelina-1 na ativação glial após a neuralgia trigeminal induzida em camundongos

Data de Entrada

17/04/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

22/07/2014

Considerações

Ofício nº 162/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a), Giles Alexander Rac, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO "AD REFERENDUM" a suplementação de duzentos e quarenta e quatro camundongos (*Mus musculus*).

Adita-se o Ofício nº 55/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Giles Alexander Rac, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de trezentos e sessenta e oito camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 08/10/2015**

Data 22/07/2014

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE