

Elaine Cristina Dalazen Gonçalves

**PAPEL DOS RECEPTORES DE BRADICININA NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA
REGIONAL TIPO-I**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

Coorientadora: Dra. Róli Rodrigues Simões

Florianópolis
2018

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

Gonçalves, Elaine Cristina Dalazen
PAPEL DOS RECEPTORES DE BRADICININA NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL
TIPO - I / Elaine Cristina Dalazen Gonçalves ;
orientador, Rafael Cypriano Dutra, coorientador,
Róli Rodrigues Simões, 2018.
116 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Neurociências. 3. Síndrome
da dor complexa regional. 4. Dor. 5. Cininas. I.
Cypriano Dutra, Rafael. II. Rodrigues Simões, Róli.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

ELAINE CRISTINA DALAZEN GONÇALVES

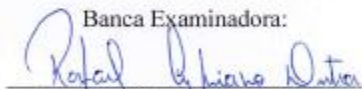
**“PAPEL DOS RECEPTORES DE BRADICININA NO
MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR
COMPLEXA REGIONAL TIPO-I”**

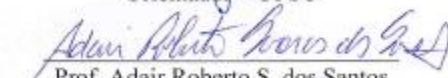
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

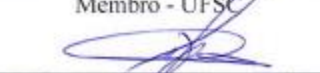
Florianópolis, 30 de janeiro de 2018.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Rafael Cypriano Dutra
Orientador – UFSC


Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Membro - UFSC


Prof. Daniel Fernandes Martins
Membro externo

Este trabalho é dedicado aos meus
amados pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado à vida, e todos os dias a oportunidade de construir novos começos e a chance de evoluir tanto no âmbito profissional quanto pessoal.

Aos meus pais que não mediram esforços para me fornecer o melhor entre as heranças, a educação. Vocês me inspiram e meu amor por vocês é imensurável.

A minha irmã Aline, meu cunhado Ismael e minha sobrinha Ana Sofia por tornarem meus dias mais felizes e por todo incentivo.

As amigas Greicy Echely Figueiró e Laisy Vieira pela amizade incondicional, obrigada por fazerem parte da minha vida!

A Fabiana Debiasi, *in memoriam*, que se foi muito antes do que eu imaginaria, mas tenho certeza que comemoraria comigo essa conquista, pois esteve presente comigo enquanto eu planejava esse futuro.

A minha *english teacher* e amiga para todas as horas Jane, a qual compreendia todos os meus medos e tornou meus dias mais leves enquanto sentava comigo para tomar café e jogar conversa fora. Obrigada!

Ao Wellington Barros, a personificação de amizade genuína. A pós-graduação não teria sido a mesma sem você!

Ao meu orientador, Rafael Cypriano Dutra, no qual me espelho e que foi grande incentivador para que eu prosseguisse na carreira acadêmica. Meus mais sinceros agradecimentos.

A minha co-orientadora, Róli Rodrigues Simões, alguém com quem desenvolvi uma grande amizade e a quem agradeço por compartilhar comigo seu conhecimento na área de dor.

Aos queridos amigos do LANDI que me receberam de braços abertos e assim ganharam meu eterno carinho e respeito. Todos vocês também participaram direta ou indiretamente da construção deste trabalho. Estendo esse agradecimento também ao professor Adair Roberto Soares dos Santos, o qual permitiu que eu participasse das atividades no LANDI durante a estadia em Florianópolis e lá me recebeu de forma muito gentil e acolhedora. Muito obrigada a todos!

A todas as alunas de iniciação científica do Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF) pela amizade, companhia e o auxílio na realização dos experimentos da dissertação.

A professora Flavia Rigo e ao Igor Coelho, por terem disponibilizado seu tempo para me ensinar como executar a administração de fármacos por via intratecal.

A professora Sara Marchesan pela colaboração conosco na realização do ELISA.

A todos os professores e servidores técnico-administrativos da Pós-graduação em Neurociências que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos camundongos empregados neste estudo e sem os quais seria inviável realizar este trabalho.

A CAPES, FAPESC e UFSC pelo auxílio financeiro.

“Há três métodos para ganhar a sabedoria.
Primeiro por reflexão, que é o mais nobre;
Segundo, por imitação que é o mais fácil;
Terceiro, por experiência, que é o mais amargo”.

Confúcio

RESUMO

A síndrome da dor complexa regional - I (SDCR) é uma condição dolorosa persistente, decorrente de lesão tecidual, trauma cirúrgico ou fratura, não associada a lesões nervosas periféricas e cujos mecanismos fisiopatológicos ainda não foram completamente elucidados. Assim, considerando as propriedades nociceptivas associadas aos receptores de bradicinina – B_1 e B_2 – e sua participação em processos de sensibilização periférica, central e inflamação neurogênica, possivelmente envolvida na patogênese da SDCR-I. O objetivo do presente trabalho consistiu em caracterizar a participação dos receptores de bradicinina na gênese e manutenção da dor na SDCR, através do modelo experimental de dor pós-isquemia crônica (DPIC). **Métodos:** No estudo, foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas de 8 – 12 semanas de idade. A DPIC foi induzida através da colocação de anel elástico com 1,3 mm de diâmetro interno (elástico ligadura 60.03.302, marca: Morelli) proximal à articulação do tornozelo da pata posterior direita, de modo a fazer um torniquete. Os animais foram mantidos sob anestesia por três horas e, após o período de isquemia, o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Posteriormente, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais objetivando à avaliação da hiperalgesia mecânica, térmica ao frio e edema entre o 7º e o 22º dia pós-isquemia. Os animais foram tratados com antagonistas seletivos para os receptores B_1 e B_2 , respectivamente DALBK e HOE-140, por diferentes vias: intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.) e intratecal (i.t.). Além disso, de forma única, o experimento o qual envolveu a administração dos respectivos antagonistas i.p. foi reproduzido em fêmeas. Outro grupo experimental recebeu a administração de oligonucleotídeo antisense, por via i.t., para os receptores B_1 e B_2 , a fim de inibir sua expressão gênica. Em adição, verificou-se o efeito da administração de captopril por via intragástrica (v.i.) (30 mg/kg) durante o desenvolvimento da DPIC na presença ou ausência dos tratamentos com os respectivos antagonistas para os receptores B_1 e B_2 . **Resultados:** A administração sistêmica de DALBK (50 nmol/kg) e HOE-140 (150 nmol/kg), nos dias 7, 10, 14 e 21 pós-isquemia inibiu de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC, assim como o edema de pata, porém não apresentou efeito na hiperalgesia ao frio. Além disso, a administração i.pl. de HOE-140 (10 nmol/pata) inibiu a hiperalgesia mecânica no dia 7 pós-isquemia, enquanto o tratamento

com DALBK (10 nmol/pata) não apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo controle não tratado. Em contrapartida, nos dias 14 e 21, ambos os tratamentos apresentaram efeito anti-hiperalgésico. Além disso, apenas o tratamento com HOE-140 (10 nmol/pata) inibiu a hiperalgesia térmica ao frio, nos dias 8 e 22 pós-isquemia. A aplicação i.t. de DALBK e HOE-140, no 14º dia pós-isquemia, inibiu de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC. Posteriormente, a inibição da expressão gênica de ambos os receptores pela administração do oligonucleotídeo antisense inibiram apenas a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC. Nas fêmeas a administração sistêmica dos respectivos antagonistas não inibiu o edema de pata e a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC, enquanto o tratamento com HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) e DALBK (50 nmol/kg, i.p.) inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC, respectivamente nos dias 7 e 10, e nos dias 14 e 21. Por fim, a administração dos antagonistas HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) e DALBK (50 nmol/kg, i.p.) não foram capazes de reverter a hiperalgesia induzida pela DPIC na presença do captopril (30 mg/kg, v.i.). **Conclusão:** Os resultados do presente estudo sugerem a participação dos receptores B₁ e B₂ no desenvolvimento e manutenção da dor crônica associada ao modelo de DPIC.

Palavras-chave: Síndrome da dor complexa regional tipo-I. Dor pós-isquemia crônica. Hiperalgesia. Receptores de bradicinina. Cininas.

ABSTRACT

Complex regional pain syndrome type-I is a chronic painful syndrome. This condition may be induced by surgery, trauma or minor injury, but it is not associated with nerve injury. Considering B₁ and B₂ receptors nociceptive properties and their participation in neurogenic inflammation, peripheral and central sensitization mechanisms, possibly involved in the pathogenesis of CRPS-I, this study aim characterize the participation of bradykinin receptors in the genesis and maintenance of chronic pain through chronic post-ischemic pain (CPIP) model. **Methods:** In the study were used male and female Swiss mice (6-8 weeks of age). CPIP was induced in anesthetized animals by placing elastic O-ring at the ankle joint of the right hind paw for 3 hours. After it, the O-rings were cut reestablishing blood flow and promoting ischemia-reperfusion injury (IR). Subsequently, the animals were submitted to different behavioral tests aiming evaluate mechanical, thermal hyperalgesia and edema by different routes: i) intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.) and intrathecal (i.t.), between 7 and 22 days post-induction. Another experimental group received selective B₁R and B₂R antisense oligonucleotide through i.t. route to inhibit receptor gene expression. The effect of oral captopril (30 mg/kg) was observed during CPIP development with and/or without treatment with selective B₁R and B₂R antagonists. The animals received DALBK and HOE-140, respectively B₁ and B₂ selective antagonists. **Results:** Systemic administration of DALBK (50 nmol/kg) and HOE-140 (150 nmol/kg) in 7, 10, 14 and 21 days significantly inhibited mechanical hyperalgesia induced by CPIP, as well as edema, but did not present a significant effect on cold thermal hyperalgesia development. In addition, i.pl. administration of HOE-140 (10 nmol/paw) inhibited mechanical hyperalgesia on day 7 post-induction, whereas treatment with DALBK (10 nmol/paw) did not showed effect, when compared to untreated control group. On the other hand, in the days 14 and 21, both treatments showed antinociceptive effect, with emphasis on treatment with the B₂R antagonist. It was also observed that, only treatment with HOE-140 (10 nmol/paw) inhibited thermal hyperalgesia at cold, on day 8 and 22 post-induction. The i.t administration of DALBK and HOE-140 significantly inhibited mechanical hyperalgesia induced by CPIP in the 14th day post-induction. Subsequently, gene expression inhibition of both receptors by the administration of the antisense oligonucleotide inhibited only

mechanical hyperalgesia induced by CPIC. In females, systemic administration of respective antagonists did not inhibit paw edema and cold thermal hyperalgesia induced by CPIP, whereas HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) and DALBK (50 nmmol/kg, i.p.) treatment inhibited mechanical hyperalgesia induced by CPIP, respectively in the days 7 and 10, 14 and 21. Finally, HOE-140 (150nmol/kg, i.p.) and DALBK (50 nmol/kg, i.p.) were not able to reverse hyperalgesia induced by CPIP in the presence of captopril (30 mg/kg, p.o.). **Conclusion:** The results of the present study suggest the participation of bradykinin receptors in the development and maintenance of chronic pain associated with CPIP model.

Keywords: Complex regional pain syndrome type-I. Chronic pain post-ischemia. Hyperalgesia. Bradykinin receptors. Kinins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os diferentes tipos de dor e suas respectivas classificações. 26	
Figura 2 - Linha do tempo: contexto histórico da SDCR. 28	28
Figura 3 – Sensibilização periférica. 34	34
Figura 4 – Sensibilização central..... 36	36
Figura 5 – Resumo dos possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SDCR-I. 38	38
Figura 6 – Representação esquemática: mecanismos fisiopatológicos no modelo de DPIC. 41	41
Figura 7 - Mecanismo de ação das cininas sobre as células endoteliais.45	45
Figura 8 – Bradicینina e a neurotransmissão glutamatérgica. 48	48
Figura 9 - Ilustração do protocolo de indução da DPIC. 57	57
Figura 10 – Administração intraperitoneal de antagonistas seletivos para os B ₁ R e B ₂ R. 60	60
Figura 11 – Protocolo experimental: administração intraplantar de agonistas e antagonistas seletivos para os B ₁ R e B ₂ R. 60	60
Figura 12 – Protocolo experimental: administração intratecal de antagonistas seletivos para os B ₁ R e B ₂ R..... 61	61
Figura 13 – Protocolo experimental: administração intratecal de oligonucleotídeos antisense específicos para os B ₁ R e B ₂ R..... 62	62
Figura 14. Protocolo experimental: efeito do captopril na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC. 63	63
Figura 15 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ no edema de pata logo após a indução da DPIC (dia 0). 67	67
Figura 16 - Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC. 69	69

Figura 17 - Efeito dos antagonistas seletivos para receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.	71
Figura 18 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ no edema de pata induzido pela DPIC.	72
Figura 19 - Efeito da administração intraplantar de antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.....	74
Figura 20 - Efeito da administração intraplantar de antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.	75
Figura 21 - Efeito da administração intraplantar de agonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.....	76
Figura 22 - Efeito da administração intraplantar de agonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.	76
Figura 23 – Efeito da administração intratecal de antagonistas seletivos e oligonucleotídeos antisense para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.	77
Figura 24 – Efeito da inibição da ECA na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.	79
Figura 25 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC em fêmeas.	80
Figura 26 – Efeito dos antagonistas seletivos para receptores B ₁ e B ₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC em fêmeas.	81
Figura 27 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ no edema de pata induzido pela DPIC em fêmeas.	82

Figura 28 - Concentração tecidual de BK em animais naive vs. DPIC.	84
Figura 29. Representação esquemática acerca do efeito anti-hiperalgésico e anti-edematogênico dos antagonistas seletivos para receptores de bradicinina no modelo de DPIC.	97
Figura 30 - Efeito dos antagonistas e agonistas seletivos para os receptores B ₁ e B ₂ no edema de pata induzido pela DPIC.	99
Figura 31 - Dados referentes à hiperalgisia térmica ao frio (A, B e C). A. Experimento referente à hiperalgisia induzida por captopril. B. ...	100

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Disfunções características SDCR-I.	31
Quadro 2 – Critérios clínicos para diagnóstico da SDCR-I.....	32
Quadro 3 – Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I.	33
Quadro 4 – Protocolos experimentais e as respectivas doses utilizadas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Ácido araquidônico
- AMP – Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *Cyclic Adenosine Monophosphate*)
- ANOVA – Análise de variância (do inglês *Analysis of Variance*)
- ASIC – Canais iônicos sensíveis a ácidos (do inglês *Acid-Sensing Ion Channels*)
- ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *Adenosine Triphosphate*)
- B₁R – Receptor de bradicinina tipo-1
- B₂R – Receptor de bradicinina tipo-2
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*)
- BK – Bradicinina (do inglês *Bradykinin*)
- CFA – Adjuvante completo de Freund (do inglês *Complete Freund's Adjuvant*)
- CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês *Calcitonin Gene-Related Peptide*)
- CPM – Carboxipeptidase M
- CPN – Carboxipeptidase N
- DABK – Agonista de receptor cininérgico do tipo 1
- DALBK – Antagonista de receptor cininérgico do tipo 1
- DPIC – Dor pós-isquemia crônica
- DSR – Distrofia simpático-reflexa
- EAE – Encefalomielite autoimune experimental
- ECA – Enzima conversora de angiotensina
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- ERK – Cinase regulada pela sinalização extracelular (do inglês *Extracellular Signal-regulated Kinase*).
- ET – Endotelina
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- GPCR – Receptores acoplados a proteína G (do inglês *G Protein-Coupled Receptors*)
- HOE-140 – Antagonista de receptor cininérgicos do tipo 2 (D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]-Bradicininina)
- i.p. – Via intraperitoneal
- i.t. – Via intratecal
- I/R – Isquemia-reperusão

IASP – Associação internacional para o estudo da dor (do inglês *International Association for the Study of Pain*)
IL-1 β – Interleucina 1-beta
JNK – Proteína cinase c-Jun N-terminal
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*)
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NGF – Fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve Growth Factor*)
NKs – Neurocininas (do inglês *Neurokinins*)
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico (do inglês *Nitric Oxide*)
PGs – Prostaglandinas
PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLA₂ – Fosfolipase A₂ (do inglês *Phospholipase A₂*)
PS – Sensibilização periférica (do inglês *Peripheral Sensitization*)
PTX – Paclitaxel
RTK – Receptores de tirosina quinases (do inglês *Receptor Tyrosine Kinases*)
SC – Sensibilização central
SCC – Sistema caliceína-cinina
SDCR-I – Síndrome da dor complexa regional tipo-I
SI – Sistema imune
SNA – Sistema nervoso autônomo
SNP – Sistema nervoso periférico
SP – Substância P
TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*)
TRP – Receptor de potencial transitório (do inglês *Transient Receptor Potential*)
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
v.i. – via intragástrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO-I.....	28
1.1.1 Histórico	28
1.1.2 Epidemiologia e etiologia da SDCR-I	30
1.1.3 Sintomas e diagnóstico da SDCR-I	31
1.1.4 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SDCR-I	34
1.1.5 Sensibilização periférica e central	35
1.1.6 Modelo experimental de SDCR-I	40
2.2 SISTEMA CALICREÍNA-CININA.....	42
2.2.1 Cininas	43
2.2.2 Receptores de bradicinina	44
2. JUSTIFICATIVAS	52
3. OBJETIVO GERAL	54
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 ANIMAIS	56
4.2 MODELO EXPERIMENTAL.....	56
4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA	58
4.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA	59
4.4.1 Hiperalgisia mecânica	59
4.4.2 Hiperalgisia térmica ao frio	59
4.4.3 Protocolo experimental	59
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BRADICININA	64
4.6 REAGENTE E DROGAS	65

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	65
5. RESULTADOS	68
5.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I.P. DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES B ₁ E B ₂ IMEDIATAMENTE APÓS A INDUÇÃO DA LESÃO DE I/R NA PATA DE CAMUNDONGOS.	68
5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES B ₁ E B ₂ NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.....	69
5.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS B ₁ R E B ₂ R NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA DPIC.....	73
5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS B ₁ R E B ₂ R NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.....	74
5.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AGONISTAS SELETIVOS PARA OS B ₁ R E B ₂ R NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.....	76
5.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE ANTAGONISTAS SELETIVOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENSE PARA OS B ₁ R E B ₂ R NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DPIC.	78

5.7 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ECA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DPIC.....	79
5.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES DE BK NA HIPERALGESIA MECÂNICA, TÉRMICA AO FRIO E EDEMA INDUZIDOS PELA DPIC EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.	80
5.9 COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE BK NOS ANIMAIS NAIVE E SUBMETIDOS A DPIC.....	84
6. DISCUSSÃO.....	86
7 CONCLUSÃO.....	98
8 RESULTADOS NEGATIVOS E/OU INCONCLUSIVOS.....	100
9 DESDOBRAMENTOS DA PESQUISA.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

1. INTRODUÇÃO

A palavra dor compartilha sua origem etimológica com as palavras punição e pena, descrevendo não somente experiências conscientes associadas a traumas teciduais ou doenças, mas também o desconforto relacionado a sentimentos desagradáveis (PERL, 2007). Fundamentalmente é considerada uma experiência subjetiva e de caráter individual, portanto mesmo a percepção de estímulo nocivo idêntico pode variar entre os indivíduos (COGHILL, 2010). Não obstante, a dor é considerada a principal razão pela qual as pessoas procuram intervenção médica e emerge da complexa interação entre o processamento sensorial, afetivo e avaliativo (MELZACK, 1999; DUBOIS; GALLAGHER; LIPPE, 2009). Ademais é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de doenças.

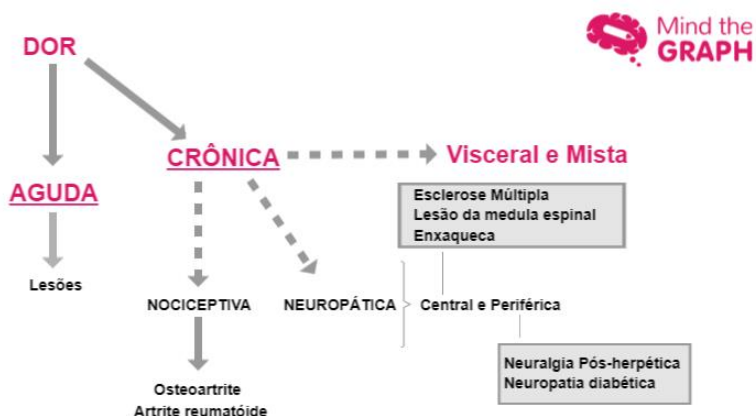
Dentro deste contexto, a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP, da sigla em inglês) conceitua a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais danos. No entanto, este aparentemente é um conceito minimalista haja vista a existência de múltiplas formas de dor as quais envolvem uma variedade de processos biológicos distintos (DAVIS et al., 2017). A fim de lembrar, apesar da sensação desagradável associada, a dor é uma característica evolutiva fundamental, sendo a capacidade de detectar estímulos nocivos essenciais para a sobrevivência e bem estar do organismo (BASBAUM et al., 2009). Cabe ainda lembrar, como supracitado, que a dor possui componentes sensoriais e afetivos, bem como um componente cognitivo, o qual reflete a antecipação de danos futuros (GARLAND, 2013). O componente sensorial engloba a nocicepção, termo introduzido há mais de cem anos pelo fisiologista Sherrington (1906) para estabelecer de forma clara a distinção entre a detecção do estímulo nocivo e a percepção da dor de forma consciente (BUSHNELL; ČEKO; LOW, 2013; GEBHART, 2000). Assim, a nocicepção é o primeiro passo na via nociceptiva e o processo através do qual, estímulos térmicos, mecânicos e químicos são detectados através de subpopulações de fibras nervosas periféricas denominadas nociceptores (BASBAUM e JESSELL, 2000). Esses são as terminações nervosas livres das fibras

aferentes sensoriais de primeira ordem, presentes nos neurônios nociceptivos (pseudounipolar) (MILLER et al., 2015), responsáveis pela conversão dos estímulos nocivos em potenciais de ação – etapa conhecida como transdução sensorial. Assim, a partir das fibras nervosas periféricas, o estímulo doloroso é então conduzido até o sistema nervoso central (SNC), estágio denominado transmissão sensorial com o subsequente processamento da informação nociceptiva no córtex cerebral (percepção consciente da dor) (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Em contrapartida, por mecanismos ainda pouco compreendidos, a dor pode adquirir caráter patológico/anormal culminando com a classificação da dor de acordo com a sua duração e origem (MELNIKOVA, 2010) (Figura 1). Tão logo, a dor aguda é uma forma transitória de dor fortemente associada a estímulo nociceptivo, enquanto a dor crônica persiste por longos períodos de tempo, na maioria dos casos mesmo após a resolução da lesão inicial (KUNER; FLOR, 2016). Contudo a classificação de dor crônica engloba ainda quatro subtipos: nociceptiva, neuropática, visceral e mista. Com relação às dores nociceptiva e neuropática, ambas apresentam situações de hiperalgesia, caracterizada por dor exacerbada frente ao estímulo nocivo, e alodínia, a qual se distingue pela sensação de dor ocasionada por exposição a estímulos inócuos. Mas o que define a transição da dor aguda para a dor crônica? Possivelmente processos mal adaptativos gerados por fatores fisiopatológicos tais como: lesões, infecções virais, doenças autoimunes e/ou metabólicas (KUNER; FLOR, 2016). Ainda segundo Kuner e Flor, apesar de compartilharem alguns atributos, as síndromes dolorosas crônicas têm em geral mecanismos e manifestações clínicas distintas. Neste contexto enquadra-se a Síndrome da dor complexa regional tipo-1 (SDCR-I), terminologia atual definida pela IASP para caracterizar condições dolorosas persistentes decorrentes de trauma cirúrgico, lesão tecidual ou fratura, historicamente conhecida como causalgia, atrofia de Sudeck e distrofia simpático-reflexa (DSR) (HARDEN et al., 2013).

Figura 1 - Os diferentes tipos de dor e suas respectivas classificações.¹

1 A figura ilustra de forma esquemática a classificação da dor quanto a sua duração em: i) aguda e ii) crônica. Todavia, a dor crônica possui ainda



Fonte: Ilustração adaptada pela autora, a partir de MELNIKOVA, 2010.

1.1 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO-I

1.1.1 Histórico

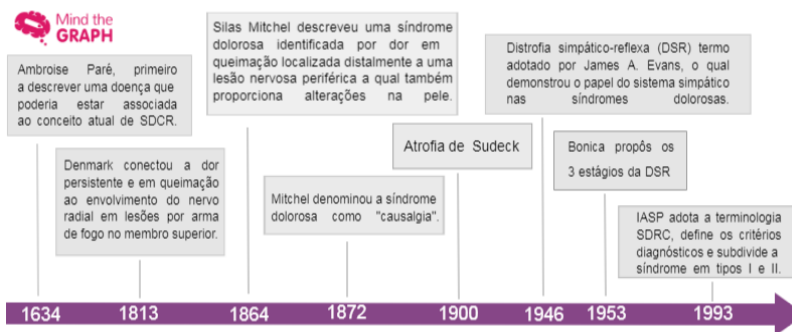
A primeira descrição possivelmente vinculada a SDCR ocorreu no ano de 1813 pelo cirurgião britânico Denmark, responsável pela associação entre dor persistente em membros superiores (gerada por lesões por arma de fogo) e lesões no nervo radial. Posteriormente em 1864, Silas Mitchel publicou o livro junto a outros colaboradores denominado “*Gunshot Wounds and Other Injuries*” no qual descreveu o diagnóstico e o tratamento de lesões nervosas, dentre as quais, uma

quatro subdivisões relativas sua origem: i) nociceptiva e ii) neuropática (de origem central ou periférica); iii) visceral; iv) mista. Ainda dentro deste contexto a dor nociceptiva é considerada proveniente da ativação de nociceptores a partir de local inflamado/lesionado; a dor neuropática por sua vez decorre de lesões ou patologias que afetam o SNC ou SNP; sendo a dor visceral relativa aos órgãos internos e a dor mista associada a mais de uma origem.

síndrome dolorosa identificada por dor em queimação localizada distalmente a lesão nervosa periférica e incorporada a alterações na pele (IOLASCON et al., 2015). A descrição fornecida pelos autores na época descrevia de forma sugestiva os sinais e sintomas do que hoje se conhece como SDCR, mas que em 1872 foi designada por Mitchel como causalgia (IOLASCON et al., 2015; MITCHELL; MOREHOUSE; KEEN, 2007). Ao longo dos anos, porém essa denominação também foi alterada evoluindo para atrofia de Sudeck e DSR, sendo esta última de grande importância, pois determinou o envolvimento da atividade simpática na patogênese de síndromes dolorosas crônicas neuropáticas (EVANS, 1946; SEBASTIN et al., 2011). Contudo foi John Bonica, anesthesiologista e fundador da IASP, o primeiro a propor a ideia de que a DSR teria três estágios subsequentes descritos como fases aguda, distrófica e atrófica (HARDEN et al., 2013). Mais tarde no consenso realizado pela IASP na cidade de Orlando em 1993, Bonica sugeriu a adoção da terminologia atual de SDCR. Além disso, o mesmo propôs a sua subdivisão em tipos I e II, tendo por finalidade a discriminação de forma clara da síndrome dolorosa não associada à lesão nervosa periférica (SDCR-I) e a causalgia evidenciada pelo acometimento dos nervos periféricos (SDCR-II) (Figura 2) (MERSKEY;BOGDUK,1994; SEBASTIN et al., 2011). Assim, a SDCR foi definida como dor contínua regional (espontânea ou evocada), desproporcional em relação ao tempo e ao curso natural de qualquer trauma/lesão identificável, não estando restrita a um dermatomo específico ou raiz nervosa, e marcada por anormalidades motoras, sensoriais, sudomotoras e vasomotoras, bem como alterações tróficas com progressão variável (BRUEHL, 2015).

Figura 2 - Linha do tempo: contexto histórico da SDCR.²

2 A figura acima cita de forma temporal e resumida fatos importantes relativos à história da Síndrome da dor complexa regional tipo-I (SDCR-I). Dentre eles a primeira possível descrição da doença na literatura (1634), passando pelas diferentes nomenclaturas, até a adoção da nomenclatura vigente e a sua subdivisão em tipos I e II (1993).



Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de HARDEN et al., 2013 e SEBASTIN et al., 2011.

1.1.2 Epidemiologia e etiologia da SDCR-I

Apesar da patogênese ainda incompreendida, a SDCR-I tipicamente se desenvolve a partir de evento nocivo iniciador (lesões, fraturas ou traumas cirúrgicos) sem associação de lesão nervosa. Tão logo, afeta principalmente mulheres (em torno de 75%), na proporção de 3 – 4:1, comumente na faixa etária de 50 – 70 anos de idade (SANDRONI et al., 2003; DE MOS et al., 2007). Segundo Sandroni e colaboradores, nos Estados Unidos, a incidência da SDCR é de 5,46 casos para cada 100.000 habitantes e de 0,82 casos/100.000 habitantes, respectivamente para o tipo I e II (SANDRONI et al., 2003). Além disso, na Holanda, a incidência da SDCR combinada (tipo I e II) atinge a expressiva marca de 26,2 casos para cada 100.000 habitantes (DE MOS et al., 2007). Contudo ainda não está claro o motivo pelo qual algumas pessoas desenvolvem SDCR-I e outras não (ELSHARYDAH et al., 2017).

Conforme citado anteriormente, a patogênese desta síndrome ainda permanece desconhecida, porém se discute o fato de que ela seja uma doença sistêmica cujos mecanismos ainda estão por serem descritos. Segundo Barrett e colaboradores, a SDCR-I decorre da resposta inflamatória exagerada do paciente a uma lesão tecidual (BARRETT; BARNETT, 2016). Isso se sustenta haja vista a

apresentação clínica da SDCR-I durante sua fase aguda, identificada pela presença dos cinco sinais cardinais da inflamação: dor, calor, rubor, edema e perda de função (MARINUS et al., 2011). Ademais, esta síndrome é o resultado final da complexa interação entre o sistema nervoso autônomo (SNA), SNC, sistema nervoso periférico (SNP), sistema imune (SI), bem como os fatores psicológicos e genéticos, os quais possivelmente conduzem ao desenvolvimento das disfunções motoras e sensoriais (BARRETT; BARNETT, 2016).

1.1.3 Sintomas e diagnóstico da SDCR-I

A terminologia SDCR-I evidencia as particularidades dessa doença. O termo “complexa” refere-se à diversidade de sintomas clínicos, os quais acompanham a sintomatologia da dor, enquanto “regional” define a distribuição localizada dos sintomas, normalmente restritos a um dos membros (GIERTHMÜHLEN; BINDER; BARON, 2014). Cabe novamente ressaltar que o principal aspecto da SDCR-I é a dor desproporcional em relação ao tempo e ao evento precipitante. Os pacientes frequentemente apresentam dor em resposta a estímulos táteis inócuos (alodínia) e referem aumento da dor em resposta a estímulos dolorosos (hiperalgesia). Logo, o contato com substâncias frias (acetona ou álcool), por exemplo, podem ativar as vias nociceptivas e a sensação dolorosa poder ser agravada inclusive por estímulos ambientais (umidade e frio) e/ou por fatores emocionais (ansiedade e estresse) (RAJA; GRABOW, 2002). Contudo, embora essencial, a dor não é o único componente da SDCR-I. Os critérios diagnósticos atuais são baseados na tríade de sintomas sensoriais, autonômicos e anormalidades motoras (MERSKEY; BOGDUK, 1994; GOH; CHIDAMBARAM; MA, 2017). Além disso, como supracitado, em 1990 Bonica sugeriu a divisão da SDCR-I em três estágios baseados na progressão dos sintomas (BONICA, 1990). Destaca-se ainda que os estágios, abaixo descritos, podem não ser clinicamente fidedignos, tendo em vista que os pacientes nem sempre desenvolverão os sintomas de forma sequencial. Todavia reconhecer o estágio e as queixas predominantes pelo paciente pode auxiliar na elaboração da estratégia clínica (BRUEHL et al., 2002).

Por conseguinte, o primeiro estágio é reconhecido como a fase aguda da doença, englobando os três primeiros meses. Os sintomas se distinguem pela presença de dor/anormalidades sensoriais (alodínia e hiperalgesia), sinais de disfunção vasomotora e sudomotora, bem como edema proeminente (SEBASTIN, 2011). Nessa perspectiva, tendo em vista as alterações vasomotoras, o membro afetado adquire coloração e temperatura anormais em relação ao membro contralateral (BIRKLEN et al., 1998; WASNER et al., 1990; KORTEKAAS et al., 2015). De forma subsequente, essas persistirão ao longo da evolução da doença somando-se ao desenvolvimento de alterações motoras e tróficas significativas, as quais compõem a fase seguinte denominada distrófica que perdura de 3-9 meses. Por fim, o estágio três compreende o estágio trófico (9-18 meses) quando os sintomas sensoriais decaem, porém os distúrbios vasomotores ainda são significativos e as mudanças motoras e tróficas continuam a evoluir (SEBASTIN, 2011). Na tabela 1 estão descritas as disfunções e as respectivas manifestações clínicas comumente encontradas na evolução da SDCR-I. Ainda dentro desse contexto, existem os sintomas menos específicos, tais como o fenômeno de negligência, no qual o paciente negligencia o membro afetado, adoção de posturas anormais, contraturas e distúrbios psicológicos e psicossociais (SEBASTIN et al., 2011).

Quadro 1 – Disfunções características SDCR-I.³

Disfunções	Manifestações clínicas
SENSORIAIS	Dor contínua em queimação, bem como anormalidades sensoriais (alodínia e hiperalgesia) na parte distal da extremidade afetada. Dor espontânea ou evocada aumenta em resposta a ativação do SNS (dor simpaticamente mantida). Piora da dor em posição ortostática. Alodínia somática profunda.
VASOMOTORAS	Vasoconstrição ou vasodilatação as quais resultam em assimetria na coloração e na temperatura do membro acometido em comparação com o membro contralateral.
SUDOMOTORAS	Normalmente hiperidrose na fase aguda e hipoidrose na fase crônica.
EDEMA	Edema: mais proeminente na fase aguda da doença, podendo involuir ou até mesmo desaparecer durante a progressão para a fase crônica.
MOTORAS E TRÓFICAS	Distúrbios de movimento, dentre eles: bradicinesia, distonia, mioclonus e tremor. Fraqueza, bem como redução da ADM no membro acometido. Aumento ou redução no crescimento de pelos, unhas. Distrofia tecidual. Atrofia da pele, tecido subcutâneo e músculos. Osteoporose e osteopenia focal.

3 A figura ilustra disfunções tipicamente observáveis na Síndrome da dor complexa regional tipo-I (SDCR-I), dentre elas alterações sensoriais e vasomotoras, bem como suas respectivas manifestações clínicas.

Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de HARDEN et al., 2013.

Outra classificação também foi descrita por Steinbroker no final dos anos 50, e embora não seja formal, também descreve de forma importante as características clínicas da doença (STEINBROKER, 1948; RATTI et al., 2015), na qual a temperatura do membro acometido pela SDCR-I permite a distinção entre as fases denominadas “*warm phase*” e “*cold phase*”, respectivamente correlacionadas às fases aguda e crônica da SDCR-I (BRUEHL, 2015). Assim, provavelmente em decorrência a inflamação ocasionada pelo trauma tecidual, durante a *warm phase* o membro afetado apresenta-se proeminentemente edemaciado, hiperidrótico, quente e avermelhado (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008; LI et al., 2010). Em contrapartida, a evolução para a *cold phase* assinala o período de cronificação da doença e corresponde à fase na qual o edema pode envolver ou até mesmo desaparecer e a área afetada torna-se fria e hipodrótica, adquirindo aparência cianótica (IOLASCON et al., 2015; VELDMAN et al., 1993). Por fim, todos os critérios foram redefinidos no consenso da IASP em Budapeste, no ano de 2003, a fim de torná-los mais específicos e estão descritos na tabela 2 (HARDEN et al., 2007).

Quadro 2 – Critérios clínicos para diagnóstico da SDCR-I.

1. Dor contínua, que é desproporcional a qualquer evento incitante.

2. Deve informar pelo menos um sintoma* em três das quatro seguintes categorias:

- Sensorial: relatos de hiperalgesia e/ou alodínia;
 - Vasomotor: relatos de assimetria de temperatura e/ou alterações da cor da pele e/ou assimetria da cor da pele;
 - Sudomotor/Edema: relatos de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose);
 - Motor/Trófico: relatos de diminuição da amplitude de movimento e/ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e/ou alterações tróficas (cabelo, unha, pele).
-

3. Deve exibir pelo menos um sinal* no momento da avaliação em duas ou mais das seguintes categorias:

- Sensoriais: evidência de hiperalgesia (ao pinçar) e/ou alodínia (ao toque leve e/ou à pressão somática profunda e/ou movimento articular);
- Vasomotor: evidências de assimetria de temperatura e/ou alterações na cor da pele e/ou assimetria;
- Sudomotor/Edema: evidência de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose);
- Motor/Trófico: evidência de diminuição da amplitude de movimento e/ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e/ou alterações tróficas (cabelo, unha, pele).

4. Não haver outro diagnóstico que explique melhor os sinais e sintomas.

Fonte: Adaptado de, HARDEN et al., 2013.

1.1.4 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SDCR-I

A fisiopatologia da SDCR-I ainda não possui causa definitiva, porém atualmente acredita-se que esta seja uma doença sistêmica resultante de processos multifatoriais, os quais envolvem mecanismos periféricos e centrais (PARKITNY et al., 2013). Na tabela 3 estão listados alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I. Apesar disso, dada à diversidade de apresentação desta síndrome, a contribuição individual de cada um dos mecanismos para o seu desenvolvimento pode variar de acordo com as particularidades dos pacientes e, provavelmente, com o decurso da doença (SEBASTIN, 2011).

Quadro 3 – Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I.

-
- Disfunção por isquemia-reperusão
 - Sensibilização periférica
 - Sensibilização central
 - Alterações no SNS

- Neuroplasticidade mal adaptativa
- Fatores genéticos e psicológicos

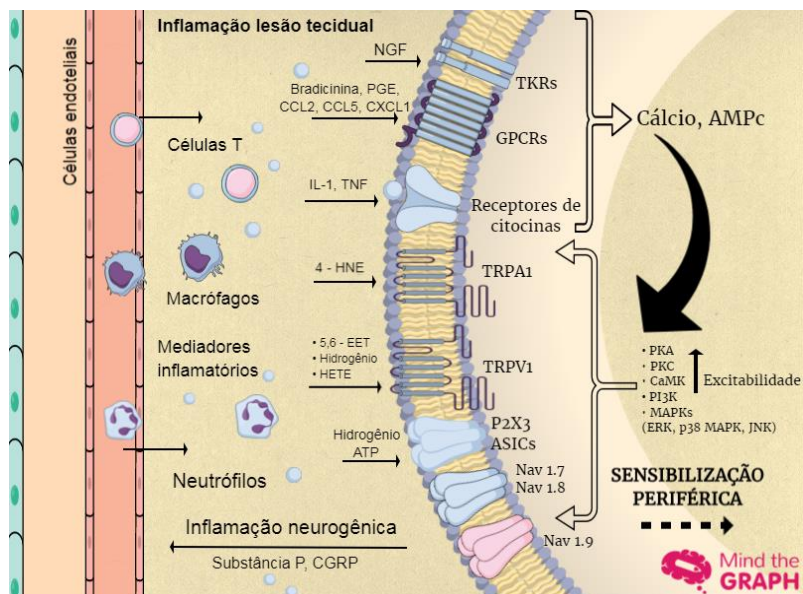
Fonte: Adaptado de, BRUEHL, 2015.

1.1.5 Sensibilização periférica e central

A apresentação clínica da SDCR-I em sua fase aguda sugere que o gatilho para o desenvolvimento de tal condição sejam as respostas imunológicas e pró-inflamatórias ao trauma tecidual (BRUEHL, 2015). Dentro desse contexto, estudo sugere a existência de duas fontes diferentes de inflamação, ambas envolvidas no processo de desenvolvimento e cronificação da dor, sendo elas: i) o dano tissular agudo e ii) a inflamação neurogênica (GAY; BÉRÉNI; LEGRÉ, 2013). A vista disso, secundariamente a lesão, ocorre o processo de sensibilização do sistema nociceptivo (hiperalgesia primária). Assim, o limiar de sensibilidade dos nociceptores localizados nas terminações nervosas livres é reduzido amplificando sua responsividade – processo definido como sensibilização periférica (PS) (Figura 4) (JI et al., 2003; WOOLF, 2011; WOOLF; SALTER, 2000).

Figura 3 – Sensibilização periférica.⁴

4 Lesões teciduais promovem inflamação através do extravasamento plasmático e infiltração de células imunológicas, tais como: neutrófilos, macrófagos e linfócitos. As células infiltradas e residentes liberam mediadores inflamatórios, incluindo: bradicinina, prostaglandinas, prótons hidrogênio, ATP, fator de crescimento neural (NGF), citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6)), quimiocinas pró-inflamatórias (ligante 2 de quimiocina (CCL2), ligante 1 de quimiocina (CXCL1) e CXCL5). Os neurônios nociceptivos expressam receptores para todos esses mediadores inflamatórios. Estes receptores incluem: receptores acoplados a proteína G, receptores ionotrópicos, e receptores de tirosina kinase. A ativação desses receptores resulta na geração de segundos mensageiros (cálcio e AMPc, os quais por sua vez ativam proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), proteína cinase dependente de calmodulina (CaMK), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), proteínas cinases ativadas por mitógenos



Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de Ji et al., 2014.

Nesse caso, a hiperalgesia permanecerá restrita ao local lesionado em parte por conta da exposição dos nociceptores a uma vasta gama de substâncias pró-algésicas e pró-inflamatórias (Figura 4) (HUCHO; LEVINE, 2007), as quais se incluem: bradicinina (BK), ATP, prótons e fatores neurotróficos (BASBAUM et al., 2009). Em paralelo ocorre a liberação direta de neuropeptídeos, tais como, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP),

(MAPK), cinase regulada pela sinalização extracelular (ERK), MAPK-p38 e proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK). A estimulação dessas vias excita e sensibiliza os neurônios nociceptivos – sensibilização periférica – através da modulação de moléculas transdutoras, dentre elas: TRPA1, TRPV1, e condutoras (canais de sódio dependentes de voltagem (Nav). A ativação dos nociceptores também resulta na liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais estão envolvidos no desenvolvimento de inflamação neurogênica.

responsáveis pela propagação da inflamação neurogênica (BIRKLEIN, 2005). Esses atuarão diretamente nas células endoteliais vasculares e musculares lisas de forma a induzir vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente extravasamento plasmático e edema, características importantes da SDCR-I (CHIU; VON HEHN; WOOLF, 2012; ROCKETT, 2014). Além disso, pacientes com SDCR apresentam concentrações elevadas de SP, CGRP, bradicinina e citocinas (IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-2) na circulação sistêmica e no fluido cerebrospinal, destacando a importância desses fatores endógenos em sua patogênese. Somado a isso, a estimulação intensa e persistente dos nociceptores favorece o aumento da excitabilidade dos neurônios nociceptivos a nível espinal, resultando assim no desenvolvimento de sensibilização central (SC) e conseqüentemente na cronificação da dor (Figura 5) (WOOLF, 2011).

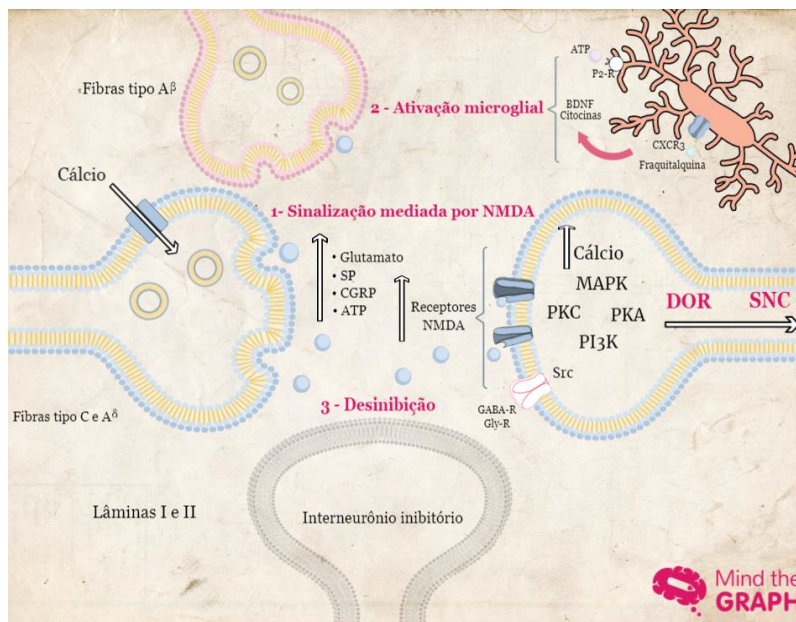
Figura 4 – Sensibilização central.⁵

5

1. Sensibilização mediada pela ação do neurotransmissor glutamato nos receptores N-metil D-aspartato (NMDA). Assim, a partir da intensa/persistente estimulação dos nociceptores na periferia, as fibras do tipo C e A δ ativadas liberam neurotransmissores e/ou mediadores, incluindo (glutamato (GLU), substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e ATP) na lâmina I do corno dorsal da medula espinal. Como consequência ocorre a ativação dos receptores NMDA normalmente silentes, localizados na membrana do neurônio pós-sináptico, como consequência ocorre aumento na concentração intracelular de cálcio, que por sua vez ativa vias de sinalização dependentes de cálcio e segundos mensageiros, incluindo: PKA, PKC, MAPK, PI3K e Src. Isso aumenta a excitabilidade do neurônio de segunda ordem, facilitando a transmissão dos impulsos dolorosos ao SNC.

2. Ativação microglial: as lesões nervosas periféricas conduzem a liberação de ATP e quimiocina (tal como a fraquitilquina), os quais se ligam aos seus respectivos receptores expressos na membrana da célula glial e estimulam a liberação de BDNF. Esse, por sua vez, se liga a receptores TrkB presentes em neurônios na lâmina I, gerando aumento da excitabilidade e conseqüentemente da resposta nociceptiva a estímulos nocivos (hiperalgesia) e também inócuos (alodínia – não ilustrada na figura). As microglias ativadas liberam citocinas, tais como: TNF e IL-1 β , contribuindo para o desenvolvimento da sensibilização central.

3. Desinibição e remodelamento de circuitos: as fibras do tipo C e A δ transmitem informações acerca de estímulos dolorosos aos neurônios das



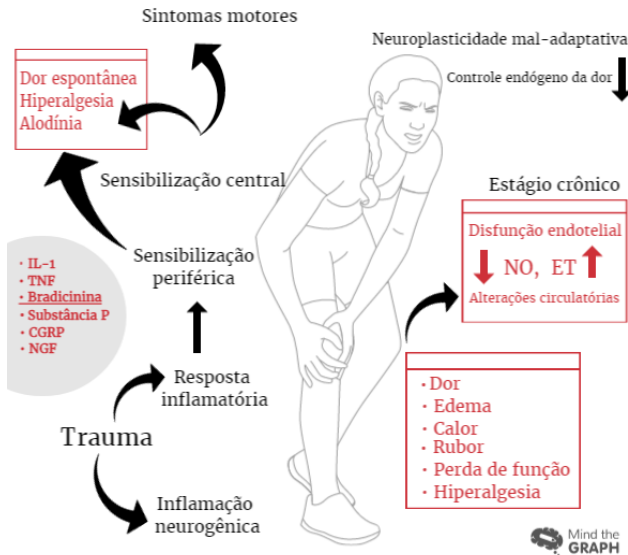
Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de BASBAUM et al., 2010 e KUNER e FLOR, 2017.

Em conjunto essas alterações na via nociceptiva contribuirão para o surgimento da dor espontânea, a partir de estímulos inócuos ou

lâminas I e II da medula espinal, enquanto as fibras do tipo Aβ transmitem informações de estímulos inócuos, através das sinapses com os neurônios localizados em lâminas mais profundas, especificamente na lâmina III. Assim, durante a neuropatia, as fibras Aβ brotam nas lâminas mais superficiais (I e II) gerando cruzamento entre informações dolorosas e inócuas, desencadeando sintomas de alodínia. Ademais, os neurônios que recebem inputs nociceptivos e inócuos são, sinapticamente, conectados e sujeitos a inibição promovida pela atividade dos interneurônios inibitórios liberadores de GABA e/ou glicina. Em determinadas condições, no entanto, pode haver perda física desses interneurônios inibitórios, interferindo assim na modulação da transmissão dolorosa, resultando em hiperalgesia.

exacerbará a resposta em detrimento a estímulos nocivos e poderá propagar além do local da lesão inicial (hiperalgesia secundária), aspectos elementares da SDCR-I (CHENG; JI, 2008; JI et al., 2003; WOOLF, 2009). Em conclusão, ambos os processos de sensibilização central e periférica, bem como os mecanismos inflamatórios associados, parecem contribuir, pelo menos em parte, para algumas das características clínicas observadas na SDCR-I (Figura 6).

Figura 5 – Resumo dos possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SDCR-I.⁶



6 A ocorrência de um trauma/lesão tecidual profunda precede os sintomas clínicos da SDCR-I, e resulta em resposta inflamatória e inflamação neurogênica. A expressão de citocinas pró-inflamatórias no local inflamado conduzirá subsequentemente a sensibilização periférica e central, bem como a neuroplasticidade mal-adaptativa, culminando na percepção sensorial alterada.

Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de MARINUS et al., 2011 e GIERTHMÜHLEN et al., 2014.

1.1.6 Modelo experimental de SDCR-I

Associada a hipótese inflamatória acredita-se também que o desenvolvimento da SDCR-I possa estar atrelado a uma lesão de isquemia-reperfusão (I/R) no membro afetado. Dentro deste contexto, a definição de I/R indica uma redução do fornecimento de sangue arterial aos tecidos, seguido pela restauração da perfusão e consequente re-oxigenação (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Portanto, o termo isquemia deriva da palavra grega "ischaimos", com a seguinte definição iskho = reter e haima = sangue, e denota fornecimento insuficiente de sangue a um determinado tecido em razão de obstrução parcial ou total do fluxo sanguíneo arterial, resultando em hipóxia e disfunção microvascular. Como resultado, a lesão e/ou morte tecidual podem decorrer do dano isquêmico primário *per se* e correlacionam-se com a magnitude e duração da interrupção do suprimento sanguíneo. A reperfusão por sua vez, embora necessária para o reestabelecimento da entrega de nutrientes e oxigênio ao tecido, também é responsável pela exacerbação da lesão isquêmica primária (KALOGERIS et al., 2012). A soma dessas evidências ao fato de que o desenvolvimento da SDCR-I está associado, em parte, à isquemia tecidual e as alterações circulatórias subsequentes a esse processo levaram Coderre e Colaboradores (2004) a desenvolverem o modelo experimental de dor pós-isquemia crônica (DPIC).

A DPIC consiste no modelo experimental *in vivo*, o qual mimetiza as principais características relacionadas à SDCR-I, sem promover lesão nervosa e danos locomotores. Dessa forma este se tornou o modelo experimental viável para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na SDCR-I, tendo sido primeiramente padronizado em ratos e posteriormente adaptado para camundongos (CODERRE et al., 2004).

Assim, o modelo experimental de DPIC consiste na exposição de uma das patas traseiras do animal a um período prolongado de isquemia e reperfusão. Os animais são anestesiados e constatada a ausência de reflexos recebem um anel de borracha na articulação proximal ao tornozelo reduzindo, assim, o fluxo sanguíneo no membro.

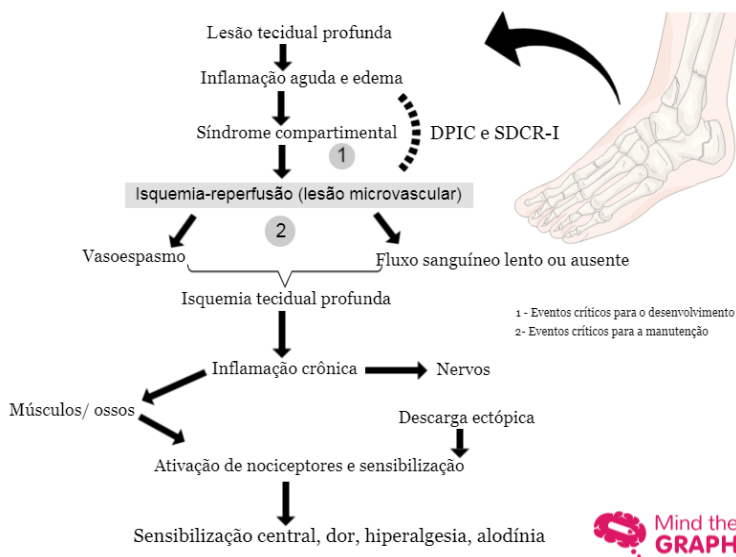
Por conseguinte, após a retirada do torniquete, permite-se a reperfusão do membro e, conseqüentemente, os animais exibem hiperemia local com extravasamento plasmático – fase aguda – com posterior surgimento de hiperalgesia a estímulos nocivos, hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, mas não ao calor – fase crônica (CODERRE et al., 2004). A reperfusão subsequente à isquemia devolve o oxigênio ao tecido e dessa forma favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de provocar intensa inflamação e disfunção endotelial (SLEGTENHORST et al., 2014), processos críticos para a gênese, desenvolvimento, progressão e manutenção da DPIC e SDCR-I.

O fluxo sanguíneo lento ou ausente na microvasculatura de tecidos profundos induz estado inflamatório persistente ativando e sensibilizando as fibras nociceptivas aferentes, promovendo assim a sensação de dor profunda e persistente. Ainda dentro deste contexto, a eficiência do modelo de DPIC fundamenta-se no fato de que os sintomas nos animais são induzidos por lesões físicas comparáveis às lesões presentes nos pacientes com SDCR-I. Isso se levando em consideração o fato de que a SDCR-I é resultante de uma resposta inflamatória anormal a uma lesão tecidual profunda desencadeando uma síndrome compartimental (Figura 7).

Além disso, o modelo de DPIC induz danos microvasculares a partir da formação de EROs, bem como estabelece um círculo vicioso baseado em isquemia, inflamação e excitação de nociceptores. Ainda, Coderre e colaboradores demonstraram que a sintomatologia apresentada pelos animais durante o modelo de DPIC (hiperemia precoce e edema de pata, bem como hiperalgesia mecânica e térmica ao frio de longo prazo (quatro semanas)) se assemelham as características da SDCR-I em humanos. Portanto, o modelo de DPIC tornou-se uma ferramenta pré-clínica importante na busca pela melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I, bem como permite investigar novas possibilidades de intervenções terapêuticas.

Figura 6 – Representação esquemática: mecanismos fisiopatológicos no modelo de DPIC.⁷

7 A figura acima descreve de forma resumida os mecanismos fisiopatológicos desencadeados por lesões, fraturas ou traumas cirúrgicos, e que



Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de CODERRE et al., 2010.

2.2 SISTEMA CALICREÍNA-CININA

O sistema calicreína-cinina (SCC) é um sistema proteolítico importante no controle de diferentes funções fisiológicas e no desenvolvimento de muitas condições patológicas. Esse sistema é composto pelo precursor cininogênio, enzimas proteolíticas definidas como calicreínas (CLCs), peptídeos de cininas e dois receptores acoplados a proteína-G, receptor B₁ e B₂ (DUTRA, 2016). Este sistema tem despertado a curiosidade dos pesquisadores desde 1909, quando Abelous e Bardier observaram sinais de hipotensão em cachorros após a administração de urina humana intravenosa. Anos mais tarde, Emil Karl

possivelmente culminam no desenvolvimento de sensibilização central (dor, hiperalgesia e alodínia).

e colaboradores determinaram a CLCs – pertencentes a uma família de serino-proteases – as quais atuam nos cininogênios de baixo e alto peso molecular, respectivamente, para produzir cininas biologicamente ativas (MOREAU et al., 2005; NEGRAES et al., 2015).

Atualmente, o termo “cininas” é utilizado para designar peptídeos gerados a partir de “estoques” no sangue ou em tecidos, os quais são farmacologicamente ativos no músculo liso e produzem alterações na tensão arterial (NEGRAES et al., 2015). Portanto, as cininas são descritas como hormônios vasoativos – derivados sanguíneos e teciduais – os quais consistem principalmente no nonapeptídeo bradicinina (BK, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), decapeptídeo Lys-BK ou calidina e seus metabólitos, des-Arg⁹-BK (DABK) e des-Arg¹⁰-KD (DAKD) (QADRI; BADER, 2017). Especificamente em relação à BK, esta por sua vez ficou conhecida a partir de 1949, quando os pesquisadores brasileiros Professores Maurício Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo e Gastão Rosenfeld decidiram investigar as propriedades farmacológicas do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca*. Este estudo permitiu à identificação de um novo peptídeo com propriedades hipotensivas, obtido a partir do veneno de cobra, o qual foi batizado de BK (ROCHA-SILVA et al., 1949; MOTTA; TERSARIOL, 2017).

2.2.1 Cininas

No que concerne à formação das cininas existem duas vias clássicas, o SCC: i) tecidual e ii) plasmático. Assim sendo, estas serão derivadas dos cininogênios (de alto e baixo peso molecular) – glicoproteínas sintetizadas primeiramente no fígado. Os cininogênios, por sua vez, serão clivados por enzimas proteolíticas denominadas caliceínas presentes nos tecidos e no plasma, produzindo respectivamente calidina e BK. Estes peptídeos podem ser rapidamente degradados por enzimas coletivamente conhecidas como cininases, dentre as quais estão inclusas: enzima conversora de angiotensina (ECA), endopeptidase neutra (EN), carboxipeptidase N (CPN) e carboxipeptidase M (CPM) (SKIDGEL e ERDÖS, 1998; DUTRA, 2016). As cininases podem ainda ser subdivididas em tipos I (CPN e

CPM) e II (ECA), sendo as cininases do tipo I responsáveis pela clivagem da BK e calidina em seus metabólitos DABK e DAKD (QADRI; BADER, 2017).

2.2.2 Receptores de bradicinina

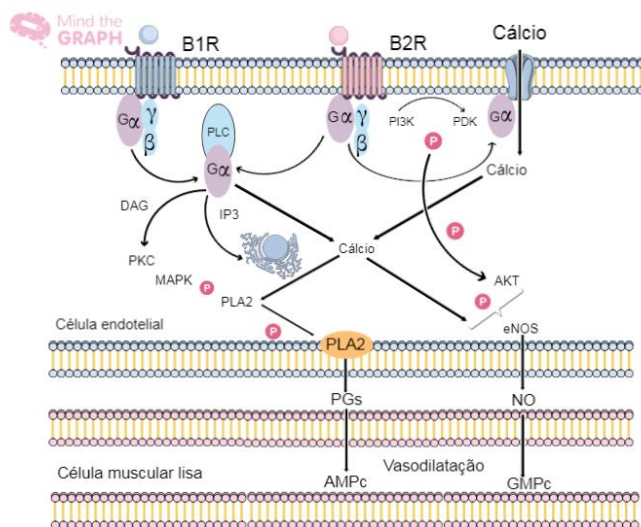
Enquanto, a BK e a calidina têm seus efeitos fisiológicos mediados por dois receptores acoplados à proteína G: i) receptor de BK tipo 1 (B₁R) e ii) receptor de BK tipo 2 (B₂R) (DESPOSITO et al., 2017; MARCEAU; REGOLI, 2004). No entanto, esses receptores diferem com relação a sua expressão nos diferentes tecidos e órgãos. Enquanto o B₂R é constitutivamente expresso em tecidos periféricos e centrais, exceto fígado e baço, e possui maior afinidade para BK e calidina, o B₁R tem sua expressão aumentada em condições patológicas, tais como respostas inflamatórias, álgicas e lesões teciduais, possuindo maior afinidade pelos metabólitos DABK e DAKD (KAKOKI; SMITHIES, 2009; QADRI; BADER, 2017; SHUGHRUE; KY; AUSTIN, 2003). Além disso, existe ainda outra diferença a ser mencionada, já que ambos os receptores parecem atuar em fases diferentes do processo inflamatório. Segundos dados da literatura, o B₂R participa, preferencialmente, da fase aguda da resposta inflamatória e álgica e pode ter sua expressão aumentada em resposta a glicocorticoides, estrogênio, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e citocinas (SCHMIDLIN et al., 1998; SCHERRER et al., 1999; SUN; YE, 2012). Em contrapartida, o B₁R tem sua expressão induzida em condições patológicas (tais como dor, inflamação, lesões teciduais), associado ao aumento na expressão de IL-1 β , TNF e fator nuclear kappa B (NF- κ B), os quais em conjunto contribuem para a resposta inflamatória e álgica durante a fase crônica (DRAY; PERKINS, 1993; DRAY; PERKINS, 1997; RHALEB; YANG; CARRETERO, 2011).

Os B₁R e B₂R são acoplados a proteína G e sua ativação modula diferentes sistemas de segundos mensageiros. Sendo assim, os receptores de cininas medeiam à transdução de sinais através da ativação de fosfolipase C (PLC)/fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato inositol (PIP₂)/1,4,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). As alterações subsequentes na concentração intracelular de Ca⁺² e ativação da PKC

são os estímulos primários responsáveis por induzirem modificações em curto e longo prazo nas funções celulares, as quais incluem liberação de novos mediadores e mitogênese (HOWL; PAYNE, 2003; LÓPEZ-VALDÉS et al., 2010). Consequentemente, ocorre aumento da permeabilidade vascular nas células endoteliais, já que o aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} ativa a via óxido nítrico (NO)/monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Figura 8) (MOREAU et al., 2005). Ademais, a estimulação de ambos os receptores induz não somente a elevação da concentração intracelular de Ca^{+2} , mas também a atividade da fosfolipase A_2 (PLA_2) e a liberação de outros mediadores, tais como: i) NO, ii) prostaglandinas, iii) ácido araquidônico (AA), iv) ativação de vias de proteína-cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e NF- κ B (HIGASHIDA et al., 1986; KAKOKI; SMITHIES, 2009; MORAND-CONTANT; ANAND-SRIVASTAVA; COUTURE, 2010). Assim esses receptores são capazes de desencadear respostas inflamatórias suscitando o desenvolvimento de hipertermia, edema, dor e angiogênese (ORSENIGO et al., 2012; TERZUOLI et al., 2014). Por esta razão, pesquisas anteriores já confirmaram o importante papel dos receptores de cininas em diferentes processos patológicos, incluindo: diabetes, artrite reumatoide, dor neuropática, doença de Parkinson, traumatismo craniano, esclerose múltipla, lesões de I/R, dentre outros (BRUSCO et al., 2017; CORRIGAN et al., 2016; COSTA et al., 2017; DESPOSITO et al., 2017; DUTRA et al., 2013; NIEWIAROWSKA-SENDO; KOZIK; GUEVARA-LORA, 2016; TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010; WANG et al., 2016; YANG et al., 2017). No entanto, embora os receptores B_1 e B_2 estejam envolvidos em uma vasta gama de doenças, seu maior destaque reside na patogênese da resposta inflamatória e álgica. Logo, a modulação farmacológica destes receptores tornou-se alvo em potencial para as terapias de dores crônicas e agudas, e a sua contribuição na transdução da dor, especialmente em síndromes dolorosas crônicas, tem sido amplamente investigada na literatura (COSTA et al., 2017).

Figura 7 - Mecanismo de ação das cininas sobre as células endoteliais. ⁸

⁸ A ligação das cininas des-Arg⁹-BK e BK, respectivamente aos receptores B_1 e B_2 , desencadeiam a dissociação da proteína G em subunidades



Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de MADEDDU; EMANUELI; EL-DAHR, 2007.

Geradas em resposta a inflamação ou lesão tecidual, as cininas são potentes peptídeos algogênicos, e quando formados na periferia são capazes de ativar fibras do tipo C e Aδ em neurônios sensoriais contribuindo para a indução e/ou manutenção da dor e alodínia, bem como a hiperalgesia mecânica e térmica, tanto em humanos quanto em

$G\alpha$ e $G\gamma\beta$. Essa dissociação induz ativação de fosfolipase C (PLC) e liberação de cálcio das reservas intracelulares, bem como ativação de MAPK/fosforilação de fosfolipase A₂ (PLA₂). Além disso, a ativação desses receptores também promove o influxo de cálcio extracelular e consequentemente a amplificação da atividade da PLA₂ e óxido nítrico endotelial sintase (eNOS). Além disso, a PI3K é ativada e por sua vez também ativa cascatas downstream, como a responsável pela fosforilação da AKT que por sua vez ativa eNOS aumentando a produção de óxido nítrico (NO). Esse segundo mensageiro, juntamente com as prostaciclina, conduzirão ao aumento da permeabilidade vascular, induzindo vasodilatação em células da musculatura lisa.

roedores (FERREIRA et al., 2002; MATHIVANAN et al., 2016). Isso porque as cininas, em especial a BK, não somente promovem ativação direta dos nociceptores, mas também atuam na redução do seu limiar de ativação (CALIXTO et al., 2004; PETHO; REEH, 2012). Alguns efeitos indiretos das cininas incluem sensibilizar os nociceptores, via liberação de mediadores pró-inflamatórios e hiperalgésicos (PGs, citocinas e NO, neurocininas (NKs), SP, CGRP) conhecidos por aumentarem a excitabilidade de nociceptores (DRAY; PERKINS, 1997; PETHO; REEH, 2012). A ativação da PLA₂, como supracitado, resultará na liberação do AA e subsequentemente na produção de PGs via ação da enzima ciclooxigenase (COX). Os metabólitos da COX produzidos em resposta a estimulação dos B₁R e B₂R, são capazes de ativar canais iônicos sensíveis ao calor, tal como o receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), incitando assim o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor (HUANG; PLAYER, 2010; MATHIVANAN et al., 2016). No entanto, a participação dos receptores de BK na hiperalgesia térmica ao frio ainda não é bem compreendida. Isso porque a BK inibe os canais TRPM8, principais responsáveis por detectar temperaturas frias, aumentando o limiar de sensibilidade ao frio (LINTE et al., 2007). Em contrapartida, a BK pode ativar canais TRPA1, descritos por muitos autores como possivelmente associados à detecção de frio nocivo, principalmente em lesões ou condições inflamatórias (BANDELL et al., 2004). Apesar disso, ainda não existe consenso na literatura a respeito do papel de TRPA1 como intermediário das sensações de frio (BASBAUM et al., 2009). Em conjunto, essas ações reforçam a hipótese da participação das cininas no processo de sensibilização periférica (COUTURE et al., 2001; QUINTÃO et al., 2008; SCHUELERT et al., 2015).

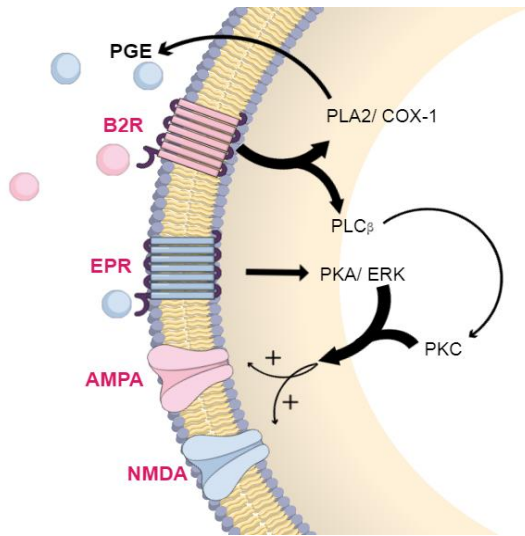
Além disso, os receptores de BK participam ainda da manutenção da resposta inflamatória e algica, conforme evidências já descritas na literatura (MEINI et al., 2011; SHARMA; BUCHANAN, 1994). Dentro deste contexto, o influxo sensorial promovido pela ativação dos nociceptores produz aumento atividade-dependente na eficiência sináptica em neurônios do gânglio da raiz dorsal, durante as etapas da sensibilização central (Figura 4), conduzindo ao desenvolvimento de hiperalgesia (COOK et al., 1987; KOHNO; WANG;

AMAYA, 2008; WANG; COUTURE; HONG, 2014). A BK também medeia à transmissão dos impulsos nociceptivos centralmente ao ativar múltiplas cinases nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, potencializando a liberação e ação sináptica do GLU na medula espinal, contribuindo para o desenvolvimento de hipersensibilidade dolorosa dependente dos receptores NMDA e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) (Figura 9) (KOHNO; WANG; AMAYA, 2008; WANG; COUTURE; HONG, 2014). Não obstante, Ferreira e colaboradores forneceram evidências importantes referentes à ação das cininas no processamento nociceptivo espinal, através da interação com os receptores B₁ e B₂ expressos na medula espinal (FERREIRA et al., 2002). Outros trabalhos por sua vez, também demonstraram o aumento da atividade comportamental nociceptiva após a administração i.t. de BK, assim como o efeito inibitório do antagonista B₂ na redução da hiperalgesia associada à sensibilização central (BUJALSKA-ZADROZNY et al., 2013; CHEN, 2007; WANG et al., 2005). Costa e colaboradores demonstraram a participação dos receptores B₁ e B₂ na sensibilização do receptor de potencial transitório vanilóide tipo-4 (TRPV4), através da proteína cinase C ϵ (PKC ϵ), durante o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica no modelo experimental de neuropatia periférica induzida por paclitaxel (PTX) (COSTA et al., 2011). Outro achado importante está no fato de que o uso de fármacos inibidores da ECA por pacientes em quimioterapia deve ser reavaliado, considerando que a inibição da ECA poderia exacerbar a síndrome dolorosa induzida pelo PTX (BRUSCO et al., 2017). Ainda, outras evidências demonstraram o papel essencial dos receptores B₁ no desenvolvimento da dor neuropática. Por exemplo, animais nocautes para os receptores B₁ submetidos ao protocolo de ligação parcial do nervo ciático apresentaram redução significativa da hiperalgesia mecânica e térmica (FERREIRA et al. 2005). Ademais, no modelo experimental de esclerose múltipla, o uso de antagonista para o receptor B₁ também se mostrou eficaz na modulação da hiperalgesia mecânica e térmica induzidos pelo modelo (DUTRA et al., 2013). Em suma, esses achados supramencionados demonstram o papel fundamental dos receptores de BK no desenvolvimento da dor neuropática, bem como do

potencial terapêutico dos seus antagonistas para o seu devido tratamento (COSTA et al., 2017; FERREIRA, 2005).

Figura 8 – Bradicinina e a neurotransmissão glutamatérgica.⁹

9 A figura acima ilustra de forma resumida o possível mecanismo pelo qual a BK potencializa a sinalização mediada pelos receptores AMPA e NMDA no corno dorsal da medula espinal. Os receptores B₂ são co-expressos no corno dorsal da medula espinal com a PKA e a PKCε. Tão logo, a ativação de B₂R induz a ativação da subunidade Gα (não ilustrada na figura). A subunidade Gα por sua vez estimula PLCβ e PLA₂. A PLC ativa PKCε via diacilglicerol (DAG) e liberação de cálcio microssomal. PLA₂ ativa a liberação de ácido araquidônico (AA), o qual é convertido por meio da ação da ciclooxigenase (COX) e das prostaglandinas sintases em prostaglandina E₂ (PGE). Esta por sua vez atua em receptores de EPR (do inglês, prostaglandin E receptor) ativando a PKA e conseqüentemente a PKC, as quais podem ativar de forma direta ou indireta a fosforilação de subunidades de receptores AMPA e NMDA, aumentando seu tráfico para a membrana, e conseqüentemente aumentando a eficiência sináptica e facilitação da transmissão dos impulsos nociceptivos na medula espinal.



 Mind the
GRAPH

Fonte: Ilustração elaborada pela autora, a partir de KOHNO et al., 2009.

2. JUSTIFICATIVAS

Conforme supracitado, a SDCR-I é uma patologia multifatorial, cujos sintomas coexistem com comorbidades psicológicas e psicossociais. Isso porque, as condições impostas pela doença comprometem a autonomia dos pacientes gerando limitações que comprometem a qualidade de vida dos mesmos e conduzem as manifestações psicológicas de ansiedade e depressão, associada às frustrações frente à ineficácia dos tratamentos (PONTE et al., 2017). Além disso, dada a sua complexidade e natureza multifatorial, é improvável que a focalização de um mecanismo específico seja efetiva para o controle dos sinais e sintomas típicos da doença (GOH; CHIDAMBARAM; MA, 2017). Dessa forma torna-se importante investigar os mecanismos associados ao desenvolvimento da SDCR-I, buscando novos alvos terapêuticos em potencial, tal como os receptores de BK, dada a sua participação nas respostas inflamatórias e algícas, bem como nos processos de sensibilização central, periférica e inflamação neurogênica – todos envolvidos na patogênese da SDCR-I (ASHMAWI; FREIRE, 2016; BRUEHL, 2010).

Em continuidade, o estudo realizado por Blair e colaboradores (1998) destacou a presença de elevados níveis de BK e CGRP em pacientes com DSR, enquanto mais tarde outro grupo de pesquisadores identificou a possível participação da BK como mediadora da sensibilização de nociceptores periféricos (WANG et al., 2006). De modo relevante, de MOS e colaboradores (2008) também demonstram possível interação entre fármacos anti-hipertensivos inibidores da ECA com o aumento do risco de desenvolvimento de SDCR, considerando que esses fármacos reduzem a degradação de substância P e BK, ECA-dependente. Dessa forma, fármacos inibidores da ECA, tal como o captopril, poderiam tornar os neurônios do SNC e/ou SNP mais sensíveis a estímulos dolorosos (BORSOOK; SAVA, 2009).

Assim, esses achados reforçam a possível participação dos receptores de BK no desenvolvimento da SDCR-I, e a importância da investigação acerca desse sistema na melhor compreensão da origem da SDCR-I e/ou na descoberta de novos alvos terapêuticos. A partir disso, a hipótese do presente trabalho reside no possível envolvimento dos

receptores de BK – B₁R e B₂R – na gênese e manutenção dos sinais e sintomas, incluindo a dor crônica, no decurso do modelo experimental de DPIC.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse projeto foi investigar a participação dos receptores de BK – B₁ e B₂ – na gênese e/ou progressão do modelo experimental da SDCR-I (DPIC) em camundongos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração intraperitoneal de antagonistas seletivos para os receptores de BK no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC em camundongos machos;
- Investigar o efeito da administração intraplantar de antagonistas seletivos para os receptores de BK no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC;
- Analisar o efeito da administração intraplantar de agonistas seletivos para os receptores de BK no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC;
- Avaliar o efeito da administração intratecal de antagonistas seletivos para os receptores de BK na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidas pela DPIC;
- Investigar o efeito da administração de oligonucleotídeos antisense seletivos para os receptores de BK no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC;
- Analisar o efeito da administração de captopril no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC, na presença ou na ausência dos antagonistas seletivos para os receptores de BK;
- Avaliar o efeito da administração intraperitoneal de antagonistas seletivos para os receptores de BK no edema de pata e na hiperalgesia mecânica e térmica ao frio induzidos pela DPIC em camundongos fêmeas;

- Quantificar os níveis de BK na medula espinal e pata dos animais após a indução da DPIC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas de plástico (máximo 15 animais/gaiola, dimensões 49 x 34 x 16 cm ou máximo 05 animais/gaiola dimensões 32 x 20 x 21), localizadas no biotério setorial BIO ARA de camundongos do Departamento de Ciências da Saúde/Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde (CTS/ARA/UFSC), o qual possui ambiente climatizado – ar condicionado Split – ajustado para $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (07h00min/19h00min). A água potável e ração comercial para roedores fornecida pelo Biotério Central da UFSC foram oferecidas *ad libitum*. Os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo: CEUA/UFSC PP00956). O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar a instalação dos processos álgicos. Por fim, todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme a normatização atual do CONCEA e da CEUA/UFSC, assim como está embasado no princípio dos 3Rs (substituição, redução e refinamento).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL

A SDCR-I foi induzida pela lesão por isquemia-reperusão (IR) em camundongos. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal, por meio do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, foram posicionados três anéis elásticos com 1,3 mm de diâmetro interno (elástico ligadura 60.03.302, marca: Morelli) proximal à articulação do tornozelo da pata posterior direita, de modo a fazer um torniquete. Os animais foram mantidos sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial por três horas e, após o período de isquemia, o anel foi cortado permitindo a

reperfusão da pata. Após a realização do protocolo de I/R, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, voltando posteriormente ao biotério de manutenção. Por fim, nos dias dos experimentos, os animais foram aclimatados ao ambiente de experimentação por pelo menos 1 hora antes dos testes, e homoganeamente distribuídos entre os diferentes grupos experimentais, descritos abaixo (Figura 10).

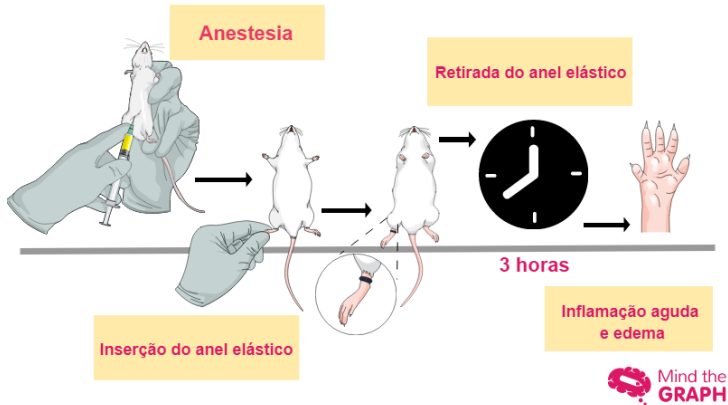
Cabe aqui salientar que a opção pela inserção de três elásticos na pata baseou-se nos resultados obtidos em protocolos pilotos realizados em camundongos machos, objetivando prolongar a permanência do edema de pata nos animais. Diferentemente dos machos, as fêmeas receberam a inserção de apenas um elástico, considerando que durante a padronização do protocolo experimental com três elásticos, essas desenvolveram intenso processo inflamatório com presença de necrose tecidual.

Assim, considerando o Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa, o qual preconiza: "...que a prevenção de dor e distresse potencial requerem conhecimento do controle e manuseio do animal, seu comportamento normal e o que pode ser esperado se os procedimentos utilizados causarem efeitos adversos nele", ainda estabelece que "...em protocolos experimentais que envolvem morte como desfecho provável, a escolha de um ponto final humanitário adequado é ainda mais importante para abreviar o sofrimento de animais que progredirão inexoravelmente para a morte. O uso de pontos finais humanitários contribui para o refinamento provendo uma alternativa aos pontos finais experimentais no caso de dor ou distresse grave nos animais". Por esta razão, esses animais foram eutanasiados com superdosagem de barbitúrico + anestésico local (pentobarbital 250 mg/kg + lidocaína 10 mg/ml, i.p.) (conforme Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013 - Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal – CONCEA, 2013).

Destaca-se ainda que apesar da diferença com relação ao número de elásticos, as fêmeas desenvolveram hiperalgesia e edema de pata de maneira semelhante aos machos, sem prejuízos na execução dos protocolos experimentais propostos.

Figura 9 - Ilustração do protocolo de indução da DPIC.¹⁰

Protocolo experimental Dor Pós - Isquemia Crônica (DPIC)



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

4.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA

O edema de pata foi quantificado através de micrômetro digital 0-25 mm (Zaas Precision) posicionando a parte fixa na superfície dorsal e a parte móvel do aparato na superfície plantar central. O volume da pata foi representado pela diferença (Δ) entre a medida do volume da pata após a indução da DPIC e a medida basal da pata em função do tempo.

10 Para a indução da dor pós-isquemia (DPIC) os animais foram anestesiados e após a constatação da ausência de reflexos, receberam na articulação proximal ao tornozelo um anel de borracha (torniquete). O anel elástico permaneceu inserido na articulação durante três horas, de forma a induzir uma lesão isquêmica no membro. Ao fim das três horas o anel foi retirado permitindo a reperusão no membro, induzindo a formação de edema e processo inflamatório em decorrência da lesão de isquemia-reperusão (I/R).

4.4 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA

4.4.1 Hiperalgisia mecânica

O desenvolvimento da hiperalgisia mecânica foi avaliado através dos filamentos de *von Frey* (0,6 g) pelo método de frequência de retirada (BORTALANZA et al., 2002). Os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico (9 x 7 x 11 cm) em plataformas de arame elevadas, as quais permitem o acesso à superfície ventral da pata traseira direita dos animais. A frequência de resposta de retirada foi avaliada após 10 aplicações (com intervalo de 3 segundos) dos filamentos de *von Frey* (VFH, Stoelting, Chicago, IL, EUA). Para determinar o limiar basal, todos os grupos (controles e intervenção/tratamentos) foram avaliados antes da indução da doença – medida basal.

4.4.2 Hiperalgisia térmica ao frio

Para a avaliação da hiperalgisia térmica ao frio, utilizou-se o método da acetona adaptado de Walczak e Beaulieu (WALCZAK e BEAULIEU, 2006). Os camundongos foram alocados em compartimentos de acrílico transparente (8 x 8 x 18 cm) com plataformas de arame elevadas e aclimatizados durante 30 minutos. Após a aplicação de um borrifo de 20 μ l de acetona na pata direita traseira do animal, a resposta foi avaliada cronometrando-se o tempo em que o animal recolheu, sacodiu, lambeu ou mordeu a pata no período de 20 segundos após o estímulo nocivo. Nesse protocolo foram realizadas três medidas do tempo de resposta em todos os grupos (controles e intervenção/tratamentos).

4.4.3 Protocolo experimental

Primeiramente, o protocolo experimental consistiu na administração dos antagonistas seletivos para os B₁R e B₂R, através de três diferentes vias: i) intraperitoneal (i.p.) – camundongos machos e fêmeas, ii) intraplantar (i.pl.) e iii) intratecal (i.t.), a fim de caracterizar a

participação dos receptores B₁ e B₂ em nível periférico (administração sistêmica e local) e central, respectivamente. Ademais, avaliou-se a aplicação i.pl. de agonistas seletivos para os B₁R e B₂R, nessa ordem DABK e Tyr-BK, seria capaz de exacerbar a hiperalgesia induzida pela DPIC. Além disso, avaliou-se o efeito da administração i.t. de oligonucleotídeos antisense específicos para o B₁R (5' AGGTTCTGTGGATGGCGTCCC-3') e o B₂R (5' AGAATTCTGTTCACGTGTTTCTTCCCTG-3') durante o desenvolvimento da DPIC, enquanto os animais controles receberam a administração de oligonucleotídeo mismatch (5'-GGTGGATTTGAGGATTTTCGGC-3'). Por fim, avaliou-se o tratamento com captopril na presença ou ausência dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ no décimo quarto dia pós-isquemia. Na tabela abaixo, seguem listadas as doses utilizadas dos antagonistas e agonistas seletivos para os B₁R e B₂R nos respectivos experimentos. Na sequência estão ilustrados os protocolos experimentais realizados nesse estudo (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15).

Quadro 4 – Protocolos experimentais e as respectivas doses utilizadas.

Via i.p.¹¹ HOE-140 (150 nmol/kg) e DALBK (50 nmol/kg)
(Dutra et al., 2012)

Via i.pl. HOE- 140 (10 nmol/pata) e DALBK (10 nmol/pata)
(Ferreira et al.,2004)

Via i.pl. Tyr-BK (10 nmol/pata) e DABK (20 nmol/pata)
(Ferreira et al.,2004)

Via i.t. HOE-140 (100 nmol/ sítio) e DALBK (10 nmol/sítio)
(Ferreira et al.,
2002)

Antisense Antisense B₂R (2,5 µg/sítio) e B₁R (2,5 µg/sítio)
(Costa et al.,

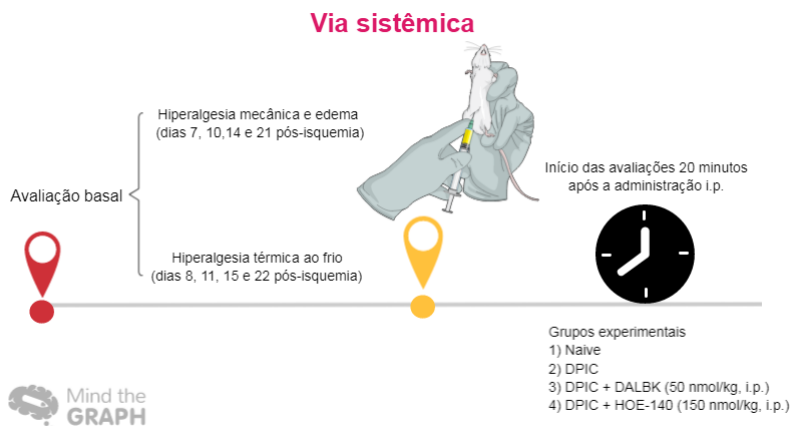
11 Experimento realizado em camundongos *Swiss* machos e fêmeas.

2010)

Captopril 30 mg/kg (via oral)
(Ferreira et al.,2017)

Fonte: Elaborada pela autora.

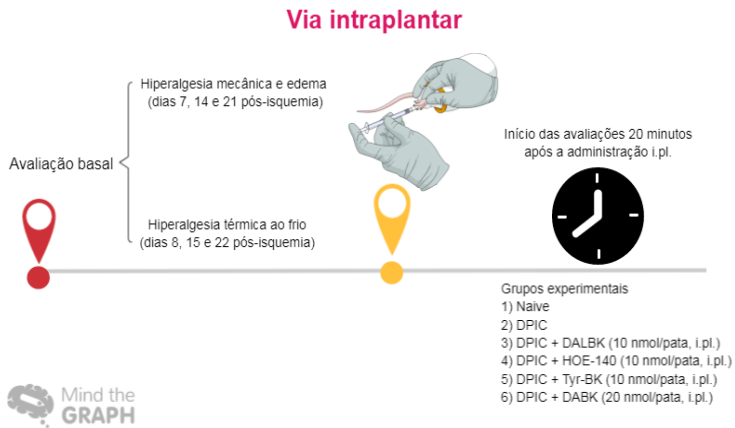
Figura 10 – Administração intraperitoneal de antagonistas seletivos para os B₁R e B₂R.¹²



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Figura 11 – Protocolo experimental: administração intraplantar de agonistas e antagonistas seletivos para os B₁R e B₂R.

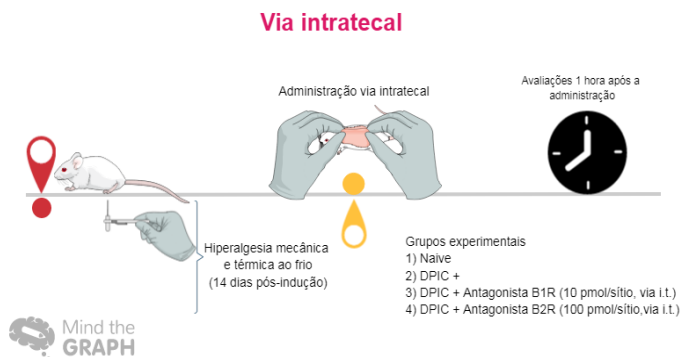
12 Os peptídeos DALBK (antagonista B₁R) HOE-140 (antagonista B₂R), Tyr-BK (agonista B₂R) e DABK (agonista B₁R) foram administrados por via intraplantar (i.pl.) após avaliação basal da hiperalgisia mecânica (pelo método de *von Frey* utilizando filamentos de 0,6 g) e edema nos dias 7, 14 e 21 pós-isquemia. Durante os dias 8, 15 e 22 foram realizadas as avaliações de hiperalgisia térmica ao frio pelo método da acetona.



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

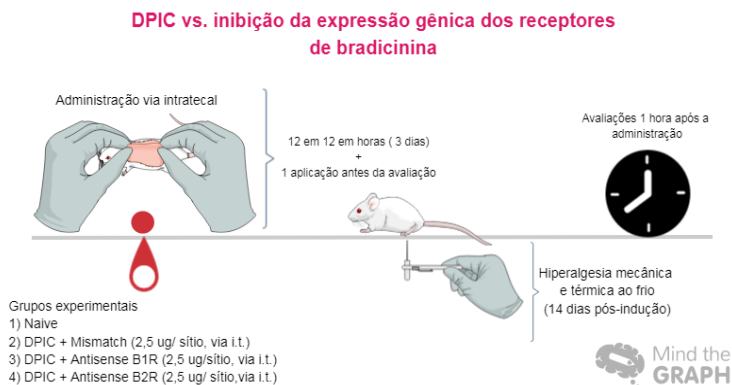
Figura 12 – Protocolo experimental: administração intratecal de antagonistas seletivos para os B₁R e B₂R.¹³

¹³ Os peptídeos DALBK (antagonista B₁R) e HOE-140 (antagonista B₂R) foram administrados por via intratecal (i.t.) após avaliação basal da hiperalgésia mecânica (pelo método de *von Frey* utilizando filamentos de 0,6 g) e térmica ao frio (pelo método da acetona), no décimo quarto dia pós-isquemia.



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

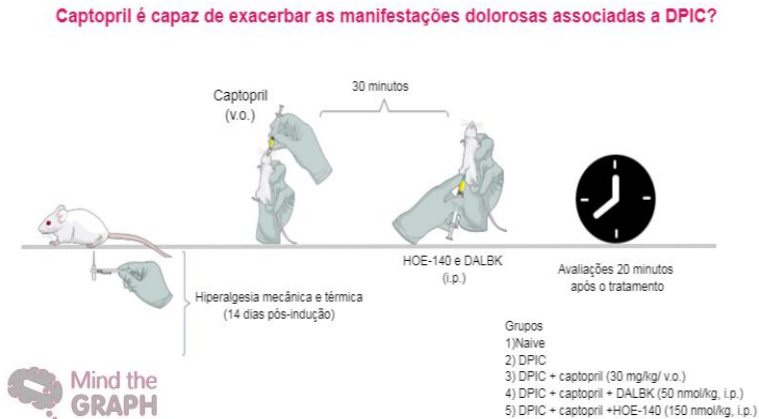
Figura 13 – Protocolo experimental: administração intratecal de oligonucleotídeos antisense específicos para os B₁R e B₂R.¹⁴



14 Os oligonucleotídeos antisense B₁R ou antisense B₂R foram administrados por via intratecal (i.t.) após as avaliações basais de hiperalgesia mecânica (pelo método von Frey) e térmica ao frio (pelo método da acetona), no décimo quarto dia pós-lesão.

Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

Figura 14. Protocolo experimental: efeito do captopril na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.¹⁵



Fonte: Ilustração elaborada pela autora.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BRADICININA

Para análise do peptídeo BK foram utilizados os tecidos das patas e medulas espinais coletadas dos animais dos grupos controle e DPIC. Após a dissecação, as amostras foram homogeneizadas com tampão fosfato (PBS) contendo: Tween 20 (0,05%), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de

15 O fármaco inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) (captopril) foi administrado por via oral (v.o.) após as avaliações basais de hiperalgesia mecânica (pelo método *von Frey*) e térmica ao frio (pelo método da acetona), no décimo quarto dia pós-isquemia. Cerca de 30 minutos após a administração do captopril, os peptídeos DALBK (antagonista B_{1R}) e HOE-140 (antagonista B_{2R}) foram administrados por via intraperitoneal (i.p.).

benzametônio (0,1 mM). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6900 rpm por 10 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para posterior análise. O conteúdo proteico total foi mensurado do sobrenadante pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de calibração com BSA (0,05 a 0,5 mg/ml). Alíquotas de 100 µl foram utilizadas para avaliar os níveis do peptídeo BK, através de kits de ELISA DuoSet para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), segundo instruções do fabricante. O nível da BK foi mensurado pela interpolação da curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) no leitor de placas (Berthold Technologies, Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha), e os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

4.6 REAGENTE E DROGAS

Os oligonucleotídeos antisense para o B₁R (5'-AGGTTCTGTGGATGGCGTCCC-3') e o B₂R (5'-AGAATTCTGTTCCTACTGTTTCTTCCCTG-3'), assim como o mismatch (5'-GGTGGAT TTGAGGATTTCCGGC - 3') foram obtidos da empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e foram diluídos em solução salina (NaCl 0,9%), seguindo a recomendação do fabricante. Os peptídeos HOE-140 (antagonista B₂R), DALBK (antagonista B₁R), Tyr-BK (agonista B₂R), DABK (agonista B₁R) e captopril (inibidor da ECA) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e diluídos em solução NaCl 0,9%. Todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram obtidos de empresas químicas e/ou biotecnológicas, e de grau analítico adequado.

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (HAJI et al.). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (MICHOT et al.) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post hoc de Bonferroni. Valores de P

menores a 0,05, 0,01 e 0,001 foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

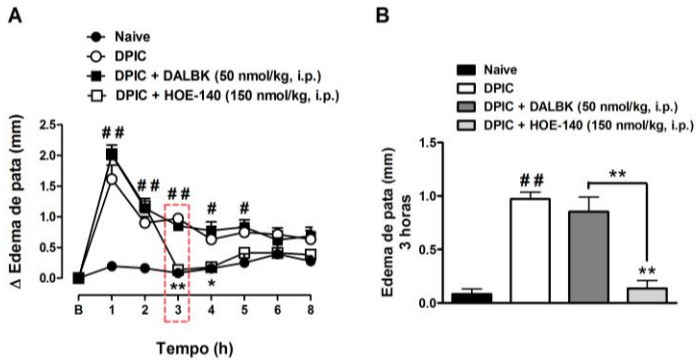
5. RESULTADOS

5.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I.P. DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES B₁ E B₂ IMEDIATAMENTE APÓS A INDUÇÃO DA LESÃO DE I/R NA PATA DE CAMUNDONGOS.

Inicialmente, verificou-se a participação dos receptores de BK na resposta aguda ao dano isquêmico, através do protocolo de DPIC padronizado por Coderre e colaboradores. Assim, após a indução da lesão de I/R, os animais foram imediatamente tratados com os antagonistas seletivos para os receptores B₁ (DALBK, 50 nmol/kg, i.p.) e B₂ (HOE-140, 150 nmol/kg, i.p.). Conforme observado na Figura 15, o tratamento com HOE-140 inibiu significativamente o edema de pata induzido pela lesão de I/R, quando comparado aos animais do grupo controle sem tratamento (Figura 15A), particularmente três horas após o início do tratamento (Figura 15B). Em contrapartida, o tratamento com DALBK (50 nmol/kg, i.p.) não apresentou tal efeito (Figura 15).

Figura 15 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ no edema de pata logo após a indução da DPIC (dia 0).¹⁶

16 Edema de pata foi avaliado (A) e a área sob a curva (B). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus + HOE-140 e DALBK. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias (painel A), ANOVA de uma via (painel B), seguidas pelo teste post-hoc de Bonferroni).



Fonte: Elaborada pela autora.

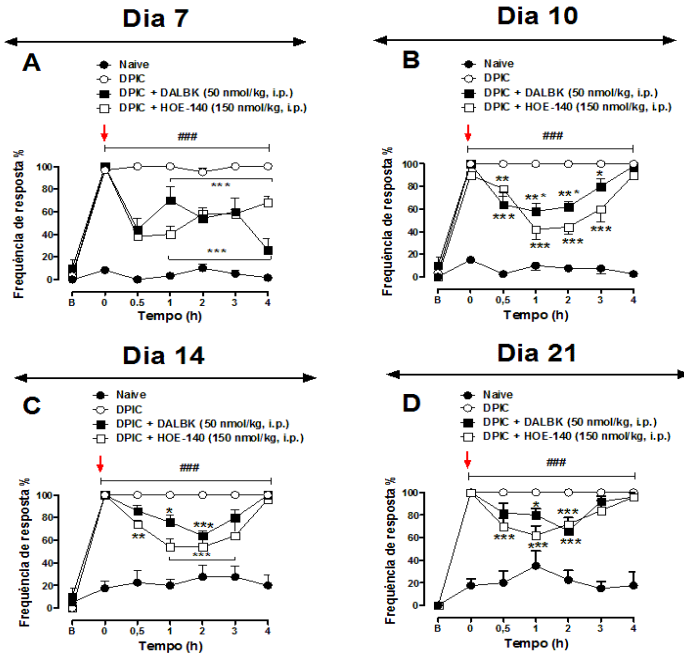
5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES B₁ E B₂ NA HIPERALGESIA fMECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.

Tal como supracitado, o modelo de DPIC permite a reprodução em animais de características clinicamente importantes da SDCR-I em humanos. Dentre essas características incluem-se a hiperalgesia mecânica e térmica ao frio, sendo possível acompanhar o desenvolvimento da doença em animais através da manifestação destes sintomas, os quais se apresentam com maior intensidade a partir do sétimo dia pós-isquemia. Conforme ilustrado na Figura 16A, no sétimo dia após a indução, os animais DPIC apresentaram aumento evidente na frequência de resposta à estimulação com o filamento de *von Frey* utilizado (0,6 g) em comparação com os animais naive ($p < 0,001$). Além disso, a hiperalgesia mecânica persistiu no decorrer do experimento até o 21º dia pós-isquemia (Figura 16A, B, C e D). O tratamento com ambos os antagonistas seletivos para os receptores de BK (B₁ e B₂), respectivamente DALBK (50 nmol/kg, i.p.) e HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.), reduziram de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC em todo o período de avaliação (Figura 16). De forma mais detalhada, nos dias 7 e 10 ambos os tratamentos apresentaram efeito

farmacológico semelhante (Figura 16A e B). Em contrapartida, nos dias 10, 14 e 21, apesar de ambos os tratamentos terem reduzido significativamente a hiperalgesia mecânica, o efeito do antagonista seletivo para o receptor B₂, HOE-140, foi mais expressivo e evidente, conforme ilustrado na Figura 16C e D.

Figura 16 - Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.¹⁷

17 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naïve (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

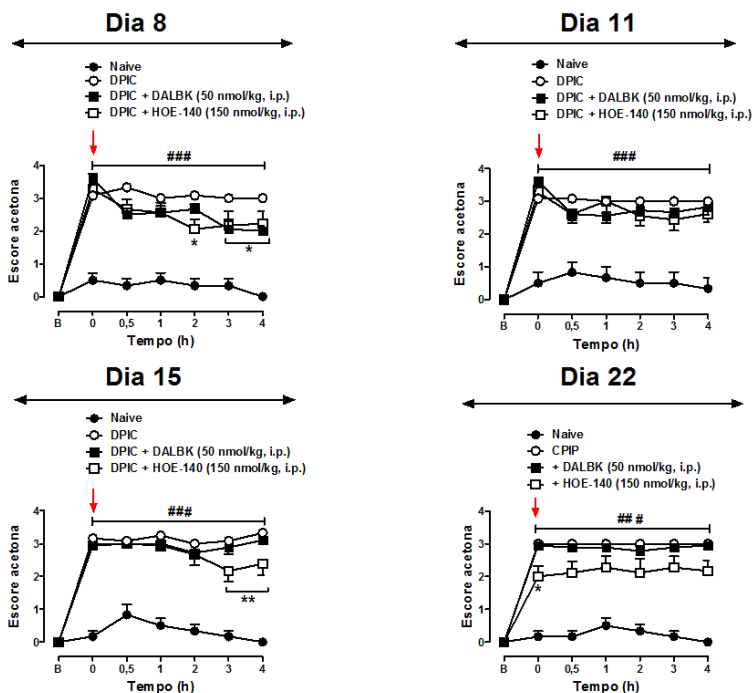


Fonte: Elaborada pela autora.

Outra característica importante da hiperalgesia induzida pela DPIC é o desenvolvimento de hipersensibilidade térmica ao frio e não ao calor. Por esta razão, o objetivo seguinte do presente estudo foi avaliar se a administração sistêmica dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ seria capaz de modular a hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC. Tal como o esperado, os animais do grupo controle apresentaram hiperalgesia térmica em resposta a instilação de acetona na pata acometida quando comparado ao grupo naive (Figura 17). Conforme ilustrado na Figura 17, apenas o tratamento com HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) apresentou efeito discreto na inibição da hiperalgesia térmica ao frio induzido pela DPIC nos dias 8 (Figura 17A) e 15 (Figura

17B) pós-isquemia. Nos outros dias de avaliação, assim como o tratamento com DALBK (50 nmol/kg, i.p.) não apresentaram efeito quando comparado ao grupo controle DPIC (Figura 17).

Figura 17 - Efeito dos antagonistas seletivos para receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.¹⁸



18 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

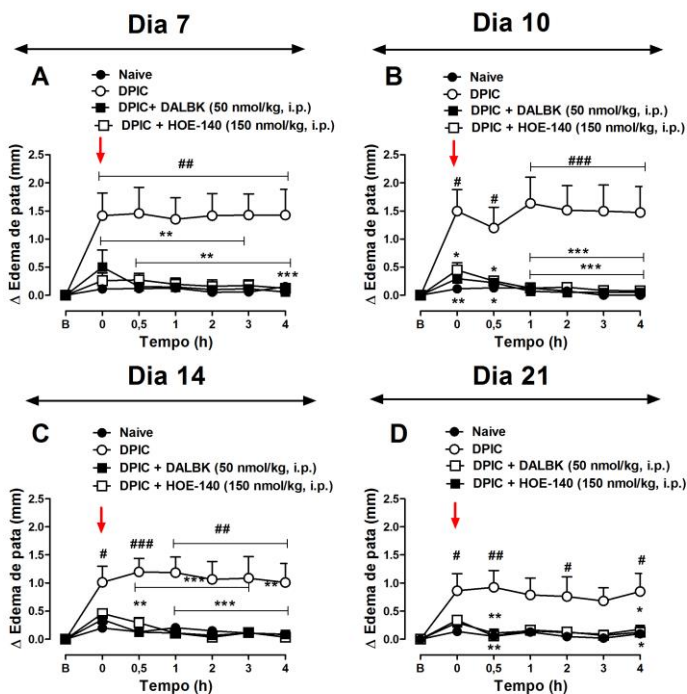
Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS B₁R E B₂R NO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA DPIC.

Além da hiperalgesia (mecânica e térmica), outro sinal importante, tanto no modelo de DPIC quanto nos pacientes com SDCR-I, é a presença de edema proeminente na fase aguda da doença, o qual regride comumente de forma espontânea com o decurso da doença (evolução para a fase crônica). Assim, após a indução, os animais pertencentes ao grupo DPIC apresentaram aumento no volume da pata em comparação com os animais do grupo naive (Figura 18). Interessantemente, os animais tratados com DALBK (50 nmol/kg, i.p.) e HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) apresentaram inibição do edema de pata induzido pela DPIC nos dias 7 (Figura 18A), 10 (Figura 18B), 14 (Figura 18C) e 21 (Figura 18D) pós-isquemia.

Figura 18 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ no edema de pata induzido pela DPIC.¹⁹

19 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



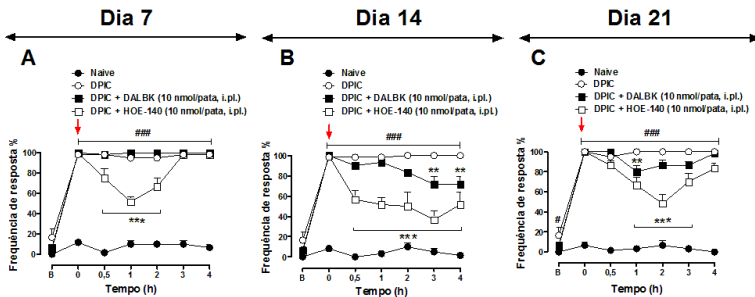
Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS B₁R E B₂R NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.

A segunda etapa deste trabalho consistiu na avaliação do efeito anti-hiperalgésico dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ quando administrados por via intraplantar. Conforme demonstrado na Figura 19, a aplicação i.pl. de HOE-140 (10 nmol/pata) reduziu de forma significativa a hiperalgesia mecânica, quando comparado aos animais controle DPIC ($p < 0,001$) nos dias 7 (Figura 19A), 14 (Figura

19B) e 21 (Figura 19C) pós-isquemia. Em contrapartida, o tratamento local com DALBK (10 nmol/pata) apresentou efeito anti-hiperalgésico discreto no dia 14 (3 e 4 horas pós-tratamento, Figura 19B) e 21 (1 hora pós-tratamento, Figura 19C).

Figura 19 - Efeito da administração intraplantar de antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.²⁰

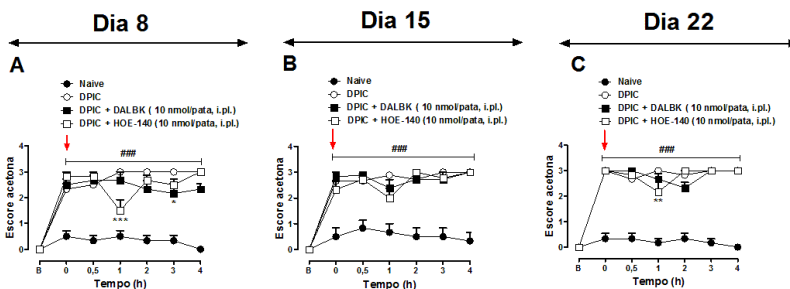


Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, quando comparado aos animais controle DPIC, os animais tratados com o antagonista seletivo para os receptores B₂ (HOE-140) apresentaram moderada resposta, porém significativa redução na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC, nos dias 8 ($p < 0,001$, Figura 20A) e 22 ($p < 0,01$, Figura 20C). No entanto, o mesmo efeito não foi observado nos outros dias de tratamento, assim como nos animais tratados com o antagonista DALBK (10 nmol/pata) (Figura 20).

Figura 20 - Efeito da administração intraplantar de antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.²¹

20 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naíve (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



Fonte: Elaborada pela autora.

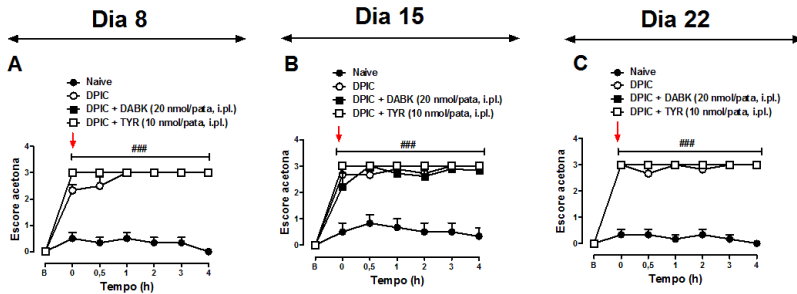
5.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE AGONISTAS SELETIVOS PARA OS B₁R E B₂R NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA AO FRIO INDUZIDA PELA DPIC.

Haja vista a participação das cininas em respostas algícas, o próximo protocolo experimental foi conduzido objetivando avaliar se a aplicação intraplantar de agonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂, respectivamente DABK (20 nmol/pata) e Tyr-BK (10 nmol/pata), seriam capazes de exacerbar a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela DPIC. Conforme demonstrado na Figura 21, os animais tratados com os respectivos agonistas não apresentam diferença estatística quando comparado aos animais do grupo DPIC nos parâmetros de hiperalgesia mecânica (Figura 21) e térmica ao frio (Figura 22), nos períodos avaliados. Tais resultados justificam-se considerando o limiar máximo

21 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

de resposta obtido pelos animais tratados, não se pode observar efeito somatório dos respectivos agonistas.

Figura 21 - Efeito da administração intraplantar de agonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.²²

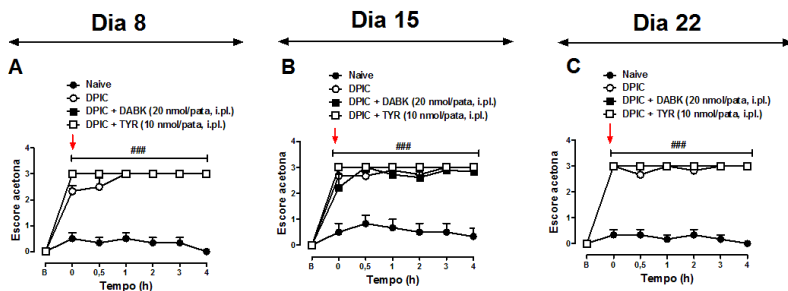


Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 - Efeito da administração intraplantar de agonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC.²³

22 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

23 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



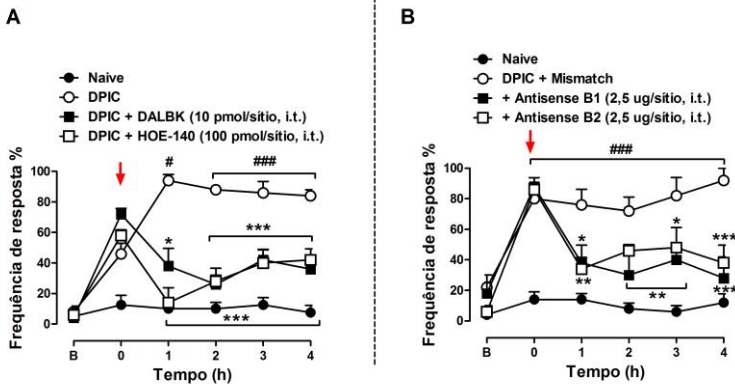
Fonte: Elaborada pela autora.

5.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE ANTAGONISTAS SELETIVOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISENSE PARA OS B₁R E B₂R NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DPIC.

O próximo objetivo do presente projeto foi avaliar o efeito anti-hiperalgésico dos antagonistas seletivos para os receptores de BK, quando aplicados por via intratecal no 14^o dia pós-isquemia. Interessantemente, os tratamentos com DALBK (10 pmol/sítio, i.t.) e HOE-140 (10 pmol/sítio, i.t.) inibiram significativamente a hiperálgia mecânica induzida pela DPIC no 14^o dia pós-isquemia, entre a 1^a-4^a hora após administração (Figura 23A). Posteriormente, o bloqueio da expressão gênica dos respectivos receptores B₁ e B₂ expressos na medula espinal, através da administração i.t. de oligonucleotídeos antisense, inibiram de maneira significativa a hiperálgia mecânica induzida pela DPIC em todos os períodos avaliados (Figura 23B).

Figura 23 – Efeito da administração intratecal de antagonistas seletivos e oligonucleotídeos antisense para os receptores B₁ e B₂ na hiperálgia mecânica induzida pela DPIC.²⁴

24 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 5 animais/grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus



Fonte: Elaborada pela autora.

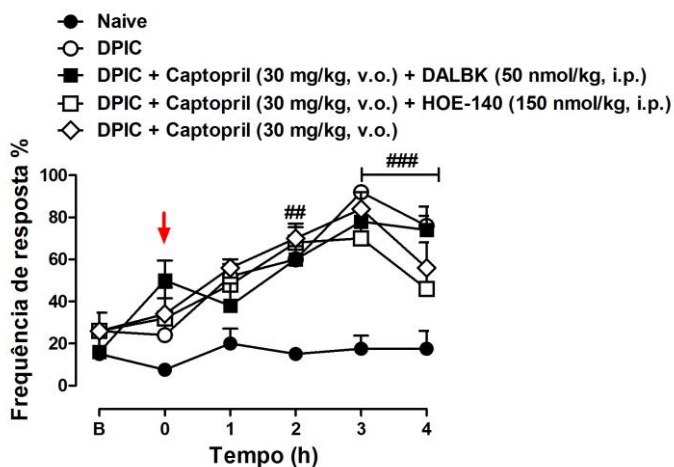
5.7 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ECA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA DPIC.

A fim de investigar a hipótese de que o uso de anti-hipertensivos inibidores da ECA por pacientes com SDCR-I poderia exacerbar o quadro algico, considerando a maior oferta de BK nos tecidos, aqui foi avaliado se o tratamento com captopril poderia exacerbar a hiperalgisia mecânica induzida pela DPIC na presença ou ausência dos antagonistas seletivos para os receptores de cininas. Antes, porém, torna-se necessário destacar que na execução deste experimento os animais receberam apenas um elástico na articulação proximal ao tornozelo durante a indução da DPIC, a fim de mimetizar o efeito hiperalgésico submáximo apresentado pelo modelo experimental. Primeiramente, os animais tratados com captopril (30 mg/kg, v.o.) apresentaram hiperalgisia similar aos animais do grupo DPIC no 14º dia pós-isquemia (Figura 24). Interessantemente, o tratamento oral com captopril reverteu o efeito anti-hiperalgésico dos antagonistas DALBK

grupos tratados, # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

(50 nmol/kg, i.p.) e HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.), confirmando assim a participação da BK na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC (Figura 24).

Figura 24 – Efeito da inibição da ECA na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC.²⁵



Fonte: Elaborada pela autora.

5.8 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ANTAGONISTAS SELETIVOS PARA OS RECEPTORES DE BK NA HIPERALGESIA MECÂNICA, TÉRMICA AO FRIO E EDEMA INDUZIDOS PELA DPIC EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.

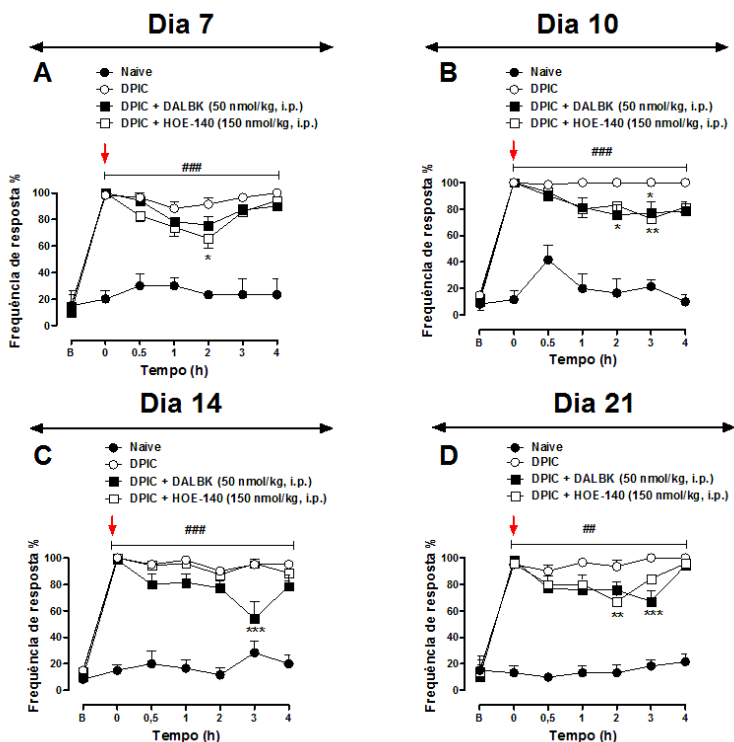
Ainda, considerando os achados acerca das diferenças entre os sexos no perfil inflamatório e neuropático da SDCR-I, o próximo

25 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 5 animais/grupo. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

objetivo do estudo foi avaliar a participação dos receptores de BK em camundongos fêmeas durante o desenvolvimento da DPIC. Assim, de maneira semelhante, os animais do grupo DPIC apresentam hiperalgesia mecânica (Figura 25), hiperalgesia térmica ao frio (Figura 26) e edema de pata quando comparado aos animais do grupo naive. Interessantemente, o tratamento com HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) inibiu de maneira significativa a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC em todos os dias avaliados (Figura 25), exceto no dia 14 pós-isquemia (Figura 25C). O tratamento com DALBK inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC apenas no 14º após a indução da lesão de I/R (Figura 25C). Ademais, os tratamentos com os antagonistas seletivos para os receptores de cininas parecem não modular a hiperalgesia térmica ao frio (Figura 26) e o edema de pata (Figura 27) nas fêmeas, muito embora, o HOE-140 (150 nmol/kg, i.p.) tenha inibido esse comportamento do 15º após a indução da lesão de I/R (Figura 16C).

Figura 25 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia mecânica induzida pela DPIC em fêmeas.²⁶

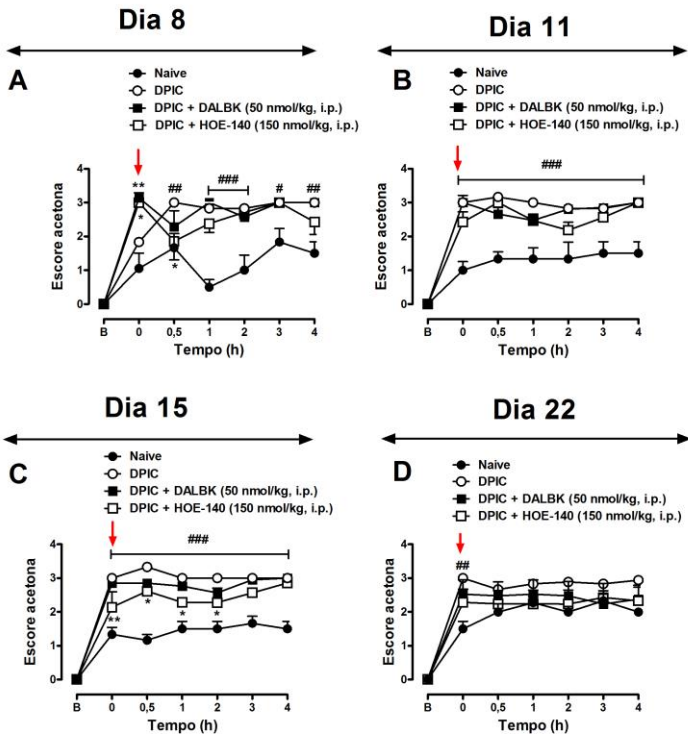
26 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, #p<0,05, ##p<0,01 e ###p<0,001 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 – Efeito dos antagonistas seletivos para receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC em fêmeas.²⁷

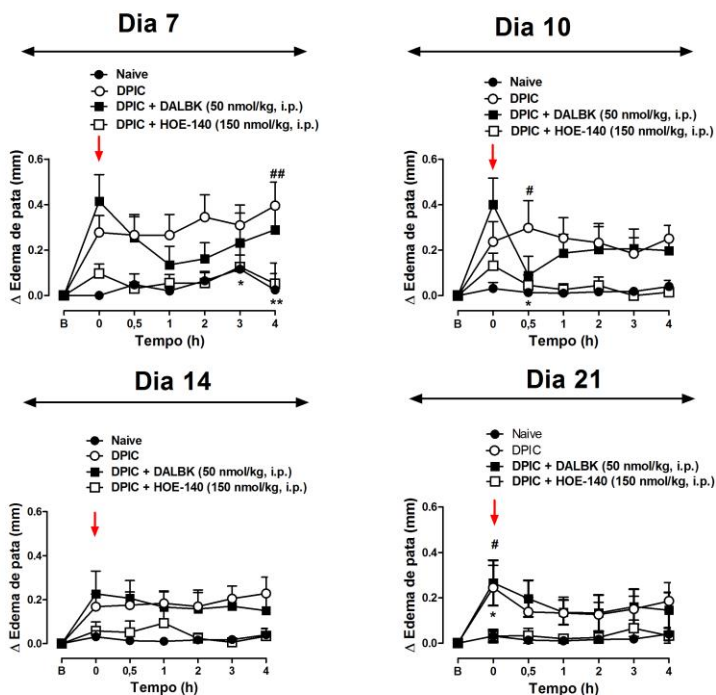
27 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Efeito dos antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ no edema de pata induzido pela DPIC em fêmeas.²⁸

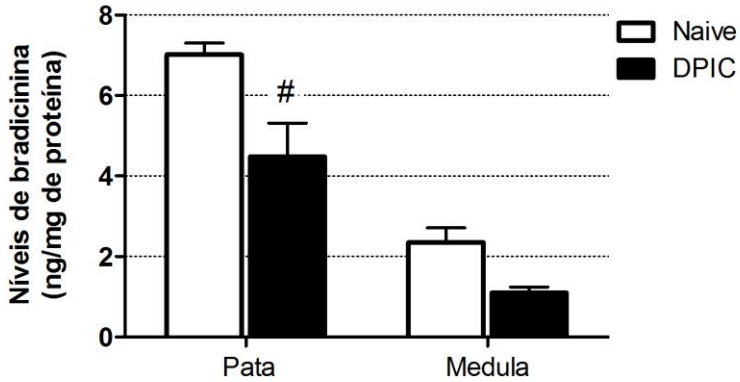
28 As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).



Fonte: Elaborada pela autora.

5.9 COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE BK NOS ANIMAIS NAIVE E SUBMETIDOS À DPIC.

Por fim, objetivando comparar os níveis teciduais de BK entre camundongos naive e os submetidos à DPIC, realizou-se a quantificação dos níveis de BK na medula espinal e pata de ambos os grupos controles. Surpreendentemente, os animais naive apresentaram maiores concentrações teciduais de BK na pata em comparação com os animais DPIC ($p < 0,05$), enquanto na medula espinal tal diferença não foi observada (Figura 28).

Figura 28 - Concentração tecidual de BK em animais naive vs. DPIC.²⁹

Fonte: Elaborada pela autora.

29 Análise nos níveis teciduais de BK em amostras de medula espinal e pata dos animais naive e controle DPIC não tratados. # $p < 0,05$ representa a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo naive (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

6. DISCUSSÃO

A SDCR-I consiste em síndrome dolorosa crônica caracterizada por dor espontânea ou provocada, desproporcional em relação ao evento precipitante, a qual surge acompanhada por grande variedade de alterações autonômicas e motoras (GOH; CHIDAMBARAM; MA, 2017). Tão logo, possui apresentação clínica bastante variável, haja vista sua natureza complexa e a grande diversidade de mecanismos fisiopatológicos envolvidos não somente no seu desenvolvimento, mas também na sua progressão (SEBASTIN, 2011). Assim sendo, o objetivo do presente estudo pautou-se na investigação da participação dos receptores de BK – B₁ e B₂ – na hiperalgesia e edema associado à SDCR-I, através do modelo experimental de DPIC.

Conforme supramencionado, o processo de I/R que origina o modelo experimental de DPIC, se inicia com a ativação de uma cascata inflamatória com conseqüente inflamação aguda e edema (CODERRE et al., 2004). Possivelmente envolvidas nesse processo estão as cininas, potentes peptídeos algogênicos, liberados em resposta a inflamação e/ou trauma tecidual, responsáveis por modular a dor e a hiperalgesia (ASRAF et al., 2017; CALIXTO et al., 2000). Isso porque as cininas, em particular a BK, atuam em receptores B₁ e B₂ expressos nos terminais periféricos de neurônios sensoriais aferentes primários de forma a reduzir o limiar de nociceptores, contribuindo para o processo de sensibilização periférica ao induzir alterações em proteínas transdutoras como, por exemplo, o TRPV1 (CHUANG et al., 2001; MATHIVANAN et al., 2016; PRADO et al., 2002). Portanto, nossos resultados demonstram a contribuição dos receptores B₁ e B₂ na hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de DPIC. Tendo em vista que a administração de antagonista seletivo para o receptor B₁ (DALBK) e antagonista seletivo para o receptor B₂ (HOE-140), por via i.p. e i.pl., foram capazes de reduzir significativamente os comportamentos associadas à hiperalgesia mecânica, durante a fase aguda e persistente do modelo de DPIC. Em conjunto, esses resultados sugerem a possível participação dos receptores de BK expressos sistemicamente na modulação da hiperalgesia mecânica induzida pela lesão de I/R em camundongos. Faz-se aqui necessário destacar que esse

efeito foi observado em animais machos e fêmeas, demonstrando assim a reprodutibilidade em ambos os gêneros.

O receptor B₁ está, particularmente, envolvido na hiperalgesia persistente e subsequente a um estímulo inflamatório (PERKINS et al., 2003), já que sua expressão é aumentada em resposta a citocinas inflamatórias tal como o TNF (DRAY; PERKINS, 1993; DRAY, 1997; HUANG; PLAYER, 2010). Assim, considerando o efeito anti-hiperalgésico do DALBK no modelo de DPIC no 7º dia pós-isquemia, pode-se sugerir que a lesão de I/R, possivelmente, induz a expressão de receptores B₁, de acordo com dados previamente publicados, os quais demonstram o papel do B₁R como mediador da hiperalgesia induzida por lesões teciduais e/ou inflamação (CONLEY et al., 2005; PATERSON et al., 2013). Ainda dentro deste contexto Levy e Zochdone observaram aumento da expressão de receptores B₂, 48 horas após a indução de lesão nervosa em ratos, no corno dorsal da medula espinal ipsilateral a lesão, enquanto a expressão de B₁ encontrou-se aumentada apenas 14 dias após a indução. Ainda nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que a administração de HOE-140 apresentou efeito antinociceptivo em ambos os dias avaliados, enquanto o tratamento com DALBK apresentou efeito analgésico apenas no 14º dia, sugerindo que os efeitos dos antagonistas cininérgicos são dependentes da expressão dos seus respectivos receptores. Por esta razão, nossos resultados permitem concluir que o efeito anti-hiperalgésico do DALBK no 7º dia pós-isquemia da DPIC poderia estar relacionado à expressão aumentada dos receptores B₁, muito embora experimentos adicionais sejam necessários para confirmar esta hipótese. Ademais, nas primeiras 48 horas após a indução do processo de I/R ocorre aumento na expressão de TNF, citocina como supracitado, capaz de induzir a expressão de receptores B₁ e que também se encontra elevada em pacientes com SDCR-I (LIMAN et al., 2015; WESSELDIJK et al., 2008).

Segundo dados da literatura, os antagonistas para o receptor B₁ representam ferramenta farmacológica importante para o tratamento de dores crônicas (BÉLICHARD et al., 2000), através de diferentes achados experimentais, tais como: hiperalgesia induzida por formalina, capsaicina, adjuvante completo de Freud (CFA), vincristina (hiperalgesia diabética), hiperalgésica induzida por *zymosan* e lesões

nervosas (BÉLICHARD et al., 2000), bem como reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela aplicação i.pl. de carragenina e intra-articular de CFA (DAVIS e PERKINS, 1994; RUPNIAK et al., 1997). No mesmo sentido, Fox e colaboradores demonstraram que a aplicação sistêmica do antagonista B_1 – desArg¹⁰HOE-140 – inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela aplicação de CFA i.pl. (FOX et al., 2003), estando em concordância com os nossos achados, acerca do efeito anti-hiperalgésico de DALBK, administrado por via i.p., no modelo de DPIC. Somado a isso, o B_1R tem participação vital na modulação da dor persistente sob condições inflamatórias prolongadas e neuropatia. Por exemplo, Dutra e colaboradores demonstraram a participação, principalmente do receptor B_1 , no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica no modelo de encefalomielite autoimune experimental, modelo padrão-ouro de esclerose múltipla (DUTRA et al., 2013). Ainda dentro deste contexto, outros estudos identificaram o papel hiperalgésico do B_1R em modelos animais de mono neuropatia, neuropatia diabética e neuropatia induzida por quimioterápicos, os quais foram revertidos pelo tratamento com antagonistas seletivos para o B_1R (PETCU et al., 2008; LEVY; ZOCHODNE, 2000; GABRA; SIROIS, 2002). Portanto é possível sugerir que nossos dados suportam esses achados, tendo em vista que o tratamento i.p e i.pl. de DALBK inibiu a hiperalgesia mecânica na fase crônica do modelo de DPIC (a partir do 14º dia pós-isquemia). De modo relevante, Brusco e colaboradores demonstraram que a administração de antagonistas seletivos para o receptor B_1 reduziu a alodínia e o comportamento nociceptivo espontâneo na síndrome dolorosa aguda associada ao paclitaxel. Em adição, a administração de agonistas para o receptor B_1 em animais previamente tratados com subdoses de paclitaxel de forma aguda ou crônica, apresentaram comportamento nociceptivo espontâneo (BRUSCO et al., 2017). Uma vez mais, nossos dados confirmam e estendem os dados previamente publicados acerca da participação do receptor B_1 no desenvolvimento e manutenção de dores crônicas (CALIXTO et al., 2004; HUANG; PLAYER, 2010; MARCEAU; REGOLI, 2004), bem como fornecem evidências acerca da sua possível participação na neuropatia associada à SDCR-I.

Em continuidade, nossos achados também demonstram a participação do receptor B_2 na indução e manutenção da resposta

inflamatória e algica durante a DPIC e, presumivelmente, na SDCR-I. Aqui, a administração i.pl. e i.p. de HOE-140 inibiram significativamente a hiperalgisia mecânica induzida pela DPIC. Por conseguinte, da mesma forma como o B₁R, é aceitável sugerir, através desses resultados, que os receptores B₂ expressos na periferia atuam como intermediários na hiperalgisia mecânica induzida pela DPIC, uma vez que esses receptores são constitutivamente expressos no SNP e apresentam papel nociceptivo em diferentes tipos de sensações dolorosas (BUJALSKA; MAKULSKA-NOWAK, 2009). Além disso, como previamente descrito, a participação dos receptores B₂ na fase aguda de processos inflamatórios e algicos é amplamente descrita na literatura, sendo este o alvo molecular preferencial para um dos mais potentes peptídeos algogênicos envolvidos no processo de sensibilização periférica, a BK (COUTURE et al., 2001; WANG et al., 2006; CHAPMAN e DICKENSON, 1992; FERREIRA et al., 2002; WANG et al., 2005; KOHNO et al., 2008). Doravante, pesquisas anteriores identificaram que o HOE-140 – antagonista seletivo para o B₂R – inibiu a hiperalgisia induzida pela BK, bem como apresentou efeitos analgésicos em modelos animais de dor inflamatória, particularmente nos modelos de dor induzida por carragenina e *zymosan* (BIRCH et al., 1992; BÉLICHARD et al., 2000). Nesse cenário, o receptor B₂ torna-se alvo em potencial para o tratamento de dor inflamatória, haja vista sua íntima relação com a BK, envolvida na formação de edema, ativação e sensibilização de nociceptores (STERANKA et al., 1988; DRAY e PERKINS, 1993; HALL, 1997). Isso se sustenta também em razão do efeito antinociceptivo do HOE-140, assim como do DALBK, na dor espontânea, confirmando a participação desses receptores na gênese da dor inflamatória e neurogênica (CORRÊA; CALIXTO, 1993). Dentro desta temática, muito ainda se discute acerca da participação do B₂R no controle da gênese e progressão da dor neuropática, tal qual descrito por Levy e Zhocdone, os quais demonstraram a expressão aumentada do B₂R no corno dorsal da medula espinal após a lesão nervosa em ratos, e o efeito anti-hiperalgésico da administração do HOE-140 nesses mesmos animais (LEVY; ZOCHODNE, 2000).

Após identificar o papel dos receptores B₁ e B₂ sistêmicos e periféricos na hiperalgisia mecânica induzida pela DPIC, objetivou-se

ainda avaliar o papel central dos respectivos receptores na manutenção da hiperalgesia e edema de pata induzidos pela DPIC. Isso em vista da expressão constitutiva de B_2 no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal, bem como em lâminas superficiais e sua consequente participação no sistema nervoso sensorial (LOPES et al., 1993; LEE et al., 2002). Ademais, a expressão constitutiva de B_1 no corno dorsal da medula espinal de ratos, humanos e primatas também já foi identificada (CALIXTO et al., 2004; MA et al., 2000; MA e HEAVENS, 2000; WOTHERSPOON e WINTER, 2000; LEVY e ZOCHODNE, 2000; SHUGHRUE et al., 2003). Assim, os animais foram tratados com os antagonistas DALBK e HOE-140 por via intratecal. Conforme demonstrado, o tratamento i.t. com os antagonistas inibiram a hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de DPIC, demonstrando a participação central desses receptores nos mecanismos fisiopatológicos relacionados à DPIC e, possivelmente, na SDCR-I. Em conjunto esses resultados confirmam os dados previamente publicados acerca do efeito antinociceptivo de DALBK e HOE-140, administrados por via i.t. em modelos de hiperalgesia induzida por carragenina, CFA e formalina, efeito esse atribuído, em parte, pelo bloqueio dos receptores B_1 e B_2 expressos na medula espinal (CONLEY et al., 2005; FERREIRA et al., 2002; SCHUELERT et al., 2015). Ambos os antagonistas, quando empregados por via i.t., também foram capazes de inibir a hipernocicepção induzida pela avulsão do plexo braquial em camundongos fêmeas (QUINTÃO et al., 2008). Nesse contexto, a atuação dos receptores B_1 e B_2 na manutenção da hipernocicepção central pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo efeito álgico da BK na neuromodulação da transmissão sináptica glutamatérgica (KOHNO; WANG; AMAYA, 2008). Uma vez liberada na medula espinal em resposta a estimulação dos nociceptores na periferia, a BK atuará como moduladora sináptica de forma a potencializar a transmissão glutamatérgica, consequentemente, facilitando a transmissão de impulsos nociceptivos e o surgimento de hipersensibilidade. Isso pode ser exemplificado, dado o fato de que a administração i.t. de BK induz hiperalgesia térmica (FERREIRA et al., 2002), enquanto a administração i.t. de antagonista seletivo para B_2R inibe as manifestações comportamentais associadas à sensibilização

central (WANG et al., 2005). Igualmente, a inibição da expressão gênica dos receptores B_1 e B_2 via oligonucleotídeos antisense mostrou-se eficiente na inibição da hiperalgesia induzida pela DPIC. Em conjunto esses dados corroboram com os nossos achados relativos à participação dos receptores B_1 e B_2 na transmissão central de informações nociceptivas durante o decurso temporal do modelo de DPIC e, possivelmente, na SDRC-I.

Os resultados obtidos no presente estudo ainda estendem outros dados da literatura, os quais demonstram que camundongos com deleção gênica (nocautes) para os receptores B_1 ($B1R^{-/-}$) e B_2 ($B2R^{-/-}$) desenvolvem hipersensibilidade de forma semelhante aos camundongos *wild type* (WT), quando esses são expostos ao modelo de hiperalgesia induzida por CFA. Da mesma forma, Cayla e colaboradores demonstraram que animais nocautes ($B1R^{-/-}$ e $B2R^{-/-}$) expostos a lesão nervosa periférica desenvolvem hiperalgesia térmica ao frio e ao calor também de forma idêntica aos animais WT, e propõem que as cininas sejam menos importantes na dor em estágio crônico (CAYLA et al., 2012). Em contrapartida, segundo Beirith e colaboradores, animais $B1R^{-/-}$ exibiram hipoalgesia em resposta a primeira fase dos testes com formalina e capsaicina, o que sugere a participação dos mesmos na nocicepção neurogênica (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2003). Somado a isso, animais nocautes para o B_1R expostos a ligação parcial do nervo ciático apresentaram redução na alodínia mecânica e hiperalgesia térmica em comparação aos animais WT, os quais foram inibidos após a administração do antagonista seletivo para o receptor B_1 , DALBK. Ou seja, os receptores B_1 parecem ser necessários para o desenvolvimento da dor neuropática (FERREIRA, 2005). Ainda dentro desse contexto, outro estudo publicado por Ferreira e colegas destacou que a injeção i.t. de BK promoveu hiperalgesia térmica em animais WT e nocautes $B1R^{-/-}$, mas não em nocautes $B2R^{-/-}$. Da mesma forma, a administração de agonista para o B_1R , DABK i.t., promoveu hiperalgesia térmica em camundongos WT, mas não em nocautes $B1R^{-/-}$ (FERREIRA et al., 2002). Em resumo, esses ensaios corroboram com os nossos achados acerca da modulação da hiperalgesia mecânica pela inibição central da expressão gênica dos receptores B_1 e B_2 no modelo de DPIC. Como já descrito anteriormente, a BK é um peptídeo

allogênico rapidamente degrada pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Portanto, o uso de fármacos anti-hipertensivos inibidores da ECA aumenta de forma subsequente a produção endógena de BK e seus metabólitos, devido à inibição da sua degradação. Ou seja, por aumentarem a concentração de BK esses fármacos possuem potencial para interferir, diretamente, na via nociceptiva (DÉCARIE et al., 1996). Conseqüentemente De Mos propôs que fármacos inibidores da ECA poderiam exacerbar a dor associada à SDCR-I, e pautado nessa problemática, o presente estudo avaliou se a administração de captopril em animais expostos a DPIC poderia exacerbar a hiperalgisia mecânica na presença e/ou ausência dos antagonistas para os receptores cininérgicos. Conforme supramencionado, os animais tratados com captopril apresentaram hiperalgisia similar aos animais do grupo DPIC, assim como o tratamento oral com captopril reverteu o efeito anti-hiperalgésico dos antagonistas DALBK e HOE-140, confirmando assim a participação da BK na hiperalgisia mecânica induzida pela DPIC. Aqui se acredita que o tratamento com captopril possa ter aumentado a concentração de cininas, ao passo que o efeito nociceptivo destas se sobrepõe ao efeito analgésico dos antagonistas seletivos para B_1R e B_2R . No entanto, os animais tratados com captopril não apresentaram exacerbação da resposta hiperalgésica. Muito embora, recentemente, Brusco e colaboradores demonstraram que uma única administração de enalapril (fármaco inibidor da ECA) aumentou a alodínia mecânica induzida por uma baixa dose de paclitaxel (BRUSCO et al., 2017). Além disso, os mesmos autores demonstraram que o paclitaxel inibiu a atividade da ECA, bem como aumentou a expressão de B_1R e B_2R e também de peptídeos relacionados à BK (BRUSCO et al., 2017). Na mesma direção, outros relatos na literatura indicam que o captopril exacerbou a resposta nociceptiva a uma subdose de formalina, porém não foi capaz de induzir a hiperalgisia *per se* (CÔRREA e CALIXTO, 1993; ONDETTI, 1977). Segundo Matsuzaki e colaboradores, a latência de retirada da pata em resposta a um estímulo térmico em *kininogens-deficient Brown Norway (B/N-) Katholiek rats* é maior em comparação a linhagem normal (B/N-Kitasato rats), porém quando os animais foram tratados com o antagonista seletivo para o receptor B_2 – FR173657 – por via oral, a latência de retirada foi prolongada, o qual não ocorreu na

presença do captopril, indicando que o captopril exacerbou a hiperalgesia por potencializar a ação das cininas ao passo que reduziu a atividade do antagonista (MATSUZAKI et al., 2002). Em conjunto, esses resultados poderiam justificar o porquê dos antagonistas, HOE-140 e DALBK, não reverteram a dor induzida pela DPIC quando o captopril foi coadministrado. Ainda, o captopril poderia estar modulando as vias nociceptiva via sistema renina-angiotensina (BALI; SINGH; JAGGI, 2014), os quais não poderiam ser inibidos por antagonistas de cininas. Outra possível explicação para tal resultado reside no fato de que os fármacos inibidores da ECA reduzem a degradação não somente de BK, mas também de SP (FEIN et al., 2009). Ou seja, a exacerbação da hiperalgesia e/ou perda de efeito dos antagonistas nesse caso poderia ser resultante do aumento de segundos mensageiros neurogênicos. Assim, a investigação dos efeitos de antagonistas para os receptores de SP e CGRP durante o desenvolvimento da DPIC poderiam ser futuramente investigados.

Reconhecendo-se o fato de que a SDCR-I possa ser resultante do estado isquêmico e inflamatório em tecidos profundos e, que de forma consistente, os níveis séricos de BK e CGRP estão aumentados nos membros acometidos pela SDCR-I, é possível estabelecer uma provável conexão entre a BK e a resposta edematogênica tanto na SDCR-I, quanto no modelo experimental de DPIC (PARKITINY et al., 2013; BIRKLEIN et al., 2001). A razão para isso está na propriedade vasodilatadora das cininas, as quais aumentam a permeabilidade vascular e conseqüentemente promovem o extravasamento plasmático de proteínas e fluidos, contribuindo para a formação do edema (BRYANT e SHARIAT-MADAR, 2009). Por esta razão, objetivou-se avaliar o papel dos receptores B_1 e B_2 na resposta edematogênica durante o modelo experimental de DPIC. A administração i.p. de antagonistas seletivos para os receptores B_1 e B_2 inibiu o edema de pata em animais machos, porém não em fêmeas. Além disso, a aplicação dos antagonistas HOE-140 e DALBK imediatamente após a retirada do torniquete demonstrou a participação, principalmente, dos receptores B_2 na fase inflamatória aguda. Isso, provavelmente se deve ao fato, de que o receptor B_2 seja expresso de forma constitutiva mediando à resposta inflamatória aguda, enquanto o receptor B_1 , preferencialmente, terá sua

expressão induzida pelo processo inflamatório subsequente à lesão tecidual (KAKOKI et al., 2007; SHUGHRUE et al., 2003). Somado a isso, Ferreira e colaboradores demonstraram que a resposta edematogênica mediada por DALBK em resposta à estimulação por LPS é, em parte, dependente de taquicininas e CGRP liberados pelas fibras nervosas aferentes primárias, bem como a liberação de 5-HT (FERREIRA et al., 2000). Em conjunto, esses dados corroboram com a participação dos receptores de cininas na formação do edema em resposta a inflamação e/ou trauma tecidual, e ilustram mecanismos através dos quais esses receptores poderiam mediar a formação do edema na DPIC e, presumivelmente, na SDCR-I.

Cabe, porém, salientar que aparentemente a inibição dos receptores B₁ e B₂ em fêmeas não modula de forma significativa o edema, indicando que mais estudos são necessários, a fim de confirmar esses achados, visto que segundo Tang e colegas, não existe diferenças entre machos e fêmeas com relação ao edema, durante o estabelecimento da DPIC (TANG et al., 2017). Apesar disso, o estrogênio – hormônio feminino – é extensamente envolvido em processos inflamatórios, influenciando o metabolismo de SP, BK e a formação de ROS durante o processo inflamatório e de I/R. Segundo Bjorling e Wang, o estrogênio possui a capacidade de modular a inflamação neurogênica via interação com mediadores inflamatórios, estando à inflamação neurogênica diretamente associada ao aumento da permeabilidade vascular (BJORLING; WANG, 2001). Além disso, Tang e colaboradores encontraram diferenças importantes com relação ao perfil inflamatório entre machos e fêmeas após a indução da DPIC, dentre elas a expressão aumentada de TNF nas fêmeas (TANG et al., 2017). Como conclusão e viável justificativa para os nossos resultados, podemos sugerir que o efeito edematogênico dos mediadores inflamatórios envolvidos, por influência do estrogênio nas fêmeas, se sobreponha ao efeito anti-edematogênico dos antagonistas cininérgicos. Ainda é possível verificar que o efeito anti-hiperalgésico promovido pelos antagonistas em fêmeas foi menos expressivo do que àqueles evidenciados nos machos. A justificativa para isso também poderia estar relacionada ao fator hormonal – considerando a capacidade do 17β-estradiol (17β-E2) em se ligar a neurônios sensoriais aferentes primários

aumentando a sinalização induzida por BK, o que tão logo interfere na sensibilidade a estímulos dolorosos em fêmeas, tornando-as mais sensíveis (ROWAN et al., 2014).

Os dados referentes à hiperalgesia térmica ao frio foram discretos e/ou inconclusivos no presente estudo tanto em machos quanto nas fêmeas. Inicialmente, considerando a capacidade da BK em ativar os canais iônicos TRPV1, os quais promovem o aumento do influxo de cálcio e, conseqüentemente, podem ativar os canais iônicos TRPA1 (termosensíveis ao frio), seria óbvio imaginar a participação dos receptores B₁ e B₂ nesse processo neurofisiológico. Entretanto, embora não seja possível afirmar, os resultados aqui apresentados sugerem a não participação desses receptores na hiperalgesia térmica ao frio induzida pela DPIC. Em consonância, Petcu e colaboradores não identificaram diferenças na alodínia ao frio em animais expostos a lesão parcial do nervo ciático tratados com antagonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂, quando comparado aos animais controles lesionados (PETCU et al., 2008), os quais levaram os autores a concluir que diferenças entre os modelos experimentais, bem como a farmacocinética e o tipo de antagonista utilizado (peptidérgico ou não-peptidérgico) poderiam justificar tais achados. Diante do exposto, estudos adicionais serão necessários para o melhor esclarecimento dessas hipóteses.

Por fim, a concentração tecidual de BK na pata dos animais DPIC foi menor em comparação com os animais naive. Uma das justificativas para esses achados poderia estar relacionada ao fato de que a quantificação de BK foi realizada em tecidos de animais eutanasiados no 22º dia pós-isquemia (período crônico da doença), sendo que o nível da BK nesse período pode não refletir de forma fidedigna a sua concentração em dias anteriores. Ademais, deve-se salientar que a quantificação foi realizada no período crônico da DPIC, e a partir dos dados já mencionados pode-se sugerir que essa diminuição se deve em parte ao perfil de expressão dos receptores (maior expressão de B₂R na fase aguda e de B₁R em fases persistentes e crônicas). Logo a concentração de BK pode ser maior em fases iniciais do modelo, culminando com uma diminuição no decurso temporal do modelo, enquanto o inverso poderia ser verdadeiro para os níveis de des-Arg9-BK (ligante com maior afinidade para o B₁R). Portanto, futuros

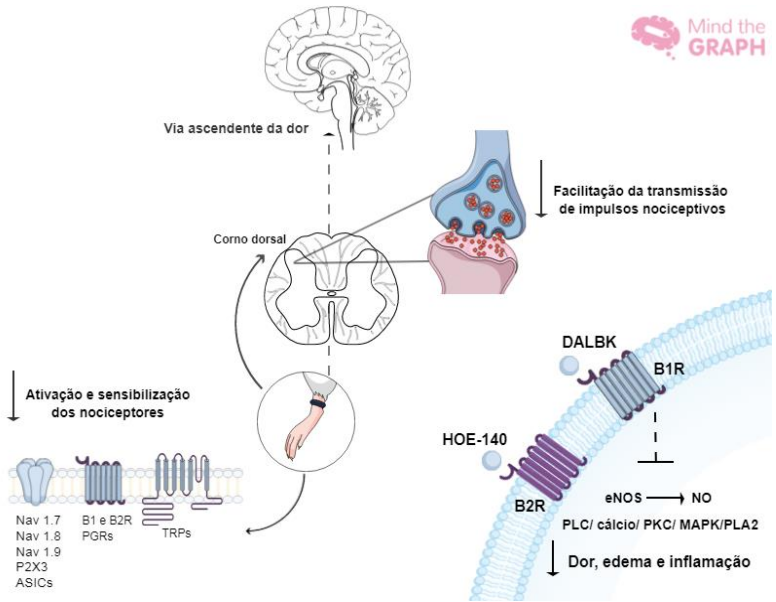
experimentos são necessários para comparar os níveis de BK e des-Arg9-BK em diferentes fases do modelo de DPIC.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo indicam fortes evidências da participação dos receptores de bradicinina – B₁ e B₂ – tanto na fase de iniciação quanto na manutenção da resposta inflamatória e neuropática associada à DPIC. Nossos dados permitem ainda sugerir que esses receptores estão, possivelmente, relacionados às sensibilizações periféricas e centrais no processo da gênese e progressão da neuropatia típica do modelo experimental de DPIC e, possivelmente, na SDCR-I (Figura 29). Por fim, os resultados aqui obtidos, nos permitem concluir que os receptores de BK, B₁ e B₂, podem constituir opções relevantes para o desenvolvimento de novas terapias analgésicas no tratamento de neuropatias, incluindo a SDCR-I.

Figura 29. Representação esquemática acerca do efeito anti-hiperalgésico e anti-edematogênico dos antagonistas seletivos para receptores de bradicinina no modelo de DPIC.³⁰

30 Tendo em vista os resultados encontrados permitem-nos sugerir que a inibição dos receptores de bradicinina pelos peptídeos DALBK (antagonista B₁R) e HOE-140 (antagonista B₂R) de forma geral promova a diminuição na síntese de óxido nítrico, bem como inibição das vias de PLC, MAPK e PLA₂, reduzindo conseqüentemente a resposta inflamatória, o edema e a manifestação dolorosa associada à DPIC. Ainda é possível concluir que o efeito anti-hiperalgésico dos peptídeos em nível periférico ocorra em função do decréscimo na ativação e sensibilização dos nociceptores, enquanto em nível central seja resultante da modulação da transmissão dos impulsos nociceptivos.

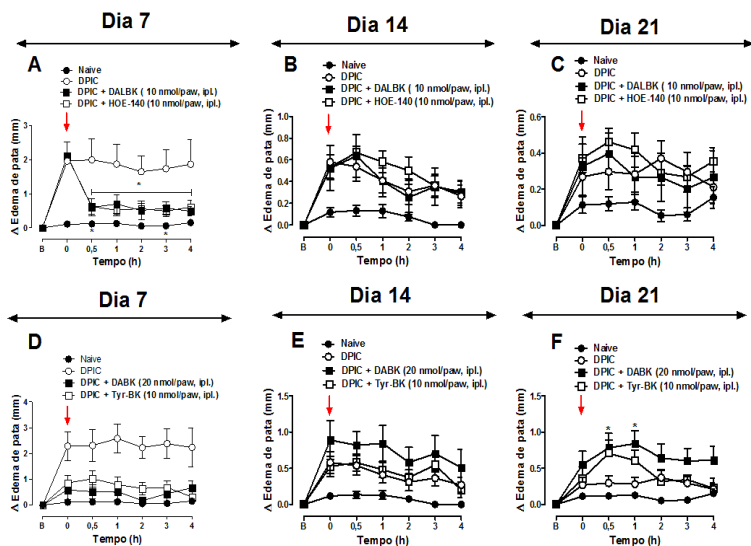


Fonte: Elaborada pela autora.

8 RESULTADOS NEGATIVOS E/OU INCONCLUSIVOS

Abaixo seguem os dados caracterizados como negativos e/ou inconclusivos.

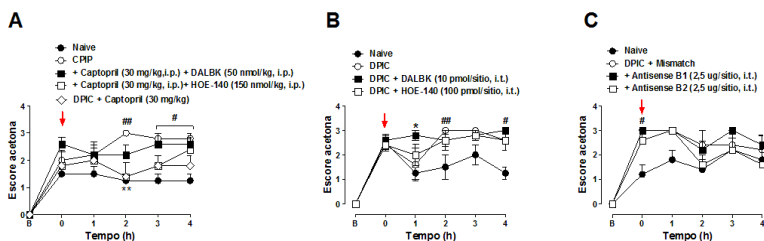
Figura 30 - Efeito dos antagonistas e agonistas seletivos para os receptores B₁ e B₂ no edema de pata induzido pela DPIC.³¹



Fonte: Elaborada pela autora.

31 Edema de pata foi avaliado (A, B, C, D, E e F) nos grupos naive, DPIC, + HOE-140 (10 nmol/pata, i.pl.), + DALBK (10 nmol/kg, i.pl.), + DABK (20 nmol/pata, i.pl.), + Tyr-BK (10 nmol/pata, i.pl.). As setas vermelhas indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média ± EPM de 4-6 animais/grupo. *p<0,05 representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

Figura 31 - Dados referentes à hiperalgesia térmica ao frio (A, B e C). A. Experimento referente à hiperalgesia induzida por captopril. B.³²



Fonte: Elaborada pela autora.

32 Experimento referente à administração intratecal dos antagonistas DALBK e HOE-140. C. Experimento referente à inibição da expressão gênica pelo oligonucleotídeos antisense. As setas em vermelho indicam o momento do tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM de 4-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus grupos tratados, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo DPIC versus o grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni).

9 DESDOBRAMENTOS DA PESQUISA

De forma geral nossos dados demonstram de forma consistente a participação dos receptores B_1 e B_2 na hiperalgesia mecânica associada à DPIC, no entanto ainda há lacunas a serem preenchidas, tais como: a atuação desses receptores na hiperalgesia térmica ao frio – a qual merece maior investigação – e se fármacos inibidores da ECA podem interferir na via nociceptiva mediando à manutenção do processo inflamatório. Outro desdobramento em potencial é a investigação acerca dos mecanismos intracelulares pelos quais as cininas e seus receptores atuam especificamente no modelo de DPIC, bem como a investigação da atividade dos receptores B_1 e B_2 e sua interação com o hormônio estrogênio no modelo de DPIC em fêmeas.

REFERÊNCIAS

ASHMAWI, H. A.; FREIRE, G. M. G. Peripheral and central sensitization. **Revista Dor**, v. 17, n. Suppl 1, p. 31–34, 2016.

ASRAF, K. et al. Involvement of the bradykinin B1 Receptor in microglial activation: In vitro and in vivo studies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. APR, 2017.

BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Renin-angiotensin system in pain: Existing in a double life? **JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 15, n. 4, p. 329–340, 2014.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849–857, 2004.

BARRETT, M. J.; BARNETT, P. L. J. Complex regional pain type 1. **Pediatric Emergency Care**, v. 32, n. 3, p. 185–191, 2016.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **NIH Public Access**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, n. 1–2, p. 110–116, 2003.

BÉLICHARD, P. et al. Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in the plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. **Immunopharmacology**, v.46, p.139-147,2000.

BIRKLEIN, F. Pattern of autonomic dysfunction in time course of complex regional pain syndrome. **Clinical Autonomic Research**, v. 8, p. 79-85,1998.

BIRKLEIN, F. Complex regional pain syndrome. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 2, p. 131–138, 2005.

BIRKLEIN, F.; SCHMELZ, M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 3, p. 199–202, 2008.

BIRKLEIN, F. et al. The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. **Neurology**, v. 57, p. 2179–2184, 2001.

BJORLING, D.E.; WANG, Z.Y. Estrogen and neuroinflammation. **Urology**, v. 57, p. 182–186, 2001.

BORSOOK, D.; SAVA, S. Pain: Do ACE inhibitors exacerbate complex regional pain syndrome? **Nature reviews. Neurology**, v. 5, n. 6, p. 306–8, 2009.

BRYANT, J.W.; SHARIAT-MADAR Z.; Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 234–250, 2009.

BRUEHL, S. An Update on the Pathophysiology of Complex Regional Pain Syndrome. **Anesthesiology**, v. 113, n. 3, p. 713–725, 2010.

BRUEHL, S. Complex regional pain syndrome. 2015.

BRUSCO, I. et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7824–7837, 2017.

BUJALSKA-ZADROZNY, M. et al. Dose-depending effect of intracerebroventricularly administered bradykinin on nociception in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 1006–1011, 2013.

BUJALSKA, M.; MAKULSKA-NOWAK, H. Bradykinin receptor antagonists and cyclooxygenase inhibitors in vincristine-and streptozotocin-induced hyperalgesia. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 4, p. 631–640, 2009.

BUSHNELL, M. C.; ČEKO, M.; LOW, L. A. HHS Public Access. v. 14, n. 7, p. 502–511, 2013.

CALIXTO, B. et al. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. v. 418, n. June, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British journal of pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 803–818, 2004.

CAYLA, C. et al. Impaired nociception and peripheral opioid antinociception in mice lacking both kinin b1 and b2 receptors. **Anesthesiology**, v. 116, n. 2, p. 448–457, 2012.

CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 219, p. 427-433, 1992.

CHEN, Q. Bradykinin Receptors Mediate Dynorphin Pronociceptive Action to Produce Persistent Pain. p. 166, 2007.

CHENG, J.-K.; JI, R.-R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **October**, v. 33, n. 10, p. 1970–1978, 2008.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic Inflammation – The Peripheral Nervous System’s Role in Host Defense and Immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1063–1067, 2012.

CHUANG, H. H. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 957–962, 2001.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): A novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1–2, p. 94–105, 2004.

COGHILL, R. C. Individual Differences in the Subjective Experience of Pain: New Insights into Mechanisms and Models. v. 50, n. 9, p. 1531–1535, 2011.

CONLEY, R. K. et al. Inhibition of acute nociceptive responses in rat spinal cord by a bradykinin B₁ receptor antagonist. **European journal of pharmacology**, v. 527, n. 1–3, p. 44–51, 2005.

COOK, A. J. et al. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. **Nature**, 1987.

CORRÊA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 193–198, 1993.

CORRIGAN, F. et al. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2016.

COSTA, R. et al. Anti-nociceptive effect of kinin B₁ and B₂ receptor antagonists on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2 B, p. 681–693, 2011.

COSTA, R. et al. Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. **Molecular Neurobiology**, p. 1–12, 2017.

COUTURE, R. et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1–3, p. 161–176, 2001.

DAVIS, K. D. et al. Brain imaging tests for chronic pain: Medical, legal and ethical issues and recommendations. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 10, p. 624–638, 2017.

DÉCARIE, A.; ADAM, A.; COUTURE, R. Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9]BK in carrageenan-induced edema. **Peptides**, v. 17, p. 1009-1015, 1996.

DE MOS, M. et al. The incidence of complex regional pain syndrome: A population-based study. **Pain**, v. 129, n. 1–2, p. 12–20, 2007.

DESPOSITO, D. et al. Neuroprotective effect of kinin B1 receptor activation in acute cerebral ischemia in diabetic mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUBOIS, M.; GALLAGHER, R.; LIPPE, P. Pain medicine position paper. **Pain Medicine**, v. 10, n. 6, p. 972–1001, 2009.

DRAY, A; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in neuroscience**, v. 16, p. 99-104. 1993.

DRAY, A; PERKINS, M. Dray, A., Perkins, M.N., 1997. Kinins and pain. In: Farmer, S. (Ed.), *The Kinin System*. **Academic Press, San Diego**, pp. 157 – 172.

DUTRA, R. C. et al. The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: Evidence for the involvement of astrocytes. **Neurobiology of Disease**, v. 54, p. 82–93, 2013.

DUTRA, R. C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 2, p. 192–207, 2016.

ELSHARYDAH, A. et al. Complex regional pain syndrome type 1 predictors — Epidemiological perspective from a national database analysis. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 39, p. 34–37, 2017.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1–26, 2011.

FEIN, A. ACE inhibitors worsen inflammatory pain. **Medical Hypotheses**, v. 72, p. 757, 2009.

FERREIRA, P.K.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B agonist des-Arg -BK in rats pre-treated with LPS. **Regulatory peptides**, v. 89, p. 29-35, 2000.

FERREIRA, J. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188–1197, 2002.

FERREIRA, J. Reduced Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain in Kinin B1 Receptor Knock-Out Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 9, p. 2405–2412, 2005.

FERREIRA, J.; SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 787-794, 2004.

FOX, A. et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 683–91, 2003.

GARLAND, E. Pain Processing the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathway. v. 39, n. 3, p. 561–571, 2013.

GAY, A.-M.; BÉRÉNI, N.; LEGRÉ, R. Type I complex regional pain syndrome Le syndrome douloureux régional complexe de type I. **Chirurgie de la main**, v. 32, p. 269–280, 2013.

GEBHART, G. **Scientific issues of pain and distress**. [s.l.: s.n.].

GIERTHMÜHLEN, J.; BINDER, A.; BARON, R. Mechanism-based treatment in complex regional pain syndromes. **Nature reviews. Neurology**, v. 10, n. 9, p. 518–28, 2014.

GOH, E. L.; CHIDAMBARAM, S.; MA, D. Complex regional pain syndrome: a recent update. **Burns & Trauma**, v. 5, n. 1, p. 2, 2017.

HALL, J.M. Bradykinin receptors. *General pharmacology*, v. 28, p. 1-6, 1997.

HARDEN, R. N. et al. Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. **Pain Medicine**, v. 8, n. 4, p. 326–331, 2007.

HARDEN, R. N. et al. Complex Regional Pain Syndrome: Practical Diagnostic and Treatment Guidelines, 4th Edition. **Pain Medicine**, v. 14, n. 2, p. 180–229, 2013.

HIGASHIDA, H. et al. Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 4, p. 942–946, 1986.

HOWL, J.; PAYNE, S. J. Bradykinin receptors as a therapeutic target. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 7, n. 2, p. 277–85, 2003.

HUANG, H.; PLAYER, M. R. Bradykinin B1 receptor antagonists as potential therapeutic agents for pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5383–5399, 2010.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365–376, 2007.

IOLASCON, G. et al. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. **Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 12, n. Suppl 1, p. 4–10, 2015.

JI, R. R. et al. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 12, p. 696–705, 2003.

KAKOKI, M.; SMITHIES, O. The kallikreinkin system in health and in diseases of the kidney. **Kidney International**, v. 75, n. 10, p. 1019–1030, 2009.

KALOGERIS, T. et al. **Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury**. [s.l.: s.n.]. v. 298

KOHNO, T.; WANG, H.; AMAYA, F. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 17, p. 4533–4540, 2008.

KORTEKAAS, M. C. et al. Pathophysiological Mechanisms Involved in Vasomotor Disturbances in Complex Regional Pain Syndrome and Implications for Therapy: A Review. **Pain practice: the official journal of World Institute of Pain**, p. n/a-n/a, 2015.

KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20–30, 2016.

LEVY, D.; ZOCHODNE, D. W. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. **Pain**, v. 86, n. 3, p. 265–271, 2000.

LI, Z. et al. Complex regional pain syndrome after hand surgery. **Hand Clinics**, v. 26, n. 2, p. 281–289, 2010.

LIMAN, S. et al. Preventive Treatment with Ketamine Attenuates the Ischaemia-Reperfusion Response in a Chronic Postischaemia Pain Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

LINTE, R. M. et al. Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. **Experimental Brain Research**, v. 178, n. 1, p. 89–98, 2007.

LÓPEZ-VALDÉS, H. E. et al. Bradykinin increases resensitization of purinergic receptor signaling in glioma cells. **Cancer Cell International**, v. 10, p. 1–8, 2010.

MA, Q.P.; HEAVENS, R.. Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. **Neuroreport**, v. 12, p. 2311 - 2314, 2000.

MA, Q.P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D. Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **Neuroreport**, v. 11, p. 4003-4005, 2000.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–852, 2004.

MARINUS, J. et al. Syndrome – current state of the art. **Lancet Neurol.**, v. 10, n. 7, p. 637–648, 2011.

MATHIVANAN, S. et al. Bradykinin induces TRPV1 exocytotic recruitment in peptidergic nociceptors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JUN, p. 1–12, 2016.

MATSUZAKI, S. et al. Role of kinin and prostaglandin in cutaneous thermal nociception. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 13–14, p. 2005–2012, 2002.

MEINI, S. et al. Bradykinin and B2 receptor antagonism in rat and human articular chondrocytes. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 3, p. 611–22, 2011.

MELNIKOVA, I. Pain market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 589–590, 2010.

MILLER, R.E. et al. The Role of Peripheral Nociceptive Neurons in the Pathophysiology of Osteoarthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 5, p. 318–326, 2015.

MITCHELL, S. W.; MOREHOUSE, G. R.; KEEN, W. W. Gunshot wounds and other injuries of nerves. 1864. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 458, p. 35–39, 2007.

MORAND-CONTANT, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B.; COUTURE, R. Kinin B 1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. p. 1625–1632, 2010.

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of pharmacological sciences**, v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005.

MOTTA, G.; TERSARIOL, I. L. S. Modulation of the plasma kallikrein-kinin system proteins performed by heparan sulfate proteoglycans. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–7, 2017.

NEGRAES, P. D. et al. Roles of kinins in the nervous system. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 613–623, 2015.

NIEWIAROWSKA-SENDO, A.; KOZIK, A.; GUEVARA-LORA, I. Kinin Peptides Enhance Inflammatory and Oxidative Responses Promoting Apoptosis in a Parkinson's Disease Cellular Model. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

ONDETTI, M.A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v.196, p. 441-444, 1977.

ORSENIGO, F. et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. **Nature Communications**, v. 3, p. 1208–1215, 2012.

PARKITNY, L. et al. Inflammation in complex regional pain syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 80, n. 1, p. 106–117, 2013.

PATERSON, K. J. et al. Characterisation and mechanisms of bradykinin-evoked pain in man using iontophoresis. **Pain**, v. 154, n. 6, p. 782–792, 2013.

PERL, E. R. Perl-2007-Nat-Rev-Neurosci. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. January, p. 71–80, 2007.

PETCU, M. et al. Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. **International Immunopharmacology**, v.8, p. 188-196, 2008.

PETHO, G.; REEH, P. W. Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1699–1775, 2012.

PONTE, A. S. et al. Complex regional pain syndrome type I: impact on work activities of working age individuals. Case reports. **Revista Dor**, v. 18, n. 3, p. 279–285, 2017.

PRADO, G. N. et al. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. **Journal of Cellular Physiology**, v. 193, n. 3, p. 275–286, 2002.

QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2017.

QUINTÃO, N. L. M. et al. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 11, p. 2856–2863, 2008.

RAJA, S.; GRABOW, T. Complex Regional Pain Syndrome I (Reflex Sympathetic Dystrophy). **Anesthesiology**, n. 5, p. 1254–1260, 2002.

RATTI, C. et al. Post-traumatic complex regional pain syndrome : clinical features and epidemiology. v. 12, n. 1, p. 11–16, 2015.

RHALEB, N. E.; YANG, X. P.; CARRETERO, O. A. The Kallikrein-Kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 2, p. 971–993, 2011.

ROCHA-SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from

plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American journal of physiology**, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROCKETT, M. Diagnosis, mechanisms and treatment of complex regional pain syndrome. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 27, n. 5, p. 494–500, 2014.

ROWAN, P.M.; Activation of Estrogen Receptor α Enhances Bradykinin Signaling in Peripheral Sensory Neurons of Female Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 349, p. 526-532, 2014.

RUPNIAK, N.M. Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg9[Leu8]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. *Pain*, v. 71, p.89-97, 1997.

SANDRONI P. et al. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. **Pain**, v. 103, p. 199-207, 2003.

Sebastin, S. J.; Complex regional pain syndrome. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 44, p. 298–307, 2011.

SCHMIDLIN, F. et al. Interleukin 1- β induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 1009-1015, 1998.

SCHERRER, D. Glucocorticoids increase bradykinin B2 receptor gene transcription in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 359, p. 153-159, 1999.

SCHUELERT, N. et al. The bradykinin B1 receptor antagonist BII13823 reverses inflammatory hyperalgesia by desensitization of

peripheral and spinal neurons. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 19, n. 1, p. 132–142, 2015.

SHARMA, J. N.; BUCHANAN, W. W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 6, p. 421–433, 1994.

SHUGHRUE, P. J.; KY, B.; AUSTIN, C. P. Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. **The Journal of comparative neurology**, v. 465, n. 3, p. 372–84, 2003.

SLEGTENHORST, B. R. et al. Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. **Immunology**, p. 147–154, 2014.

STERANKA, L.R. et al. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, p. 3245-3249, 1988.

SUN, L.; YE, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 342–350, 2012.

TANASESCU, R.; CONSTANTINESCU, C. S. Immunobiology Cannabinoids and the immune system : An overview. **Immunobiology**, v. 215, n. 8, p. 588–597, 2010.

TANG, C. et al. Sex differences in complex regional pain syndrome type I (CRPS-I) in mice. **Journal of pain research**, v. 10, p. 1811-1819, 2017.

TERZUOLI, E. et al. Antagonism of bradykinin B2 receptor prevents inflammatory responses in human endothelial cells by quenching the NF- κ B pathway activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

VELDMAN, P. et al. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy, prospective study of 829 patients. *Lancet*. **The lancet**, v. 615, n. November 1984, 1993.

WANG, D.; COUTURE, R.; HONG, Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 728, n. 1, p. 59–66, 2014.

WANG, H. et al. Bradykinin Produces Pain Hypersensitivity by Potentiating Spinal Cord Glutamatergic Synaptic Transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 35, p. 7986–7992, 2005.

WANG, H. et al. Bradykinin and peripheral sensitization. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 1, p. 11–14, 2006.

WANG, Z. I. et al. The role of bradykinin in lung ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model 1 Zheng Tang. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 3112, p. 807–812, 2016.

WASNER, G. et al. Vascular abnormalities in acute reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): complete inhibition of sympathetic nerve activity with recovery. **Archives of Neurology**, v. 56, p. 613-620, 1999.

WESSELDIJK, F. et al. Six Years Follow-up of the Levels of TNF and IL-6 in Patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. **Mediators of inflammation**, v. 2008, p. 1-7, 2008.

WOOLF, C. J. Central Sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3 Supplemental, p. 1–31, 2011.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765–1768, 2000.

WOOLF, L. A. J. NIH Public Access. **Neural Plasticity**, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.

YANG, A. et al. A critical role for plasma kallikrein in the pathogenesis of autoantibody-induced arthritis. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 12, p. fj.201700018R, 2017.

ZHOU, W. et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 10, p. 1363–71, 2000.