UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Giselle Guginski

PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA À NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR CITOPLASMA EM CAMUNDONGOS

Florianópolis/SC

2013

Giselle Guginski

PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA À NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR CITOPLASMA EM CAMUNDONGOS

Tese submetido ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis/SC

2013

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

Guginski, Giselle
PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA À NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR CISPLATINA EM CAMUNDONGOS / Giselle Guginski ; orientador, Giles Alexander Rae, 2013.
106 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2013.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Cisplatina. 3. Neuropatia. 4. Camundongos. 5. Endotelinas. I. Rae, Giles Alexander . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Giselle Guginski

PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA HIPERALGESIA MECÂNICA ASSOCIADA À NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR CITOPLASMA EM CAMUNDONGOS

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Juliana Geremias Chichorro, Dr(a).

Universidade Federal do Paraná

Prof.(a) Yara Cury, Dr(a).

Instituto Butantan

Prof.(a) Carlos Rogério Tonussi, Dr(a).

Universidade Federal de Santana Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmacologia

Rui Daniel Schroder Prediger:95223681053

Assinado de forma digital por Rui Daniel Schroder Prediger:95223681053
Dados: 2019.09.06 09:22:51 -03'00'

Prof. Dr. Rui Prediger

Coordenador(a) do Programa

Giles Alexander Rae:00698674880

Assinado de forma digital por Giles Alexander Rae:00698674880
Dados: 2019.09.05 17:11:59 -03'00'

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Orientador

Florianópolis/SC, 28 de agosto de 2013.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre guiou meus passos com carinho e reservou gratas surpresas a cada curva da estrada.

Ao meu orientador, Professor Doutor Giles Alexander Rae, primeiramente por me aceitar como orientanda e também pela visão enriquecedora tanto no campo profissional quanto pessoal. Muito obrigada Professor, serei sempre grata!

Aos meus pais, Evaldo e Marilda, que foram e continuam sendo indispensáveis na minha vida! Cada dia admiro mais vocês dois! Obrigada por todo o apoio e amor!

Ao meu marido, Rafael, por estar sempre presente, pelo incentivo diário, pelo auxílio, pelo amor, pelo carinho e pela compreensão! Certamente eu não poderia ter feito melhor escolha!

As melhores amigas-irmãs-madrinhas que alguém poderia imaginar, Marina e Denise. Não nos falamos todos os dias, como costumávamos fazer 20 anos atrás. Mas a simples existência da nossa amizade me deixa feliz, são um pedaço da minha família que eu pude escolher e que sempre estiveram presentes nos momentos decisivos da minha vida.

À todos os Professores do Departamento de Farmacologia e também do Departamento de Fisiologia, que durante este tempo contribuíram enormemente para a minha formação.

À Laurien Bruna Araújo Leonardi pela valiosa ajuda nos experimentos e pela convivência nos anos em que foi aluna de Iniciação Científica no laboratório.

À Lenyta, que foi e continua sendo uma grande amiga! Obrigada por tudo!

Às colegas de Laboratório pela enriquecedora convivência nestes anos.

Ao Allisson Freire Bento, e ao Professor Doutor João Batista Calixto, pelo valioso auxílio na realização do PCR.

À Chirle do Laboratório Morfofuncional pela valiosa ajuda na realização das imagens de Imunofluorescência.

Ao CNPq por viabilizar a realização deste doutorado.

"...Desejo a vocês, folhas da minha árvore: Paz, Amor, Saúde,

Sucesso, Tranquilidade e Prosperidade.

Hoje e sempre...

Simplesmente porque cada pessoa que passa em nossas vidas é única.

Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós.

Há os que levaram muito, mas não há os que não deixaram nada.

Esta é a maior responsabilidade de nossas vidas

E a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso!"

(Antoine de Saint-Exupéry)

"... eu não ignoro as ameaças que o futuro encerra como também não ignoro que é o meu passado que define a minha abertura para o futuro. O meu passado é a referência que me projeta e que eu devo ultrapassar. Portanto, ao meu passado eu devo o meu saber e a minha ignorância, as minhas necessidades, as minhas relações, a minha cultura (...). Que espaço o meu passado deixa pra minha liberdade hoje? Não sou escrava dele. O que eu sempre quis foi comunicar da maneira mais direta o sabor da minha vida, unicamente o sabor da minha vida. (...) ***Não desejei nem desejo nada mais do que viver sem tempos mortos.****"*

Fragmento do texto da peça Viver sem tempos mortos, baseado nas cartas entre Simone de Beauvoir e Jean Paul Sartre.

RESUMO

Desde 1970, a cisplatina é um quimioterápico muito utilizado para o tratamento de diversos tipos de tumores sólidos. No entanto, um dos efeitos colaterais mais limitantes deste fármaco é o aparecimento de neuropatias periféricas, que acometem cerca de metade dos pacientes submetidos a tratamento com ele. A patofisiologia deste tipo de dor causada por cisplatina ainda é bem pouco conhecida e de difícil manejo clínico. Por outro lado, alguns trabalhos demonstram o envolvimento do sistema das endotelinas em diversos tipos de neuropatia, mas sua participação na mediação de neuropatias associadas à quimioterapia ainda é desconhecida. O presente estudo teve como objetivo maior verificar se as endotelinas estão implicadas na manutenção da neuropatia induzida por cisplatina em camundongos. Verificou-se que injeções semanais de Cisplatina, na dose de 3 mg/kg (i.p.) por 4 semanas, causavam hiperalgesia mecânica de longa duração tanto na pata posterior quanto na face dos animais tratados. A resposta hiperalgésica mecânica dos animais tratados com cisplatina não foi modificada pelo tratamento neonatal com capsaicina. Drogas de referência para controle de dor e inflamação, tais como morfina, dexametasona, indometacina e celecoxibe reverteram parcialmente a hiperalgesia mecânica na pata e na face dos animais na primeira e na segunda semana após o início do tratamento com cisplatina, mas não foram efetivos na quarta semana. A gabapentina, um dos fármacos de referência para controle de dores neuropáticas, foi efetivo em reverter a hiperalgesia em ambas as regiões e em todos os períodos avaliados. O tratamento com antagonistas peptídicos seletivos para receptores ET_A (BQ-123) e ET_B (BQ-788) foram efetivos em reverter a hiperalgesia mecânica da face em todos os períodos avaliados, mas o mesmo não aconteceu na pata posterior, cuja hiperalgesia só foi reduzida por estes fármacos na primeira semana após o início do tratamento com cisplatina. Ensaios de RT-PCR quantitativo detectaram aumentos significativos de RNAm para receptores ET_A e ET_B no gânglio trigeminal dos camundongos após 2 e 4 semanas de tratamento com o quimioterápico. Também foram observados aumentos na expressão protéica de receptores ET_B (mas não ET_A) em imunoensaios de *Western Blot* no gânglio trigeminal, bem como de ambos os receptores em ensaios de imunofluorescência com gânglios de raízes dorsais lombares obtidos de animais após 2 e 4 semanas de tratamento com cisplatina. Este conjunto de resultados implica o sistema das endotelinas na manifestação da hiperalgesia mecânica associada à neuropatia promovida pelo tratamento prolongado com cisplatina em camundongos. O sistema das endotelinas pode vir a constituir um alvo atrativo para manejo terapêutico da neuropatia causada por este quimioterápico

Palavras-chave: Cisplatina. Dor neuropática. Neuropatia. Endotelina. Hiperalgesia. Neuralgia do trigêmeo.

ABSTRACT

Since 1970, cisplatin has been widely used as a chemotherapeutic drug to treat various types of solid tumors. One of the most limiting side effects of this drug is the occurrence of peripheral neuropathy, which affects about half of the patients and is poorly responsive to currently available analgesics. Currently, the pathophysiology of cisplatin-induced neuropathic pain is still incompletely understood, which hampers its effective clinical management. On the other hand, some studies have implicated the endothelin system in various types of neuropathy, but evidence for the participation of endothelins in mediating chemotherapy-associated neuropathies is lacking. Thus, the present study aimed to examine if endothelins are implicated in the maintenance of cisplatin-induced neuropathy in mice. It was found that weekly injections of cisplatin (3 mg/kg per week, i.p.) for 4 weeks caused long-lasting mechanical hyperalgesia in both the hind paw and forehead. Neonatal capsaicin treatment failed to modify the development of mechanical hyperalgesia in response to cisplatin. Acute treatment with the reference analgesic and/or anti-inflammatory drugs morphine, indomethacin, celecoxib and dexamethasone transiently and partially reversed paw and forehead mechanical hyperalgesia when injected at 1 or 2 weeks after initiating cisplatin treatment, but were effective at 4 weeks. In contrast, gabapentin, a reference drug to control neuropathic pain, was effective in reversing hyperalgesia in both regions in all 3 examined periods. Treatment with peptidergic antagonists selective for ET_A (BQ-123) and ET_B (BQ-788) receptors effectively reversed mechanical hyperalgesia in the forehead at 1, 2 or 4 weeks after starting cisplatin treatment, but hind paw hyperalgesia was only attenuated by these drugs after the first week. Quantitative RT-PCR assays detected significant increases in mRNA for ET_A and ET_B receptors in trigeminal ganglia collected at 2 and 4 weeks of cisplatin treatment. At 2 and 4 weeks of treatment with cisplatin, an increase in ET_B (but not ET_A) receptor protein expression was observed in trigeminal ganglia by Western blot immunoassay of the trigeminal ganglion, as well as of both receptors in lumbar dorsal root ganglia by immunofluorescence assays. Altogether, the results obtained show that prolonged treatment of mice with cisplatin activates the endothelin system to sustain neuropathic mechanical hyperalgesia of the forehead, but not of the hind paw, where endothelins seem to be involved only during the initial, non-neuropathic, sensory changes. The endothelin system could be an attractive target for therapeutic management of chemotherapy-induced craniofacial neuropathy.

Key words: Cisplatin. Neuropathic pain. Neuropathy. Endothelin. Hyperalgesia. Trigeminal neuralgia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos da aplicação semanal de cisplatina (3mg/kg, i.p.) durante 1, 2, 3, 4 e 5 semanas no decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica da pata traseira..... 30

Figura 2. Efeitos da aplicação semanal de cisplatina (3mg/kg, i.p.) durante 1, 2, 3, 4 e 5 semanas no desenvolvimento da Hiperalgesia mecânica facial.. . 31

Figura 3. Efeitos da administração de gabapentina (10 mg/kg, s.c.) ou morfina (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica da pata, nos dias 7, 14 e 28 após o início do tratamento semanal com cisplatina. 33

Figura 4. Efeitos da administração de gabapentina (10 mg/kg, s.c.) e morfina (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica da face, nos dias 7, 14 e 28 após o início do tratamento semanal com cisplatina. 34

Figura 5. Efeitos da administração de indometacina (1 mg/kg, i.p.), celecoxibe (30 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica aferida na pata posterior direita, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) após o inicio do tratamento semanal com cisplatina..... 36

Figura 6. Efeitos da administração de indometacina (1 mg/kg, i.p.), celecoxibe (30 mg/kg, i.p.) e dexametasona (2 mg/kg, s.c.), nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica aferida na face após o início do tratamento semanal com cisplatina..... 37

Figura 7. Efeitos da administração de cisplatina em animais previamente tratados (no período neonatal) com capsaicina ou veículo na hiperalgesia mecânica na pata.. 39

Figura 8. Efeitos da administração de cisplatina em animais previamente tratados (no período neonatal) com capsaicina ou veículo na hiperalgesia mecânica na face..... 39

Figura 9. Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_A (BQ-123), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da pata observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. 41

Figura 10. Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_B (BQ-788), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da pata observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina.. 42

Figura 11. Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_A (BQ-123), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da face observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. 43

Figura 12. Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_B (BQ-788), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da face observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. 44

Figura 13. Efeitos da administração do antagonista seletivo do receptor ET_A, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica da pata causada por repetidos tratamentos com cisplatina.. 45

Figura 14. Efeitos da administração do antagonista seletivo do receptor ET_A, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica facial causada por repetidos tratamentos com cisplatina. 46

Figura 15. Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A e ET_B em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos..... 49

Figura 16. Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A e ET_B em gânglios trigeminais de camundongos... 50

Figura 17. Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos.. 51

Figura 18. Imagens representativas da influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos 52

Figura 19. Imagens representativas ilustrando a influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_B em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos.. 53

Figura 20. Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_B em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diagrama temporal e espacial dos processos envolvendo células gliais na dor neuropática 6

Tabela 2. Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos.. 47

Tabela 3. Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos.. 48

Tabela 4. Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos.. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – microgramas
µl - microlitros
A – 192621 – (2R,3R,4S)-4-(1,3- benzodioxol-5-yl)-1-[2-(2, 6-dietilanilino)-2-oxoetil]-2-(4-propoxiphenil)pirrolidina-3- ácido carboxilíco
AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA – Análise de variância
BMS – 182874 - [5-(dimetilamino)-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1- sulfonamida de naftaleno
BQ 123 - ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]
BQ -3020 - Acetil-(Ala 11,15)-ET 1 (6-21)
BQ 788 - N-*cis*-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L-γ-metileucil-D-1 metoxicarbonil-D-norleucina
BSA – Albumina de sérum bovino
CA - Califórnia
Ca^{+2} - Íon Cálcio
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-1 – Enzima cicloxigenase tipo 1
COX-2 – Enzima ciclooxigenase tipo 2
DE - Delaware
DNA – Ácido desoxirribonucleico
E.P.M. – Erro padrão da média
ET-1 – Endotelina 1
ET-2 – Endotelina 2
ET-3 – Endotelina 3
ET_A – Receptor de Endotelinas tipo A
ETAR – Receptor de Endotelinas tipo A
ET_B – Receptor de Endotelinas tipo B
ETBR – Receptor de Endotelinas tipo B
EUA – Estados Unidos da América
FAM – 6 -carboxifluoresceína
FR- 129317 – antagonista seletivo do receptor ET_A
g – aceleração da gravidade
g - gramas
GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC - glicocorticóides
HRP – *Horseradish peroxidase*
i.p. - intraperitoneal

i.v.- intravenoso
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IgG – Imunoglobulina tipo G
IHS – Sociedade Internacional para estudo da Dor de Cabeça
IRL -1620 – agonista seletivo ET_B
L1 – primeira vértebra lombar
L6 – sexta vértebra lombar
LTP – potenciação a longo prazo
M - Molar
MA - Massachussets
mg/kg – miligrama/quilograma
MGB – *minor groove binder*
min - minutos
MI - Michigan
MO - Missouri
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl – Cloreto de sódio
ng - nanogramas
NIH – *National Institutes of Health (EUA)*
NIMH – *National Institute of Mental Health (EUA)*
nM – nanomolar
NMDA – N-Metil D- Aspartato
nmol - nanomol
OR - Oregon
PBS – solução salina tamponada
PCR – reação em cadeia de polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
RES-701-1 - antagonista peptídico do receptor ET_B
RNA – ácido ribonucleico
RNAm - ácido ribonucléico mensageiro
RNAse – ribonuclease
Ro 46-8443 - 4-tert-butyl-N-(6-(2,3- dihidroxipropoxi)-5-(2-metoxifenoxi)-2-(4-metoxifenil)piramidina-4-yl)benzenosulfonamida
RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase
RVM – medula rostroventromedial
s.c. - subcutâneo
SNC – Sistema Nervoso Central
SP – São Paulo
TBS-T – solução salina tamponada com Tris e acrescida de Tween 20
TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide 1
TX - Texas
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UK – Reino Unido

WI - Wiscosin
XIAP – Proteína Inibidora da Apoptose ligada ao gene X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Dor 1

1.2. Dor Neuropática 4

1.3. Neuralgia do Trigêmeo 8

1.4. Cisplatina 10

1.5. Endotelinas 13

2. OBJETIVOS 18

2.1. Objetivo Geral 18

2.2. Objetivos Específicos 18

3. MATERIAIS E MÉTODOS 19

3.1. Animais 19

3.2. Drogas, Reagentes e Soluções 19

3.3. Indução de neuropatia induzida por injeções repetidas de cisplatina 21

3.4. Testes comportamentais – estimulação mecânica 21

3.5. Tratamentos 22

3.6. Tratamento neonatal com capsaicina 23

3.7. Análise da expressão gênica dos receptores para endotelinas 23

3.8. Imunodetecção dos receptores para endotelinas 25

3.9. Localização tissular dos receptores endotelinérgicos 26

3.9. Análise Estatística 27

4. RESULTADOS 29

4.1. Influência da duração do tratamento com cisplatina na hiperalgesia mecânica 29

4.2. Efeitos anti-hiperalgésicos de fármacos de referência 31

4.3. Influencia do tratamento neonatal com capsaicina na hiperalgesia induzida por cisplatina..... 38

4.4. Efeitos anti-hiperalgésicos de antagonistas de receptores ET_A e ET_B... 40

4.5. Efeitos do tratamento com cisplatina sobre a expressão gênica e densidade de receptores ET_A e ET_B 47

5. DISCUSSÃO 55

6. CONCLUSÃO 61

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

O corpo humano possui inúmeros mecanismos de controle da homeostasia, entre os quais a dor, que exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar acerca de possíveis ameaças ao bem estar e a integridade do organismo, e reter nossa atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada (Chapman & Gavrin, 1999; Wall, 1979). Desta forma, a dor é um sinal vital clinicamente importante para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (Millan, 1999; Wolf, 2000; Almeida et al., 2004). Contemporaneamente, a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP – International Assossiation for the Study of Pain) define dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano" (Loeser & Treede, 2008). Analisando essa definição pode se verificar que existem então dois componentes distintos na dor: um emocional e outro fisiológico. Ao componente fisiológico (ou sensorial) da dor dá-se o nome de nocicepção e é esse o componente normalmente avaliado nos modelos animais de dor, uma vez que não permitem mensurar o significado emocional que estes animais atribuem ao estímulo nociceptivo (Millan, 1999).

Aproximadamente um século atrás, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de gerar dano tecidual (Gebhart, 2004). De acordo com esse modelo, os nociceptores têm limiares de ativação característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais. Eles estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Millan, 1999). Grosso modo, os nociceptores podem ser classificados em dois tipos de fibra:

- Fibras C – Não mielinizadas, com velocidade de condução mais lenta e dor com característica de queimação, que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos e por isso são chamadas polimodais.

- Fibras Aδ – Pouco mielinizadas, com velocidade de condução intermediária e dor com característica de agulhada, que respondem a estímulos mecânicos e térmicos.

Se estas fibras integrarem os nervos espinhais, elas então convergem para o corno dorsal da medula e lá fazem sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem. Estes ascendem até centros superiores no tronco encefálico e no diencéfalo, de onde partem neurônios de terceira ordem que alcançam o córtex cerebral, onde a sensação dolorosa será processada. Quando a via dolorosa passa pelo tronco encefálico, faz sinapse também com interneurônios responsáveis pela ativação da via de controle descendente da dor. Este sistema é responsável por modular a dor percebida através da liberação de substâncias antinociceptivas no corno dorsal da medula (Millan, 2002).

Diferentemente, as fibras nociceptivas que inervam a cabeça e a face integram diferentes nervos cranianos, dentre eles um dos mais importantes e com mais território de inervação é o Nervo Trigêmeo. Essas fibras nociceptivas têm seus corpos celulares reunidos no Gânglio do Trigêmeo, que também pode ser chamado de Gânglio de Gasser. Estes neurônios fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no tronco cerebral, que por sua vez conduzem a informação nociceptiva até diferentes núcleos do tálamo (Dostrovisky, 2000). O nervo trigêmeo também pode ser chamado de quinto par de nervos cranianos e possui este nome por dividir-se em três ramos principais: oftálmico, maxilar e mandibular (Sessle, 2005).

As aferências do gânglio do trigêmeo enviam projeções para o complexo sensorial do trigêmeo (formado pelos núcleos sensoriais principal e espinhal), localizados na altura da ponte, no sistema nervoso central (SNC). Enquanto o núcleo principal parece estar ligado a informações de tato (axônios de maior diâmetro), o núcleo espinhal parece estar intimamente ligado à informação nociceptiva, inclusive aquela associada à enxaqueca (Sessle, 2005).

A dor pode ser classificada como aguda ou crônica, de acordo com a sua duração. A dor aguda é caracterizada por uma rápida sensação desagradável, que alerta o organismo acerca de alguma ameaça física. Este tipo de dor geralmente responde bem ao tratamento com analgésicos opióides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Diferentemente da dor aguda, a dor crônica não tem função

biológica protetora. Mais que um sintoma, a dor crônica é a própria doença, pois a sensação de dor é incapacitante e interminável, podendo durar inclusive por décadas após a lesão inicial (Besson, 1999). A dor crônica pode ser subdivida em dor inflamatória e dor neuropática. A dor inflamatória, como o próprio nome sugere, é resultado da produção e secreção de mediadores químicos inflamatórios para os espaços extracelulares e sua ação sobre os nociceptores. Na segunda, a dor é deflagrada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central que, por vezes, pode ser decorrente de uma dor originalmente inflamatória (Gold & Gebhart, 2010).

1.2. Dor Neuropática

A dor neuropática foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “dor que representa uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensório” (Finnerup e Jensen, 2004). Pode ser iniciada por múltiplos fatores, tais como: dieta inadequada (excesso ou falta de vitamina B_{12}, por exemplo), diabetes mellitus (tipo I ou tipo II), inflamações crônicas, quadros infecciosos (como na neuralgia pós-herpética), amputações, compressões nervosas, alterações no sistema nervoso autônomo, tratamento com quimioterápicos, entre outros (para revisões ver Zimmermann, 2001; Mendell & Sahenk, 2003; Loeser & Treede, 2008).

A dor neuropática caracteriza-se por dor persistente, intensa e, em alguns casos, espontânea, associada a sensações de queimação e alfinetadas, geralmente acompanhada de hipersensibilidade (Finnerup & Jensen, 2004). Essas manifestações ocorrem principalmente devido a alterações morfofuncionais na medula espinhal (Coderre et al., 1993; Ji & Woolf, 2001). O quadro clínico pode manifestar-se por sintomas negativos (perda sensorial), assim como por sintomas positivos (parestesia, hipersensibilidade) (Chong & Bajwa, 2003). Em algumas situações, a dor neuropática pode se estender além dos limites do nervo lesionado, manifestando-se bilateralmente, o que sugere alterações nos mecanismos centrais de processamento da dor (Coderre et al., 1993).

Os principais mecanismos pelos quais o quadro álgico neuropático se instala são:

- *Brotamento*: quando fibras aferentes primárias nociceptivas, mais frágeis por serem menos mielinizadas, passam por alguma alteração ou sofrem apoptose, as fibras Aβ mais mielinizadas e resistentes, que normalmente terminam na lâmina III do corno dorsal da medula espinhal, sofrem um rearranjo e brotam para lâminas mais superficiais da medula, de modo a ocupar os espaços anteriormente preenchidos pelas terminações de nociceptores que degeneraram. As novas sinapses entre fibras proprioceptivas (Aβ) e neurônios nociceptivos de segunda ordem passam

a sinalizar estímulos inócuos como nocivos (Woolf et al., 1995; Tandrup et al., 2000).

- *Wind up*: As fibras nociceptivas de primeira e segunda ordem podem ser sensibilizadas (ou recrutadas) por estimulação repetitiva, resultando em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal (Herrero et al., 2000). Episódios como este podem levar à potenciação de longo prazo (*Long Term Potentiation* – LTP), a qual envolve um reforço persistente da transmissão sináptica (Pockett, 1995).
- *Diminuição da neurotransmissão inibitória*: principalmente no que se refere à neurotransmissão GABAérgica (Woolf, 2004), além da redução da eficácia de opióides endógenos (Zhang et al., 1998).
- *Liberação de mediadores pró-inflamatórios*: Assim como acontece no processo inflamatório, na dor neuropática, a ação dos mediadores excitatórios sobre seus receptores inicia uma cascata de sinalização que culmina na liberação de mediadores inflamatórios que mantém o potencial de ação, mantendo assim a via de sinalização de dor ativada e desta forma perpetuando a sensação dolorosa (Baron, 2006). A Tabela 1 demonstra quais os tipos celulares ativados em cada período do desenvolvimento da dor neuropática.

A patofisiologia do quadro é bastante complexa, tornando o manejo clínico da dor neuropática difícil, uma vez que ela se mostra refratária à maioria dos medicamentos analgésicos atualmente disponíveis para uso.

Tabela 1: *Diagrama temporal e espacial dos processos envolvendo células gliais na dor neuropática (adaptado a partir de Austin & Moalem-Taylor, 2010).*

Estrutura	Desenvolvimento de hipersensibilidade		Manutenção de hipersensibilidade	
Células Residentes	**Primeiras 24 hrs**	**3 dias**	**1 – 2 semanas**	**3 semanas ou +**
Nervo Periférico Mastócitos estáveis Macrófagos residentes **Cé**ls. de Schwann	Ativação do complemento Degranulação de mastócitos Pico de infiltração de neutrófilos Celulas de Schwann ativadas iniciam degeneração Walleriana	Pico de infiltração de macrófagos hematógenos Infiltração de linfócitos T	Continua a infiltração de linfócitos T e de macrófagos Continua a degeneração Walleriana	Pico de infiltração de linfócitos T em 3 semanas, continuando por até 6 semanas Degeneração Wallearianа e regeneração do nervo
Gânglio da raiz dorsal Células satélite Macrófagos residentes	Início da ativação de células satélite	Ativação de células satélite	Pico da ativação de células satélite Infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfóticos T	Ativação de células satélite continua por até 2 meses
Medula Micróglia quiescente Astrócitos	Início da ativação da micróglia	Início da ativação da micróglia	Picos de infiltração de células T Ativação do complemento Picos de ativação microglial	Ativação microglial e de astrócitos continua por no mínimo 3 meses
Cérebro Micróglia quiescente Astrócitos	Ativação da micróglia na medula rostroventro medial (RVM)	Ativação da micróglia na substancia cinzenta periaquedutal e no hipotálamo	Ativação de astrócitos na substância cinzenta periaquedutal	Desaparecimento da micróglia ativada na RVM

Guias de conduta médica indicam como terapia de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática os antidepressivos tricíclicos e ligantes da subunidade α2δ de canais de cálcio (O'Connor & Dworkin, 2009). Ainda constam como agentes de segunda escolha os inibidores da recaptação seletiva de serotonina e noradrenalina, a lidocaína e a capsaicina tópicas em casos de dores localizadas e como terceira escolha os analgésicos opióides. No entanto, o tratamento tem sucesso em pouquíssimos casos, e mesmo quando funciona o alivio da dor é de somente cerca de 50% da intensidade inicial. O índice de adesão ao tratamento é baixo, visto que a maior parte dos medicamentos supra citados tem efeitos colaterais importantes e/ou preços bastante proibitivos (Sawynok, 2003; Ueda, 2006; O'Connor

& Dworkin, 2009; Backonja & Woolf, 2010). Além disso, os diferentes tipos de dor neuropática reagem de formas diferentes ao tratamento medicamentoso.

Segundo revisão de O'Connor & Dworkin (2009), a dor neuropática induzida pelo tratamento com quimioterápicos é uma das formas de dor neuropática com pior resposta ao tratamento medicamentoso. Além disso, alguns quimioterápicos apresentam índices bastante elevados de incidência de neuropatia, como efeito adverso. Um exemplo bastante conhecido é a Cisplatina, acerca da qual alguns estudos apontam que até 80% dos pacientes tratados com esta droga desenvolvem dor crônica. Desta forma, fazem-se necessárias novas pesquisas acerca deste tema, que busquem melhor compreender os mecanismos subjacentes à dor neuropática induzida por quimioterápicos, bem como identificar novas formas para seu controle.

1.3. Neuralgia do Trigêmeo

A primeira descrição de uma situação similar à neuralgia trigeminal foi descrita ainda no século II a.C. por Aretaeus da Capadócia. Também conhecido por suas descrições de enxaqueca, ele fez referência a uma dor facial em espasmos, com alteração da mímica facial (Rose, 1999). No século XI o médico árabe Jujari menciona em seus escritos a ocorrência de dor facial unilateral causadora de espasmos e ansiedade. Em 1756, Nicolaus André descreveu o que ele imaginava ser uma nova doença e a batizou de *tic douloureux*, mas foi apenas em 1773 que John Fothergill publicou a primeira descrição completa de um caso de neuralgia do trigêmeo, e a chamou de doença de Fothergill (Quesada, 2005).

Atualmente, a neuralgia do trigêmeo é descrita como uma condição intensamente dolorosa, geralmente unilateral, caracterizada pela ocorrência de ataques de dor lancinante e súbita, paroxísticos e recorrentes, do tipo choque, que é limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo ("International Headache Society" – IHS, Nurmikko e Eldridge, 2001). A dor é comumente evocada por estímulos triviais como lavar o rosto, fazer a barba, fumar, falar ou escovar os dentes, mas também pode ocorrer espontaneamente (Krafft, 2008). A neuralgia do trigêmeo envolve, com maior frequência, o ramo maxilar (35%), seguido pelo mandibular (30%), ambos estes ramos (20%), os ramos oftálmico e maxilar (10%), o ramo oftálmico (4%) e todos os três ramos trigeminais (1%). Manifestações bilaterais da condição são raras (3%). A incidência anual da neuralgia do trigêmeo é baixa, de aproximadamente 4 por cada 100.000 habitantes, com discreta predominância (3:2) no sexo feminino. Geralmente acomete os indivíduos na faixa etária entre os 60 e 70 anos, sendo incomum antes dos 40 anos de idade (Krafft, 2008; Kleef et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Os três grandes ramos do par de nervos trigêmeos, com suas respectivas e extensas ramificações, são responsáveis pela inervação somato-sensorial da cabeça e face. O ramo oftálmico inerva testa, pálpebra, córnea, conjuntiva ocular, as mucosas dos seios frontais, etmoidais, esfenoidais e o dorso do nariz. O ramo maxilar inerva lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O ramo mandibular inerva lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva,

mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua. Enquanto que os dois primeiros ramos são puramente sensoriais, o terceiro ramo é formado tanto por fibras sensoriais, como fibras motoras responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios (Usunoff et al., 1997; Voogd et al., 1998).

Propõe-se que a neuralgia do trigêmeo origina-se da desmielinização do nervo, propiciando o desencadeamento de disparos ectópicos nas fibras sensoriais (Love e Coakham, 2001). Embora a maior parte da literatura atribua essa manifestação a causas compressivas, alguns poucos estudos relacionam o aparecimento alterações fisiopatológicas no gânglio trigeminal com o tratamento repetido com Cisplatina, como o relato de que um paciente que desenvolveu neuralgia do trigêmeo após a quarta infusão intra-arterial (carótida) de Cisplatina para tratar um glioma (Newton et al., 1989). Também há descrição de que, em animais, o tratamento com cisplatina aumenta a expressão de receptores de potencial transiente do tipo A1 (TRPA1) nos gânglios trigeminais de camundongos (Ta et al., 2010) e causa um desbalanço do sistema de excisão de nucleotídeos (responsável pela diminuição dos danos que a platina pode causar as células neurais) no gânglio trigeminal de ratos Fischer 344 (Guthrie, 2008). Porém, chama a atenção a falta de estudos que estabeleçam uma correlação entre o surgimento da neuralgia do trigeminal em resposta a tratamentos com quimioterápicos platinados.

1.4. Cisplatina

A introdução da quimioterapia com compostos derivados de platina, a partir da década de 70 (James et al., 2010), constituiu um grande avanço no tratamento de muitos tumores sólidos, sendo que dentre estes compostos o mais conhecido é a cisplatina. No entanto, apesar de sua considerável eficácia antitumoral, a cisplatina causa neurotoxicidade como efeito colateral indesejado entre 30 e 50% dos pacientes, a exemplo de outras drogas quimioterápicas, como a vincristina e o paclitaxel (Müller et al., 1990; Cavaletti et al., 1998, Authier et al., 2000).

A cisplatina é um potente agente antineoplásico que atua bloqueando a síntese do DNA por ligar-se ao nucleosídeo Guanina, além de causar apoptose por vias dependentes e independentes do fator p53, induzindo a caspase 3 e inibindo a proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossomo X (XIAP) (Seki et al., 2000; Nomura et al., 2004, Dzagnidze et al., 2007). Desta forma, desde a década de 1970, a cisplatina é um agente antineoplásico bastante utilizado, seja na forma de monoterapia, seja em combinação com o paclitaxel. A cisplatina é utilizada para tratamento de vários tipos de tumores sólidos de testículo, ovário, pulmão e vias aéreas, bexiga, útero cervical e diversos tipos de manifestações oncológicas da infância (Aloe et al., 2000; Dzagnidze et al., 2007), sendo que parte de seu efeito antitumoral deve-se à sua ação inibitória sobre a angiogênese no tumor (Umaphathi e Chaundhry, 2004) .

Administrada em concentrações superiores a 300 mg/m^2, a cisplatina pode mostrar-se tóxica, sendo que o principal transtorno decorrente do emprego de tais doses é a neuropatia periférica (Cavaletti et al, 1992, Authier et al., 2000). Esta condição afeta principalmente as fibras sensoriais mielinizadas de grande calibre, sendo que a deterioração do sistema nervoso pode se estender por até 3 a 4 meses depois da interrupção da terapia, com uma recuperação gradual e freqüentemente incompleta (Hovestadt et al., 1992 apud Authier et al., 2003). Sabe-se que este quadro é gerado por uma atrofia seguida de apoptose de células do gânglio da raiz dorsal, especialmente dos neurônios mielinizados e das células de Schwann (Cavaletti et al., 1998; Authier et al., 2000). Já está estabelecido também que quanto menor a capacidade das células neurais em reparar os complexos formados entre DNA e Cisplatina, maior o dano neural causado (Dzagnidze et al., 2007).

A hipotrofia seguida de apoptose de neurônios mielinizados gera uma facilitação indireta da atividade das fibras C (Authier et al., 2000). Além disso, há aumento substancial nos teores de neuropeptídeos tais como substância P (SP), CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), somatostatina e galanina no gânglio da raiz dorsal (Barajon et al., 1996). Vale salientar que enquanto alguns desses peptídeos têm efeito pró-nociceptivo, tais como SP e CGRP (Basbaum, 1999), a somatostina tem efeito antinociceptivo (Abd El-Aleen et al., 2005) e a galanina tem efeito dual, pró- e antinociceptivo (Hygge-Blakeman et al., 2004). Desta forma, é possível que enquanto alguns estejam envolvidos na gênese da dor neuropática, outros façam parte de um sistema inibitório (de controle) da dor.

O quadro clínico decorrente da instalação do processo acima descrito inclui a combinação paradoxal de perda sensorial associada com fenômenos de hipersensibilidade (ou seja, de alodínia e hiperalgesia) na área afetada. A dor resultante é de difícil manejo clínico, pois a etiologia é bastante heterogênea, a patofisiologia é complexa e, além disso, é refratária à maioria dos analgésicos tradicionais (Bennett, *1994* apud Authier et al., 2003). Sugere-se também que certas substâncias endógenas, como o fator inibidor de leucemia, o fator de crescimento endotelial, a vitamina E e o fator de crescimento neural podem ter efeitos benéficos sobre a neuropatia induzida pela cisplatina (Cavaletti et al., 1998; Aloe et al., 2000; Umapathi e Chandhry, 2004).

É interessante salientar que a quase totalidade da literatura disponível acerca da neuropatia causada por tratamento com cisplatina versa somente sobre a neuropatia periférica. No entanto, a partir do estudo de Newton et al. (1989) surgiram relatos clínicos de pacientes que desenvolveram neuropatia trigeminal após infusão de Cisplatina para tratamento de Glioma. Além disso, Sugimoto e colaboradores (2000) verificaram que ratos Sprague-Dawley recém-nascidos que recebiam uma única dose de cisplatina administrada subcutâneamente apresentavam maciça morte de células gliais no gânglio trigeminal. Isto nos sugere que a cisplatina pode nos fornecer um bom modelo de neuropatia trigeminal não compressiva.

Entre os múltiplos sistemas implicados na mediação de alterações sensoriais observados em modelos de dor neuropática de diversas etiologias está o das endotelinas (Stokely et al, 2002; Klass et al., 2005; Chichorro et al., 2006; Berti

Mattera et al, 2006; Chichorro et al, 2009; Werner et al, 2010). Recentes revisões de literatura acerca de alvos potenciais para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos que possam auxiliar o tratamento das neuropatias também apontam na direção do sistema endotelinérgico (Jaggi e Singh, 2011; Hoyer e Bartfai, 2012). Ainda corroborando esta sugestão, foi publicado recentemente (Murphy, O'Callagham e Gaine, 2010) um relato de caso de um paciente de 47 anos que, ao tomar um antagonista endotelinérgico (sitaxsentan) para tratar hipertensão pulmonar, viu uma melhora expressiva em um quadro de dor crônica (ciatalgia, iniciada 2 anos antes e que respondia apenas incipientemente a outros medicamentos analgésicos). Desta forma, o sistema endotelinérgico mostra-se como um alvo de estudo bastante promissor para desvendar novos aspectos da fisiopatologia da neuropatia periférica causada por cisplatina.

1.5. Endotelinas

A família das endotelinas (ETs) é composta de três membros principais: Endotelina-1 (ET-1 – constituinte mais importante), Endotelina-2 (ET-2) e Endotelina-3 (ET-3). Todas elas são peptídeos constituídos de 21 aminoácidos que são capazes de produzir efeitos variados em múltiplos tecidos e sistemas. Embora as células endoteliais do sistema circulatório sejam a principal fonte produtora de ET-1, os genes que codificam os peptídeos são expressos em graus variados, por uma ampla variedade de células (Kedzierski & Yanagisawa, 2001).

Em mamíferos, as endotelinas exercem suas ações através de dois receptores específicos, ET_A e ET_B, ambos da superfamília de receptores acoplados a proteínas G. O receptor ET_A apresenta uma maior afinidade pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3, enquanto o ET_B exibe afinidades semelhantes às três isoformas (Sakurai et al., 1990). Os receptores endotelinérgicos encontram-se em neurônios e também em múltiplas células gliais, incluindo astrócitos, microglia e células de Schwann, tanto no sistema nervoso central quanto periférico (Pomonis et al., 2001).

Além disso, as endotelinas estão envolvidas em uma gama de outras ações no sistema circulatório tais como: excreção renal, controle da pressão arterial, entre outros. Porém também exerce efeitos pleiotrópicos em diversos tecidos dos tratos respiratório, gastrointestinal, urogenital, no sistema nervoso central e periférico. As ETs também estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, câncer, inflamação e dor (para revisões ver Davenport & Maguire, 2006; Ohkita et al., 2012; Lalich et al., 2007; Russo et al., 2010; Khodorova, Mantmayeur e Strichartz, 2009).

Estudos pré-clínicos recentes relacionam antagonistas endotelinérgicos com inibição da proliferação celular de tumores malignos, diminuindo assim também a capacidade de invasão de tecidos subjacentes e formação de novos vasos (Lalich et al., 2007). Corroborando estes dados verifica-se a participação da Endotelina-1 agindo através de receptor ET_A contribuindo para o crescimento tumoral de múltiplos tipos de câncer (Russo et al., 2010). Achados pré-clínicos demonstraram que antagonistas endotelinérgicos aumentam a eficácia de drogas citotóxicas, como por

exemplo, o paclitaxel em modelos de câncer de cólon de útero e de ovário. Alguns estudos clínicos foram realizados utilizando Atrasentan e Zibotentan (ambos antagonistas não peptídicos seletivos para ET_A) para o tratamento do câncer de próstata, além de Bosentan para o tratamento do melanoma. Outros estudos ainda utilizam a associação entre antagonistas da endotelina e quimioterápicos clássicos. Os efeitos colaterais ainda são muito limitantes, mas este sistema continua sendo considerado um alvo promissor para desenvolvimento de novas drogas (Para revisão ver Lalich et al., 2007 e Russo et al., 2010)

A participação de receptores ET_A e ET_B na mediação de ações das endotelinas pode ser discriminada pelo uso de agonistas e antagonistas seletivos dos mesmos. Assim sendo, os receptores ET_A são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, cujos principais representantes são BQ-123 e FR139317, ou não peptídicos tais como o atrasentan e o BMS 182874. Até o presente momento não foi encontrado um agonista verdadeiramente seletivo para receptores ET_A. Por sua vez, os receptores ET_B podem ser ativados seletivamente pela sarafotoxina S6C, BQ-3020 e IRL 1620, entre outros, e bloqueados por antagonistas peptídicos como o BQ-788 e RES-701-1, ou por antagonistas não peptídicos, tais como Ro 46-8443 ou A-192621 (Opgenorth et al., 1996; Weeb e Meek, 1997; Remuzzi et al., 2002).

Ferreira e colaboradores (1989) foram os que primeiro demonstraram propriedades nociceptivas das endotelinas, ao descrever que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos, incapacitação articular em cães e sensação de prurido e alodinia mecânica em humanos injetados com ET-1 no antebraço. Desde então, inúmeros outros trabalhos ratificam a participação da endotelina na resposta de dor em mamíferos das mais variadas espécies (Ferreira et al., 1989, Dahlof et al., 1990; Piovezan, 1997; Remuzzi et al., 2002; Hans et al., 2008).

Contudo, a participação de cada tipo de receptor nos efeitos nociceptivos das ETs só começou a ser realmente elucidada a partir da disponibilidade de antagonistas seletivos ET_A e ET_B e a clonagem destes receptores (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Com isso, pode ser demonstrado que algumas ações da ET-1, tais como as contorções abdominais em camundongos, podem ser evocada por

ativação de receptores ET_A e ET_B (Raffa et al, 1996), enquanto outras ações, como a hipernocicepção térmica decorrente de administração de ET-1 na pata, são dependentes somente de receptores ET_A (Piovezan et al., 2000; Menéndez et al., 2003).

Outra ferramenta importante para a investigação da função dos receptores endotelinérgicos na dor só apareceu a partir de 1994, quando Hosoda e colaboradores produziram os primeiros camundongos que não expressavam receptores ET_B. A disponibilidade destes animais permitiu elucidar que ambos os receptores ET_A e ET_B participam da hipernocicepção mecânica em modelos de dor inflamatória, mas somente ET_A está envolvido na hipernocicepção térmica (Griswold et al., 1999; Baamonde et al., 2004a). No entanto, como demonstrado nos trabalhos que fizeram uso destes animais que não expressam o gene para o receptor ET_B, trata-se de animais com baixa expectativa de vida. Isso ocorre porque o receptor ET_B é necessário durante a embriogênese para formação de melanócitos e migração de células da crista neural (neurônios imaturos) para o cólon. Desta forma os animais *knockout* para ET_B apresentam falhas de pigmentação cutânea e morrem em virtude de megacólon em poucas semanas (Shin et al., 1999; Griswold et al., 1999). Além disso, sabe-se que o bloqueio de receptores ET_A é capaz de reduzir a nocicepção e a hipernocicepção mecânica e térmica em modelos de dor associada ao câncer em camundongos (Peters et al., 2004; Baamonde et al, 2004b).

Sabe-se também que a administração periférica de ET-1 desencadeia comportamento nociceptivo mediado por fibras C e Aδ, ativadas por receptores ET_A, com conseqüente aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e ativação de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina. Este mecanismo pode ser bloqueado por morfina ou antagonistas de receptores ET_A (Davar et al., 1998; Zhou et al., 2001; 2002). Já os receptores ET_B parecem desempenhar uma função dual, uma vez que sua ativação pode (direta ou indiretamente) ativar fibras nociceptivas, induzindo comportamento nociceptivo, bem como estimular queratinócitos a liberarem beta-endorfina, que atua como mediador antinociceptivo opióide (De Melo et al., 1998; Pomonis et al., 2001; Khodorova et al., 2002; 2003; Verri et al., 2005; Berti-Mattera et al., 2006)

Em contraste com as suas ações periféricas predominantemente pró-nociceptivas, as ETs parecem exercer ações antinociceptivas quando administradas centralmente. Os efeitos antinociceptivos supra-espinhais da ET-1 e da ET-3 parecem ser mediados pela ativação de canais de Ca^{+2}, mas independem da liberação de opióides endógenos (Kamei et al., 1993; Nikolov et al., 1993), enquanto os efeitos antinociceptivos espinhais da ET-1 se devem, pelo menos em parte, à ativação de canais de Ca^{+2} e aumento da liberação de metionina-encefalina, que age sobre os receptores opióides do tipo δ (Kamei et al., 1993). Além disso, a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, na substância cinzenta periaquedutal, parece ser uma etapa essencial na antinocicepção induzida pela microinjeção central de ET-1 (D'Amico et al., 1997).

Tomados em conjunto, os dados acima sugerem a possibilidade de que mecanismos operados por ativação de receptores de ET possam modular diferentemente processos de dor aguda e crônica, ou então o processamento de informação nociceptiva pelo sistema nervoso periférico e pelo central (De Melo et al., 1998; Piovezan et al., 1998). Para revisões mais aprofundadas e completas sobre as implicações das ETs na nocicepção ou dor, ver Hans et al. (2008, 2009), Khodorova et al. (2009) e Barr et al. (2011).

Têm-se ciência que há participação do sistema das ETs no comportamento nociceptivo desencadeado por diversos modelos de neuropatia periférica. Alguns estudos de Chichorro e colaboradores (2006, 2009) demonstram que os receptores ET_A e ET_B estão envolvidos na patogenia da hiperalgesia térmica e mecânica trigeminal causada por constrição do nervo infraorbital em (Chichorro et al., 2006; Chichorro et al, 2009). Outro estudo demonstra que os antagonistas receptores endotelinérgicos reduzem significativamente a hiperalgesia térmica e mecânica causada por constrição do nervo ciático em ratos. Este mesmo estudo ainda demonstra que há aumento de concentração de ET-1 no local da lesão do ciático (Klass et al., 2005). Neste sentido, estudo de Cameron e Cotter (1997) sugere ainda que antagonistas duais ET_A/ET_B são menos eficientes que antagonistas ET_A seletivos no controle da nocicepção em modelos de neuropatia diabética em ratos. Estudos anteriores do nosso grupo (Werner et al., 2010) demonstram que há a participação de receptores ET_A e ET_B na hiperalgesia térmica induzida por ligadura do nervo espinhal em ratos.

Ainda que não haja relatos específicos de estudos prévios relacionando o desenvolvimento de neuropatia induzida por cisplatina com o sistema das ETs, existem evidências na literatura de interações significativas entre a cisplatina e as ETs, Por exemplo, as ETs regulam a excreção renal de cisplatina via receptores ET_B, podendo inclusive gerar nefrotoxidade (Masereeuw et al., 1999). Por outro lado, a administração de cisplatina por 1 ou 2 semanas aumenta a excreção renal de ET-1 (relativa à de creatinina) em pacientes com câncer testicular (Takeda et al., 1994). Por fim, o bloqueio de receptores ET_A sensibiliza células tumorais de câncer nasofaríngeo humano à apoptose induzida por cisplatina (Mai et al., 2006).

Todos estes dados, tomados em conjunto, sugerem que pode haver interação entre o sistema endotelinérgico e a neuropatia causada por administrações repetidas de cisplatina, que não foi ainda estudada de modo objetivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar, através do emprego de modelos comportamentais e por técnicas farmacológicas e de biologia molecular, o possível envolvimento das endotelinas e seus receptores (ET_A e ET_B) na nocicepção neuropática induzida por injeções repetidas de cisplatina.

2.2. Objetivos Específicos

1. Investigar o decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, no modelo de neuropatia induzida por injeções de cisplatina.
2. Investigar a participação das endotelinas endógenas e seus receptores na manifestação da hiperalgesia mecânica induzida por cisplatina, através do tratamento *a posteriori* dos animais com antagonistas seletivos dos receptores ET_A ou ET_B ou antagonistas duais ET_A/ET_B em diferentes doses;
3. Analisar a possível participação das fibras aferentes primárias do tipo C sensíveis a capsaicina na neuropatia causada por injeções repetidas de cisplatina em camundongos.
4. Investigar o efeito antinociceptivo de algumas drogas de referência já utilizadas na clínica para dores neuropáticas sobre este modelo de nocicepção crônica.
5. Analisar as possíveis alterações induzidas por tratamento com cisplatina nos níveis de RNAm e de proteína dos receptores ET_A e ET_B, no gânglio da raiz dorsal de camundongos, através das técnicas de PCR e *Western Blot*.
6. Analisar, através da técnica de imunohistoquímica, possíveis alterações na localização de receptores ET_A e ET_B nos gânglios da raiz dorsal de camundongos que receberam tratamento com cisplatina e desenvolveram neuropatia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, neonatos e adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos em condições de temperatura (22 ± 2°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara iniciando às 06:00 hs) controladas. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para manejo e investigação de dor experimental em animais de laboratório (Couto, 2011). Os experimentos foram realizados sempre durante a fase clara do ciclo e mediante aprovação prévia dos protocolos experimentais pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Laboratório da UFSC (CEUA; protocolo número 2308080.018994/2008-39). Logo após a realização dos experimentos, a maioria dos animais foi sacrificada por deslocamento cervical, com exceção dos grupos de animais que tiverem os gânglios da raiz dorsal removidos para ensaios de biologia molecular, que foram sacrificados por anestesia profunda com cetamina e xilazina.

3.2. Drogas, Reagentes e Soluções

Foram empregadas as seguintes drogas, reagentes e/ou soluções:

- Anticorpo primário policlonal anti-ET_A, ETAR – sc-33535, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA);
- Anticorpo primário policlonal anti-ET_B, ETBR, sc-33538, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA);
- Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com uma peroxidase (Promega, Madison, WI, EUA);
- Atrasentan (Abbott Laboratories, North Chicago, EUA) - antagonista não peptídico seletivo de receptores ET_A;

- BQ-123 (ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]) (RBI, Natick, EUA) - antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A;
- BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L-γ-metileucil-D-1 metoxicarbonil-D-norleucina), (RBI, Natick, EUA) - antagonista peptídico seletivo de receptores ET_B;
- Capsaicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Celecoxibe (Celebra®,Searle-Pfizer, Caguas, Porto Rico);
- Cisplatina (Bergamo, São Paulo, SP, Brasil);
- Cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil);
- Cloridrato de morfina (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil);
- Dexametasona (Decadronal®, Laboratórios Prodome, SP, Brasil);
- Gabapentina (Neurontin®, Pfizer, SP, Brasil);
- Indometacina (Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Primer para receptor ET_A (Mm01243722_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA);
- Primer para receptor ET_B (Mm01224433_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA);
- Primer para GAPDH (NM_008084.2, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA);
- Solução salina tamponada com fosfato (0,01 M de tampão fosfato, 0,0027 M de cloreto de potássio e 0,137 M de cloreto de sódio, pH 7.4, a 25º C, *phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma, St. Louis, MO, EUA);
- Solução estéril de NaCl 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO).

3.3. Indução de neuropatia induzida por injeções repetidas de cisplatina

Para a indução de neuropatia, os camundongos machos adultos receberam quatro injeções intraperitoneais de cisplatina, sendo uma por semana, na dose de 3 mg/kg cada, totalizando 12 mg/kg por animal. Para prevenir dano renal, cada animal recebeu por via subcutânea 10 µl/g de solução salina (NaCl 0,9%) antes de cada administração de cisplatina. A cada semana foram realizados testes comportamentais antes de cada injeção semanal de cisplatina para verificar se os animais desenvolveram ou não hiperalgesia mecânica (Apfel et al., 1992). Animais do grupo controle foram tratados com o veículo (solução salina de NaCl a 0,9%) e analisados da mesma maneira que os dos grupos experimentais.

3.4. Testes comportamentais – estimulação mecânica

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados nas caixas de observação (caixas de acrílico em uma base elevada feita com uma tela metálica) por aproximadamente 120 minutos. Em seguida, os animais foram submetidos à aplicação consecutiva de estímulos mecânicos à superfície plantar da pata posterior direita, utilizando filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) capazes de exercerem entre 0,02 a 2 g (0,02; 0,04; 0,16; 0,4; 0,6; 1,0; 1,4 e 2,0 g) de pressão. Reações de retirada da pata provocadas pela estimulação com um filamento foram consideradas respostas positivas ao estímulo. Cada filamento foi aplicado durante 5 segundos. Foram utilizadas seis aplicações consecutivas, com intervalos de no mínimo 30 segundos entre elas, utilizado como primeiro filamento o de 0,4 g e aumentando ou diminuindo o calibre do filamento seguinte conforme a ausência ou presença de resposta frente ao estímulo anterior, respectivamente. Conforme a técnica descrita por Chaplan e colaboradores (1994), a resposta nociceptiva foi caracterizada como 50% do limiar de retirada da pata (g).

Além disso, para verificar a sensibilidade mecânica na região inervada pelo trigêmeo, os animais foram submetidos à estimulação repetida com o filamento 0,04 g entre as orelhas, no centro da região superior da cabeça do animal. Foram realizadas 10 aplicações consecutivas, com um intervalos de no mínimo 30 segundos entre cada uma. A resposta foi considerada positiva quando o estimulo evocava uma reação de retirada rápida (ataque/escape) da cabeça.

Para análise do decurso temporal da hiperalgesia mecânica, os animais foram estimulados diariamente após a primeira injeção de cisplatina. Em outro bloco de experimentos os animais receberam tratamentos semanalmente (ver abaixo) e foram avaliados repetidamente em intervalos entre 1 e no máximo 5 horas.

3.5. Tratamentos

Após a primeira administração de cisplatina (ver item 3.3) grupos distintos de animais receberam na primeira (7 dias), segunda (14 dias) e quarta semanas (28 dias), os tratamentos sistêmicos listados abaixo:

- Gabapentina (antiepilético) – 10 mg/kg, s.c. (Laughlin et al., 2002);
- Morfina (agonista opióide) - 2 mg/kg, s.c. (Rosland et al, 1990);
- Indometacina (anti-inflamatório não esteroidal) – 10 mg/kg, i.p. (Young et al, 2005);
- Celecoxibe (inibidor seletivo COX-2) – 30 mg/kg – i.p. (Manjavachi et al, 2010);
- Dexametasona (anti-inflamatório esteroidal) – 2 mg/kg, s.c. (Silva et al., 2003);
- BQ-123 (antagonista peptídico seletivo para receptor ET_A) – 3, 10 e 30 nmol, s.c.;
- BQ-788 (antagonista peptídico seletivo para receptor ET_B) – 3, 10 e 30 nmol, s.c.;
- Atrasentan (antagonista não peptídicoseletivo para receptor ET_A) – 10 mg/kg, i.v. (Chichorro et al., 2009).

Em todos os experimentos, os animais dos grupos controle foram tratados de modo idêntico com volumes semelhantes do veiculo correspondente, salina ou PBS, conforme mais apropriado.

3.6. Tratamento neonatal com capsaicina

Camundongos Swiss machos neonatos foram tratados, no segundo dia de vida pós-natal, com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou veículo (solução de NaCl 0,9% acrescida de 10% de Tween 80, 10µl/g, s.c.). Este tratamento neonatal destrói as fibras C sensíveis a capsaicina (Ikeda et al., 2001). A eficácia deste tratamento foi confirmada quando os animais atingiram 2 meses de vida através da administração ocular de capsaicina (0,01%, 50 µl no olho direito) e subseqüente contagem do número de movimentos palpebrais durante 1 min, conforme descrito por Ikeda et al. (2001). Quando estes animais atingiram a idade adulta (aos 3 meses), eles foram submetidos a injeções semanais repetidas de cisplatina para indução de neuropatia, conforme descrito no item 3.3, e avaliou-se sua reatividade à aplicação de estímulos mecânicos à pata traseira e na fronte conforme descrito no item 3.4.

3.7. Análise da expressão gênica dos receptores para endotelinas

As alterações da expressão gênica dos receptores endotelinérgicos nos gânglios da raiz dorsal, medula espinhal e gânglio do trigêmeo de camundongos foram avaliadas através da quantificação dos níveis teciduais de RNAm para receptores ET_A e ET_B, utilizando a técnica de RT-PCR. Na 1ª, 2ª e 4ª semana após o início do tratamento, os animais foram sacrificados por anestesia profunda com cetamina e xilazina. Em seguida, os gânglios da raiz dorsal e os gânglios trigeminais foram removidos, de ambos os lados, bem como a porção lombar medula espinhal (L1 a L6). As amostras de tecido foram imediatamente lavadas em PBS, submergidas em Trizol, congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80ºC até sua utilização. Para a realização dos ensaios, cada tecido foi então descongelado e homogeneizado utilizando micro-pistilos cônicos para trituração de amostras (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e mantidos por 5 min entre 15 e 30ºC, após o qual foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio. Os tubos contendo as amostras foram agitados manualmente por 15 s e novamente incubados entre 15 e 30ºC durante 2 a 3 min, antes de serem centrifugadas a 12.000 *g* por 15 min entre 2 e 8º C. A fase aquosa foi então removida para um novo tubo, no qual foi adicionado 0,5

ml de álcool isopropílico para se precipitar o RNA. Após 10 min em temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 *g* durante 10 min em uma temperatura entre 2 e 8ºC, para originar um precipitado (*pellet*) de RNA com aparência coloidal na lateral e no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA foi lavado uma vez com 1 ml de etanol a 75%. As amostras foram agitadas por vortex e então centrifugadas durante 5 min a 7.500 *g* entre 2 e 8ºC. O pellet de RNA foi então seco por 5 a 10 min e em seguida dissolvido em água livre de RNAse. A absorbância da solução foi medida utilizando-se o NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Em seguida se deu o isolamento do DNA pelo protocolo MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), no qual se utiliza uma única fita de DNA ou RNA na presença de uma sonda (*primer*) para sintetizar um DNA complementar (cDNA). Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado 1 µg de mRNA acrescido, num tubo de microcentrífuga, a 1 µl de oligo dT 12-18 (500 µg/ml – Promega, Madison, WI, EUA), de 1 ng a 5 µg de RNA total e 1 µl de dNTP mix 10 mM (Applied, Foster City, CA, EUA), complementado com água destilada estéril até o volume de 12 µl. A mistura foi aquecida até 65ºC por 5 min e resfriada rapidamente em gelo. Os componentes do tubo foram coletados por rápida centrifugação e a eles foram adicionados: 4 µl de *5X First Strand Buffer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 2 µl de DTT 0,1 M (Applied, Foster City, CA, EUA) e 1 µl de *RNAse out* (Applied, Foster City, CA, EUA). Os componentes do tubo foram delicadamente misturados e incubados a 37ºC por 2 min. Em seguida foi adicionado 1 µl de MMLV RT (200 unidades – Promega, Madison, WI, EUA) e o conteúdo foi misturado com a pipeta, incubada por 50 min a 37ºC e a reação interrompida por aquecimento a 70ºC por 15 min. Na sequência, cerca de 10% do volume da reação da primeira fita (1,5 µl) foi utilizada para amplificação do PCR em um tubo de PCR ao qual foram adicionados: *primer sense* (200 nM), *primer antisense* (200 nM), cDNA (10 pg – 200 ng) e 22,5 µl de kit para reação de PCR *AccuPrime Pfx SuperMix (*Invitrogen, Eugene, OR, EUA). A amostra foi incubada por 5 min no termociclador a 95ºC, e em seguida foram realizados 35 ciclos consecutivos nos quais as amostras foram mantidas sequencialmente a 95ºC por 15 s, 55 a 65ºC por 30 s e 68ºC por 1 min. Em seguida cada amostra foi mantida a 4ºC e então analisadas imediatamente ou estocadas a -20ºC até que a analise fosse feita. O DNAc foi amplificado em triplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com primers específicos para camundongos (da Applied Biosystems,

Foster City, CA, EUA), com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os receptores ET_A (Mm01243722_m1), receptores ET_B (Mm01224433_m1) e GAPDH (NM_008084.2), o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 µL de DNAc, 5 µL de master mix, 0,5 µL de primer e 3,5 µL de água ultrapura, em um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para 40 ciclos; a fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa. Os dados foram comparados a uma curva de amplificação de RNA para GAPDH realizada paralelamente.

3.8. Imunodetecção dos receptores para endotelinas

Com o objetivo de avaliar as alterações nos níveis de expressão de receptores ET_A e ET_B, utilizamos a técnica de imunodetecção (*Western blot*) conforme protocolo descrito por Andre e colaboradores (2004). Porém, em vista da dificuldade para se conseguir quantidades satisfatórias de proteína para dosagens com a utilização de gânglios da raiz dorsal de camundongos, foram realizadas tais dosagens apenas em amostras de gânglios do trigêmeo e de medula espinhal. Na 1ª, 2ª e 4ª semanas após o início do tratamento com cisplatina, os animais foram sacrificados por *overdose* de cetamina e xilazina. Um fragmento de medula espinhal (apenas a porção lombar) e ambos os gânglios trigeminais foram rapidamente removidos de cada animal, lavados com PBS, prontamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70ºC até o momento do uso. Os tecidos foram então homogeneizados em PBS gelado contendo 10 µg/ml de aprotinina e de leupeptina, em pH 7,9, e mantidos em gelo. O homogenato foi primeiramente centrifugado a 1.700 *g* por 15 min a 4ºC. O precipitado contendo partículas de *debri* mal pulverizadas foi descartado e o sobrenadante foi então centrifugado a 20.000 g por 45 min a 4ºC. O novo sobrenadante, correspondente ao extrato citosólico, foi descartado e o *pellet* resultante re-suspenso no tampão de homogeneização acrescido de Triton X-100 a 1 %, que foi novamente centrifugado a 20.000 *g* por 45 min a 4ºC. Este novo sobrenadante resultante, que correspondente

à fração rica em proteínas de membrana, foi coletado e a concentração de proteínas nessa amostra foi determinada utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad® Laboratories, EUA). Aproximadamente 50 µg de proteínas foram adicionadas em tampão contendo Tris-SCl 200 mM, β-mercaptoetanol 2,75 mM, 10% de glicerol, 2% de SDS e 0,04% de Azul de Bromofenol e a solução foi fervida durante 5 min. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram alocadas diretamente no sistema de detecção de proteínas SNAP i.d.® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Os filtros foram bloqueados com tampão TBS-T (*Tris-buffered saline solution* – Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150mM, contendo 0,1% de Tween 20), acrescido de 1% de albumina sérica bovina. Os filtros foram então embebidos com anticorpos primários IgG de coelho específicos para ET_A ou ET_B (sc-33535 e sc-33538, respectivamente, ambos da Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), na proporção de 1:100 e 1:80, respectivamente, durante 10 min em temperatura ambiente. Depois disso as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS-T. Após a lavagem, os blots foram incubados com anticorpo secundário HRP (*horseradish peroxidase*) IgG de burro anti-coelho (Promega, Madison, WI, EUA; proporção 1:500) por 10 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T e então as bandas específicas para receptores ET_A e ET_B foram visualizadas por quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL da Amersham (GE Healthcare, UK). A densidade óptica das bandas específicas para estes receptores foi quantificada por densitometria, através de um programa para análise de imagens (Scion Image for Windows, Maryland, EUA) e expressa em porcentagem, onde a média do grupo controle para cada semana foi considerada 100%.

3.9. Localização tissular dos receptores endotelinérgicos

Os animais foram anestesiados profundamente com uma solução 1:1 de cetamina e xilazina (10 µl/g, intramuscular, no quadríceps da perna direita), perfundidos transcardiacamente com PBS (a 4º C, pH 7,4) e todos os gânglios da raiz dorsal foram removidos. Os tecidos coletados foram então emblocados em

*Tissue Tek O.C.T. (*Sakura Finetech EUA, Torrance, CA, EUA), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80º C até o momento do seu processamento. Os blocos foram cortados em um criostato Leica modelo CM1850 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) a -20ºC em secções (ou fatias) de 12 µm de espessura, as quais foram montadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. As lâminas foram mantidas a 20ºC negativos até o início da realização do ensaio. Nesta etapa, os cortes foram primeiramente lavados com PBS (3 vezes, por períodos de 10 min cada), incubados em acetona a 4ºC durante 20 min e novamente lavados com PBS. Em seguida, foram incubados por 30 min em tampão de bloqueio (BSA a 1%, Triton X 100 a 0,3% e PBS) previamente à incubação *overnight* a 4º C com anticorpo primário para receptores ET_A (ETAR sc-33535, IgG de coelho, Santa Cruz Biotechnology, 1:200) e ET_B (ETBR sc-33538, IgG de coelho, Santa Cruz Biotechnology, 1:200), cada qual diluído em tampão de bloqueio acrescido de 0,02% de azida de sódio. Após esta primeira incubação, os cortes foram protegidos da luz, lavados com PBS e incubados com o fluoróforo Alexa Flúor 488 (de burro anti-coelho, Invitrogen, A-21206, 1:100) por 2 h em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram lavados com PBS, protegidos com Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA) e cobertos com as lamínulas. As imagens foram visualizadas e capturadas através de microscopia de fluorescência (Microscópio Nikon modelo 80i Eclipse, Tóquio, Japão) e posteriormente se deu a quantificação destes receptores através do programa ImageJ (NIH, NIMH, Bethesda, MD, EUA).

3.9. Análise Estatística

Os resultados quantitativos são apresentados como média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais ou amostras por grupo. Os dados obtidos nos experimentos comportamentais foram analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste *post-hoc* de *Bonferroni*. Os dados relativos à densitometria foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Student não pareado, bicaudal. Em todas as análises, as diferenças com valores de probabilidade (P) menores do que 0,05 foram consideradas

estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Graphpad Prism 5® (Graphpad Software, La Jolla, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Influência da duração do tratamento com cisplatina na hiperalgesia mecânica

Com a intenção de verificar se os modelos descritos na literatura (Apfel et al., 1992; Authier et al., 2003) poderiam ser replicados nas nossas condições laboratoriais, foi realizado um experimento no qual os animais receberam diferentes regimes de tratamento semanal com Cisplatina (3 mg/kg, i.p.) e foram avaliados quanto à sua sensibilidade à aplicação de estímulos mecânicos com filamentos de Von Frey na pata posterior, a fim de quantificar a ocorrência de hiperalgesia mecânica. Todos os animais foram acompanhados diariamente, por 90 dias, para verificar não somente se eles desenvolviam hiperalgesia mecânica secundária à administração, mas também se a quantidade de tratamentos influenciava na duração desta alteração sensorial.

Verificou-se que desde o dia subseqüente à primeira injeção de cisplatina os animais desenvolveram hiperalgesia mecânica nas patas traseiras. A sensibilidade mecânica do grupo que recebeu uma única dose de Cisplatina manteve significativamente aumentada por aproximadamente 40 dias. O mesmo aconteceu com os animais dos grupos que receberam 2 e 3 doses de Cisplatina (sendo uma dose a cada sete dias). Verificou-se, no entanto, que os grupos que receberam doses semanais do quimioterápico por 4 ou 5 semanas apresentavam um perfil bastante semelhante entre si, apresentando sinais de neuropatia periférica que perduraram por pelo menos 60 dias. Foi observado também que os animais voltavam a ter sensibilidade mecânica da pata semelhante aos que pertenciam ao grupo controle por volta do 90º dia. Desta forma, parece que a neuropatia periférica induzida por este protocolo de administração semanal de Cisplatina em camundongos é reversível, diferentemente de alguns relatos em humanos (Authier et al, 2003). Com base nestas observações, concluiu-se que poderiam ser realizados os demais experimentos somente utilizando 4 doses de quimioterápico (**Figura 1**).

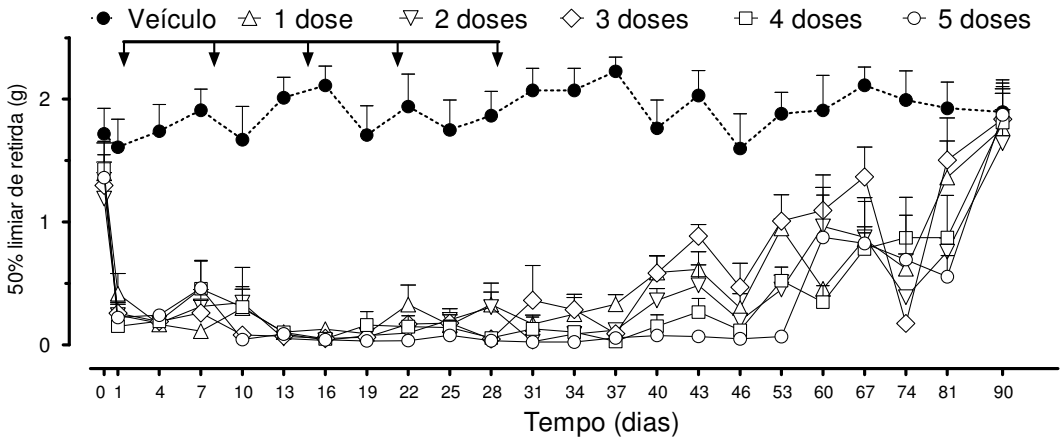

Figura 1. *Efeitos da aplicação semanal de cisplatina (3mg/kg, i.p.) durante 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. Os dados representam o decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica da pata traseira. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (em g, calculado pelo método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais. Todos os grupos de animais tratados com cisplatina apresentaram dados de p<0,05 do primeiro pelo menos até o 46º dia de experimento quando comparados ao grupo controle através de ANOVA de medidas repetidas seguido de teste pos-hoc de Bonferroni.*

Frente a estes dados, e com base em alguns trabalhos na literatura que sugerem que a Cisplatina pode também comprometer o funcionamento de nervos cranianos (Newton et al., 1989), optou-se por verificar se este mesmo regime de tratamento poderia causar neuropatia facial nos animais. Surpreendentemente, constatou-se que os animais também desenvolviam um aumento de sensibilidade mecânica craniofacial, na área de inervação do nervo trigêmeo. No entanto, este aumento de sensibilidade dolorosa era de desenvolvimento bem mais lento, atingindo seu ápice por volta de 15 dias após a administração da primeira dose de Cisplatina **(Figura 2).** Ainda de forma diferente do que foi observado na hiperalgesia mecânica na pata dos animais, na face, mesmo os animais que receberam somente uma ou duas doses de quimioterápico continuaram respondendo progressivamente aos estímulos até a segunda semana, quando o comportamento nociceptivo atingiu seu ápice para logo em seguida começar e decrescer. Outra diferença interessante quando comparamos os dados de pata e face é que os animais que receberam 4 ou 5 doses de cisplatina não manifestaram recuperação total do quadro nociceptivo para níveis controle, mesmo após 90 dias de observação. Desta forma, pela primeira vez há o relato de um modelo de dor neuropática onde se pode observar, concomitantemente, neuropatia de nervos espinhais e cranianos.

Como já citado anteriormente, em humanos o quadro resultante desta alteração sensorial é de difícil tratamento, uma vez que responde pobremente a tratamentos clássicos como, por exemplo, opióides e fármacos anti-inflamatórios.

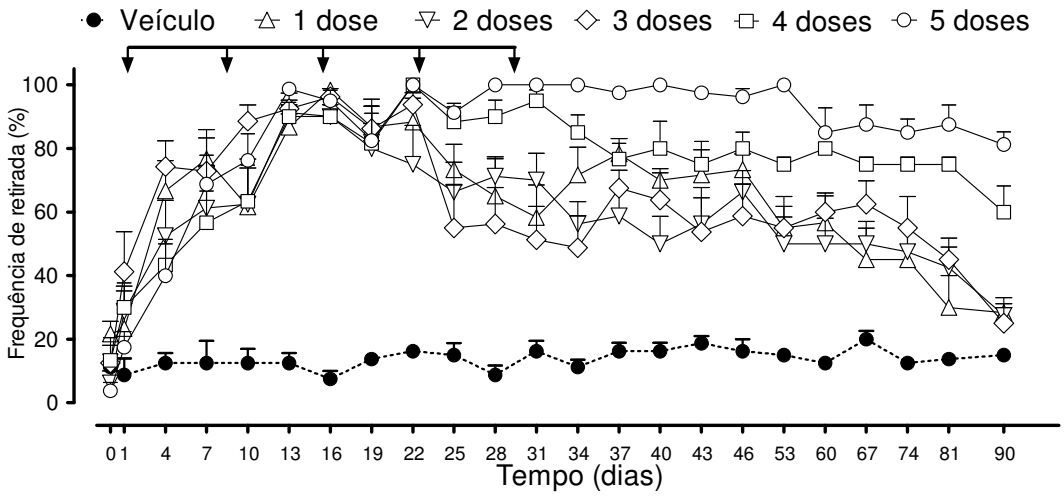

Figura 2. *Efeitos da aplicação semanal de cisplatina (3mg/kg, i.p.) durante 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. Os dados representam o desenvolvimento da Hiperalgesia mecânica facial. Os dados representam em a frequência de retirada em resposta a dez aplicações consecutivas de filamento de von Frey (0,04 g) na testa dos animais. Cada valor representa a média ± E.PM. de 5-6 animais. Todos os grupos de animais tratados com cisplatina apresentaram dados de p<0,05 do primeiro pelo menos até o 34º dia de experimento quando comparados ao grupo controle através de ANOVA de medidas repetidas seguido de teste pos-hoc de Bonferroni.*

4.2. Efeitos anti-hiperalgésicos de fármacos de referência

A morfina é o protótipo mais conhecido dos analgésicos opióides, uma classe de fármacos que desenvolvem sua ação principalmente por ativarem receptores celulares próprios (receptores opióides) acoplados à proteína G, que são subdivididos nos tipos μ, κ e δ. No entanto, a morfina apresenta um tempo de meia-vida curto, sendo utilizada principalmente para o tratamento da dor aguda. Por este motivo, formulações que aumentem seu tempo de permanência no organismo têm sido desenvolvidas para a utilização da morfina em casos de dor crônica (Balch & Trescot, 2010).

Por outro lado, diversos estudos sobre a dor neuropática, realizados em modelos animais, fornecem evidências relacionadas aos efeitos antialodínicos da gabapentina, fármaco originalmente desenvolvido para o tratamento da epilepsia (Backonja & Glanzman, 2003; McLean, 1999; Fink et al., 2000; van Hooft et al., 2002). Diversos estudos sugerem que esses efeitos possam estar relacionados a

alterações no fluxo de Ca^{2+}, resultando em mudanças na liberação de neurotransmissores ou na excitabilidade neuronal (Fink et al., 2000; van Hooft et al., 2002). Estudos recentes têm demonstrado que a gabapentina vem sendo amplamente utilizada no tratamento da dor neuropática, uma vez que este fármaco é bem tolerado pelos pacientes e apresenta poucas interações medicamentosas (O'Connor & Dworkin, 2009). Contudo, a dosagem específica para este tipo de tratamento ainda não foi estabelecida (Kusunose et al., 2010).

As administrações agudas de gabapentina em camundongos ao longo das 4 semanas de tratamento com a cisplatina resultaram em efeitos anti- hiperalgésicos diferentes. Ambos os fármacos conseguiram diminuir significativamente a hiperalgesia na primeira semana. Contudo, nas semanas seguintes (segunda e quarta semanas), apenas a gabapentina conseguiu manter o seu efeito anti-hiperalgésico tanto na face quanto na pata (**Figura 3** e **Figura 4**).

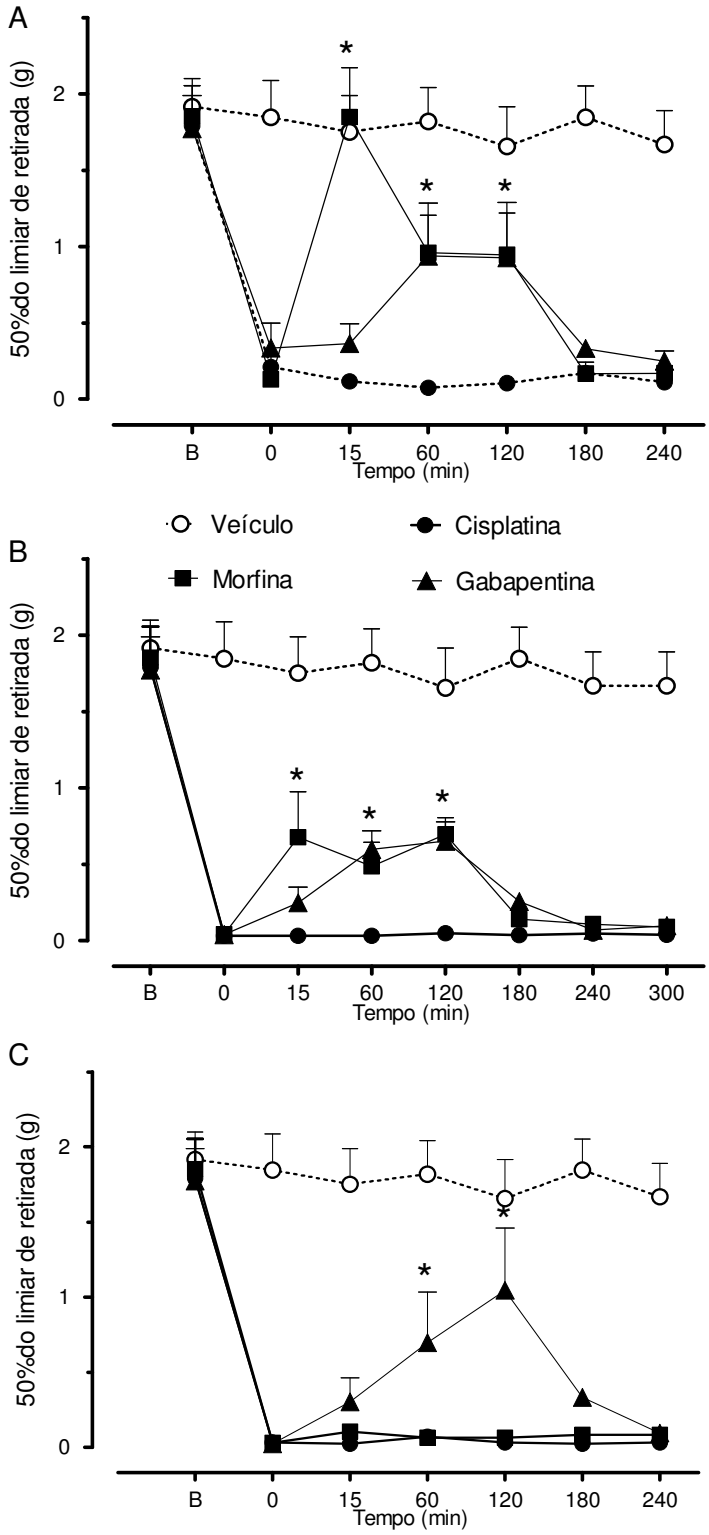

Figura 3. *Efeitos da administração de gabapentina (10 mg/kg, s.c.) ou morfina (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica da pata, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) após o início do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (em g) calculado no método de up-down, em cada tempo avaliado. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

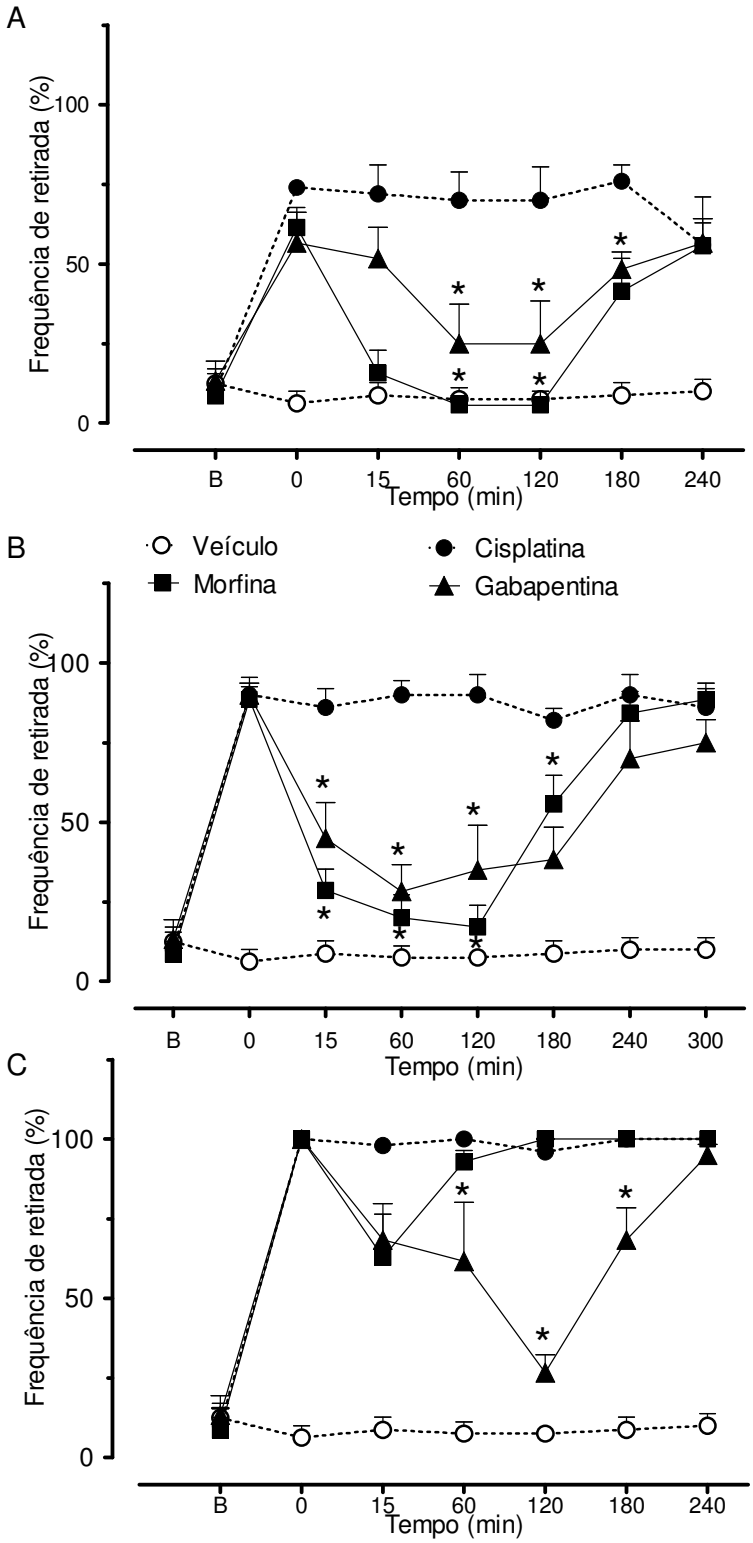

Figura 4. *Efeitos da administração de gabapentina (10 mg/kg, s.c.) e morfina (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica da face, nos dias 7(A), 14(B) e 28 (C) após o início do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam a frequência de respostas a 10 aplicações à face consecutivas por cada tempo avaliado. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

Os glicocorticóides (GC) apresentam potentes efeitos anti-inflamatórios, uma vez que inibem tanto a transcrição gênica, como a síntese, de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios. Além disso, estes fármacos podem aumentar a expressão e os níveis de diversos mediadores e algumas citocinas anti-inflamatórias (De Iudicibus et al., 2011). No entanto, este tipo de fármaco necessita ser utilizado com cautela, visto que possui inúmeros efeitos colaterais (Ventura et al., 2003). Além disso, os glicocorticóides funcionam bem para o controle de dores inflamatórias, mas são pouco ou nada efetivos no controle da dor neuropática (Birch & Bhattacharya, 2010).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) inibem a resposta inflamatória, a febre, a agregação plaquetária e a dor de origem inflamatória. Este efeito analgésico ocorre basicamente pela inibição das enzimas ciclooxigenases-1 e -2 (COX-1 e COX-2). Apesar de serem bastante utilizados para pacientes com dores crônicas de origem inflamatória, não se mostram efetivos no tratamento de dores neuropáticas (Mitchell & Warner, 1999; Ferreira, 2002; Rao & Knaus, 2008).

Dentre os anti-inflamatórios utilizados, a dexametasona foi o que se mostrou menos eficaz para aliviar a hiperalgesia mecânica, apresentando somente um discreto efeito na hiperalgesia da pata dos animais na segunda semana (**Figura 5**). Indometacina e Celecoxibe demonstraram um efeito anti-hiperalgésico na primeira e segunda semanas na face e apenas na primeira semana na pata. A indometacina pareceu ser mais eficaz na primeira semana, enquanto o celocoxibe mostrou-se mais eficiente na segunda semana **(Figura 6)**.

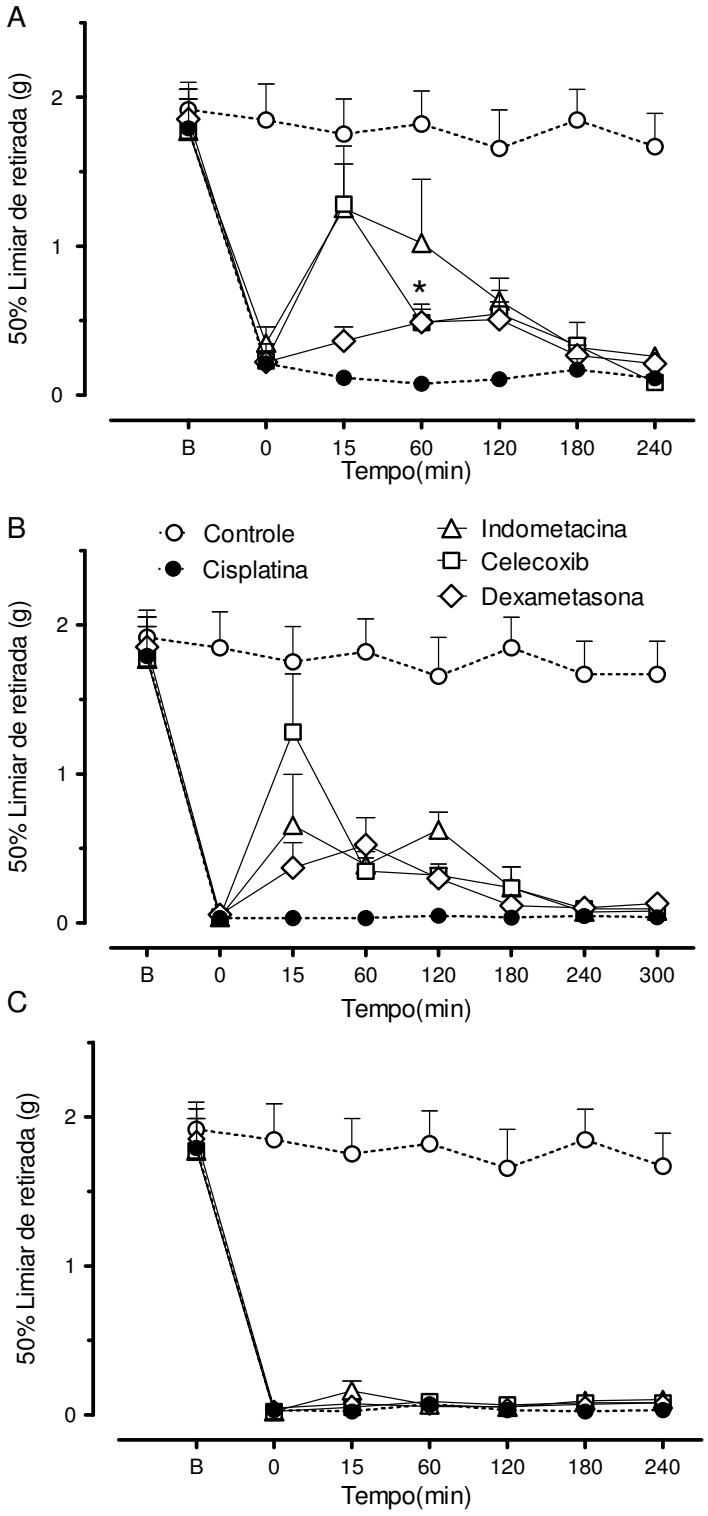

Figura 5. *Efeitos da administração de indometacina (1 mg/kg, i.p.), celecoxibe (30 mg/kg, i.p.) ou dexametasona (2 mg/kg, s.c.) na hiperalgesia mecânica aferida na pata posterior direita, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo*

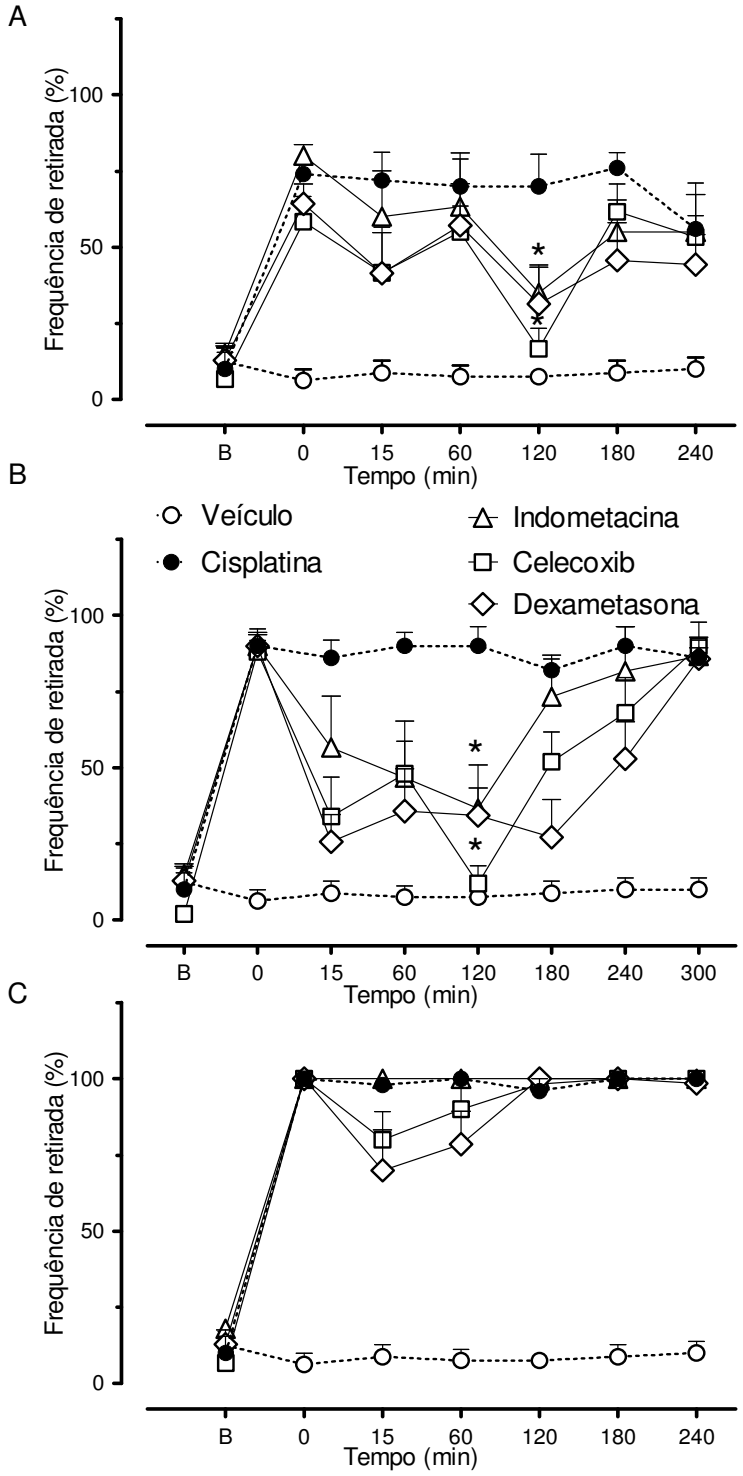

Figura 6. *Efeitos da administração de indometacina (1 mg/kg, i.p.), celecoxibe (30 mg/kg, i.p.) e dexametasona (2 mg/kg, s.c.), nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica aferida na face após o início do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam a frequência média de retirada da face após 10 estímulos com o filamento de Von Frey de 0.04g. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

4.3. Influencia do tratamento neonatal com capsaicina na hiperalgesia induzida por cisplatina

Além disso, como já comentado anteriormente, o tratamento com cisplatina afeta principalmente as fibras sensoriais mielinizadas de grande calibre (Hovestadt et al., 1992 - apud Authier et al., 2003). Sabe-se que este quadro é gerado por uma atrofia seguida de apoptose de células do gânglio da raiz dorsal, especialmente os neurônios mielinizados e as células de Schwann (Cavaletti et al., 1998; Authier et al., 2000). Para tentar corroborar estas evidencias anteriores, ratos neonatos receberam, 2 dias após o nascimento, uma injeção de capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou do veículo correspondente, com o propósito de promover a degeneração de fibras aferentes primárias do tipo C, positivas para TRPV1. Por volta do 21º dia pós-natal, estes animais passaram por uma sexagem para selecionar somente os machos para o experimento. Ao atingirem 2 meses, os animais foram submetidos a um teste para verificar a eficácia do tratamento com capsaicina em destruir parcialmente as fibras C. Para isso, os animais receberam 50 µl de uma solução de capsaicina 0,01% em um dos olhos e foi contabilizado o número de movimentos das patas anteriores em direção à pálpebra durante um minuto. Os camundongos que responderam com menos do que 15 movimentos palpebrais foram incluídos no estudo e começaram a receber Cisplatina (5 administrações semanais de 3 mg/kg, i.p.) ou veículo. Corroborando dados da literatura, não houve diferenças significativas na hiperalgesia mecânica avaliada na pata posterior (**Figura 7**) ou na face (**Figura 8**) entre os animais do grupo tratado com capsaicina neonatal e os do grupo que recebeu somente veículo neonatal.

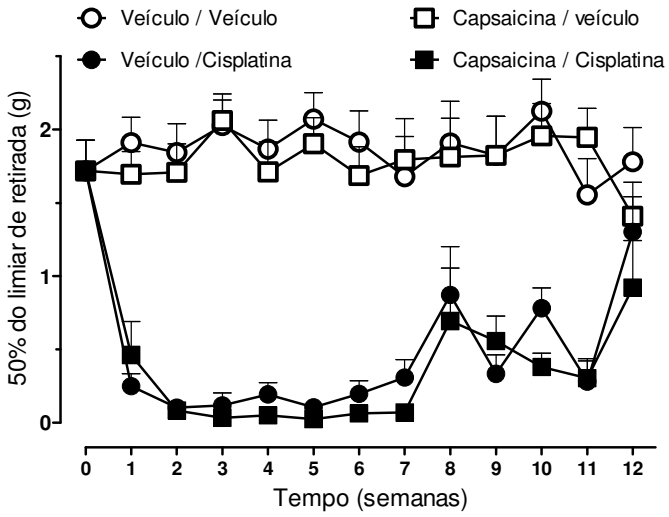

Figura 7. *Efeitos da administração de cisplatina em animais previamente tratados (no período neonatal) com capsaicina ou veículo na hiperalgesia mecânica na pata. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (em g) calculado no método de up-down nos períodos indicados após inicio do tratamento semanal com cisplatina por 5 semanas. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais.*

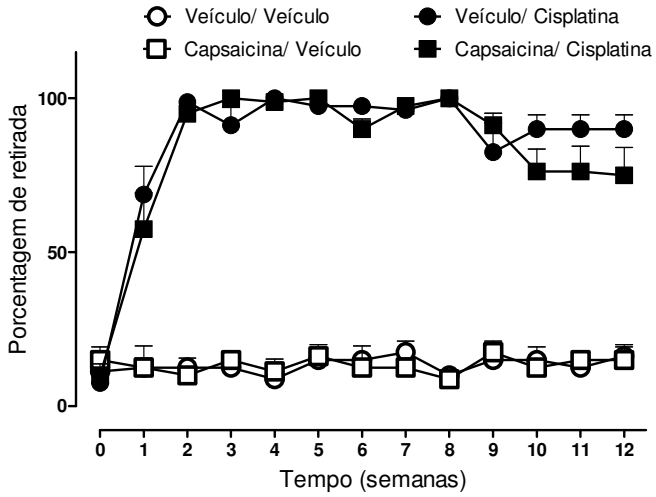

Figura 8*. Efeitos da administração de cisplatina em animais previamente tratados (no período neonatal) com capsaicina ou veículo na hiperalgesia mecânica na face. Os dados representam a frequência de respostas à aplicação na face de 10 estimulos mecânicos consecutivos por sessão. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais.*

4.4. Efeitos anti-hiperalgésicos de antagonistas de receptores ET_A e ET_B

A aplicação do antagonista peptidérgico dos receptores de endotelina do tipo A, BQ-123 (antagonista seletivo de receptores ET_A, **Figura 9**), diminuiu a hiperalgesia mecânica da pata, causada pelas aplicações de Cisplatina, apenas nas duas primeiras avaliações, mostrando-se inefetivo na diminuição da hiperalgesia na quarta semana do tratamento. O antagonista BQ-123 mostrou-se eficiente em reduzir a hiperalgesia na dose de 10 nmol/pata, mas não nas doses menores testadas (1 e 3 nmol/pata). Nas semanas seguintes, observou-se que estes antagonistas, em qualquer concentração, foram ineficazes em reduzir a hiperalgesia mecânica na pata dos animais (resultados não apresentados).

Quando administrado o antagonista peptidérgico para o receptor endotelinérgico tipo B (BQ-788, **Figura 10**) nas doses de 3, 10 e 30 nmol verificou-se que houve redução da hiperalgesia mecânica da pata somente na dose de 10 nmol e primeira semana após o início do tratamento com cisplatina, Nas semanas subsequentes o tratamento mostrou-se inefetivo em todas as doses.

Os mesmos antagonistas foram administrados também na nuca dos animais, para verificar se eles seriam efetivos em reverter o quadro nociceptivo hiperalgésico facial causado pelo tratamento com a cisplatina. Ambos os antagonistas foram eficazes em reverter transitoriamente a hiperalgesia mecânica na face dos camundongos tanto em 7, como em 14 e ainda em 28 dias após o inicio do tratamento com o quimioterápico. Neste sentido, a dose mais efetiva de BQ-123 (**Figura 11**) foi a de 30 nmol em todos os períodos de observação, enquanto que o BQ-788 (**Figura 12**) foi igualmente efetivo nas doses de 10 e 30 nmol por sítio em todos os períodos. Para verificar se um antagonista não peptídico administrado sistemicamente teria o mesmo tipo de efeito apresentado pelos antagonistas peptídicos administrados localmente, os animais foram tratados o antagonista seletivo do receptor ET_A, Atrasentan, nas doses de 3 e 10 mg/kg. Na face (**Figura 14**), a diminuição significativa da hiperalgesia mecânica ocorreu com a maior dose (10 mg/kg), na primeira e na segunda semana, não se obtendo nenhum efeito na quarta semana. Já na pata, o efeito foi observado com ambas as doses (3 e 10 mg/kg) apenas na primeira semana (**Figura 13**).

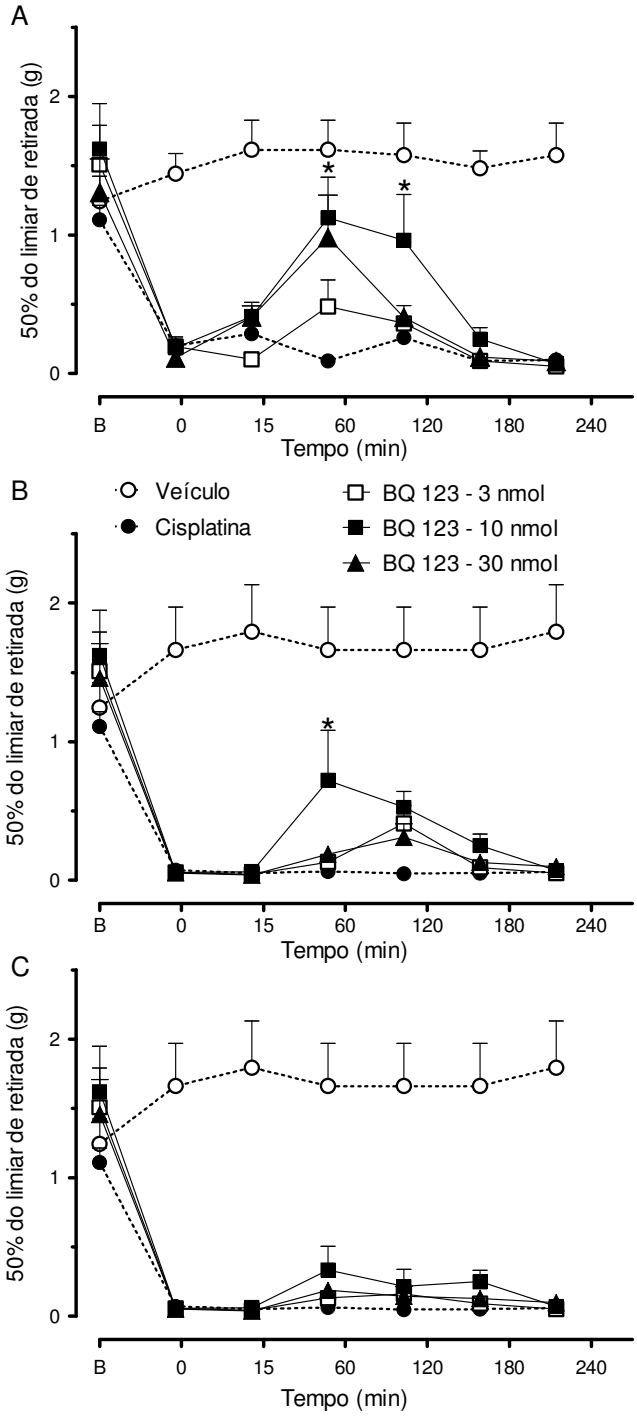

Figura 9. *Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_A (BQ-123), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da pata observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

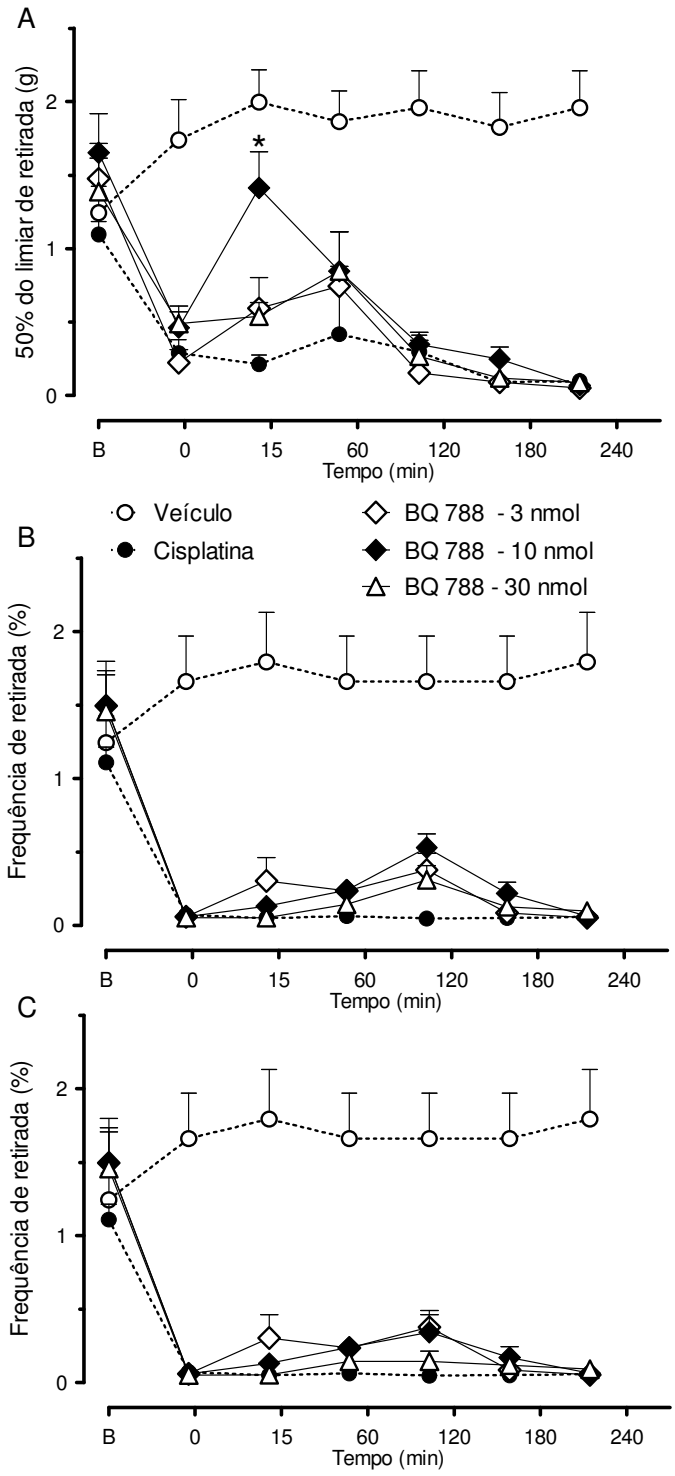

Figura 10. *Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_B (BQ-788), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da pata observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

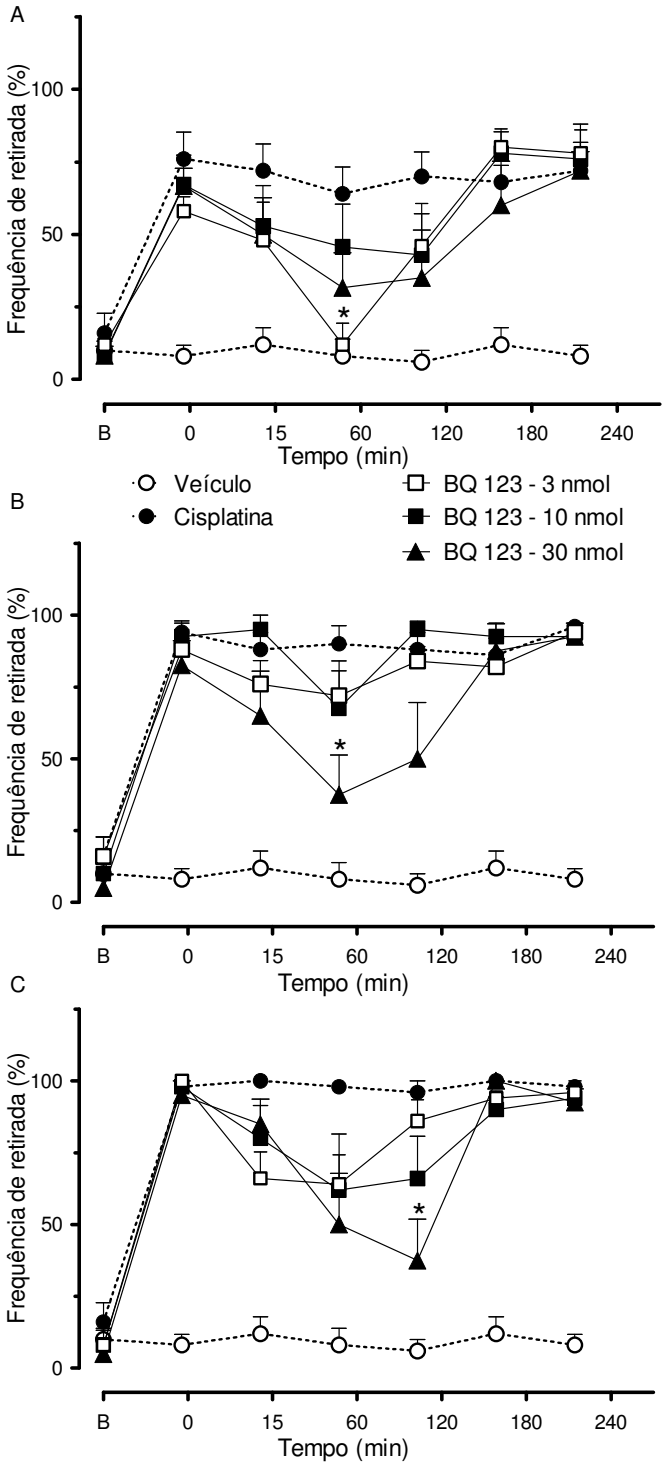

Figura 11. *Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_A (BQ-123), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da face observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

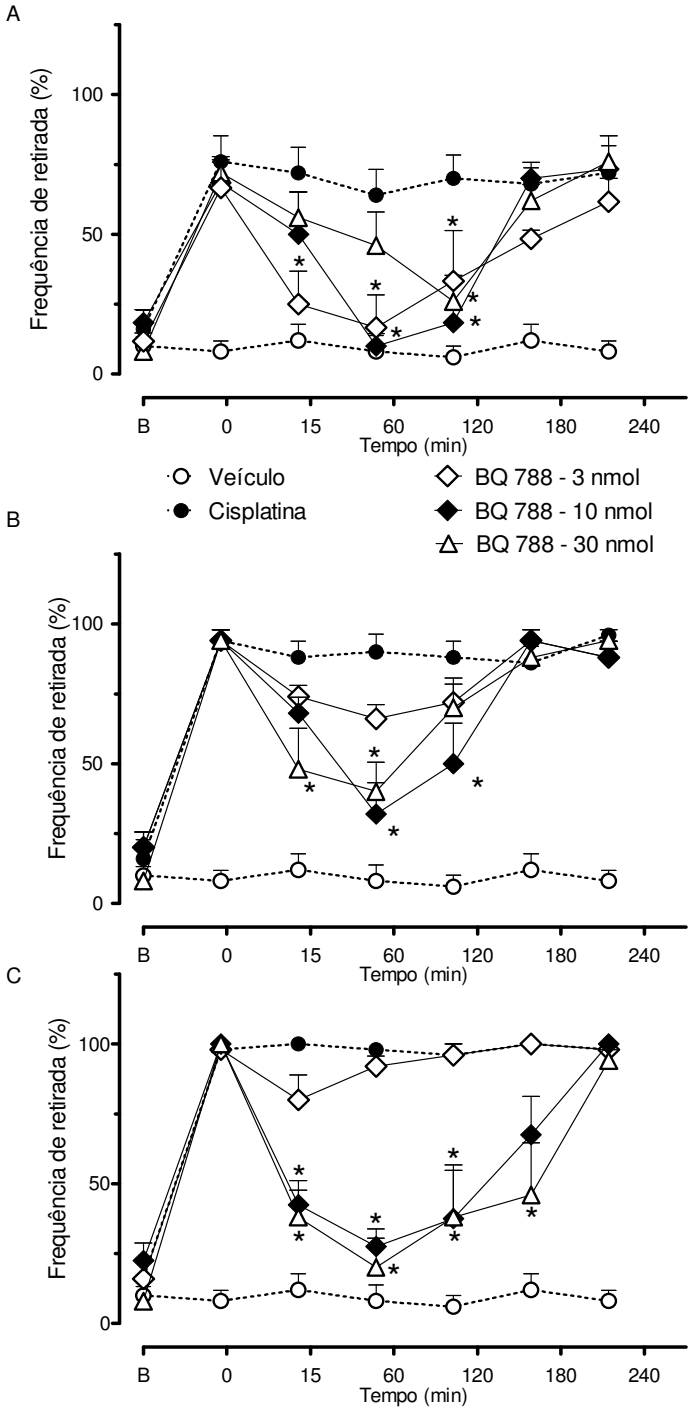

Figura 12. *Efeitos da administração local aguda do antagonista seletivo do receptor ET_B (BQ-788), nas concentrações de 3 nmol, 10 nmol e 30 nmol, na hiperalgesia mecânica da face observada nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) dias após o inicio do tratamento semanal com cisplatina. Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

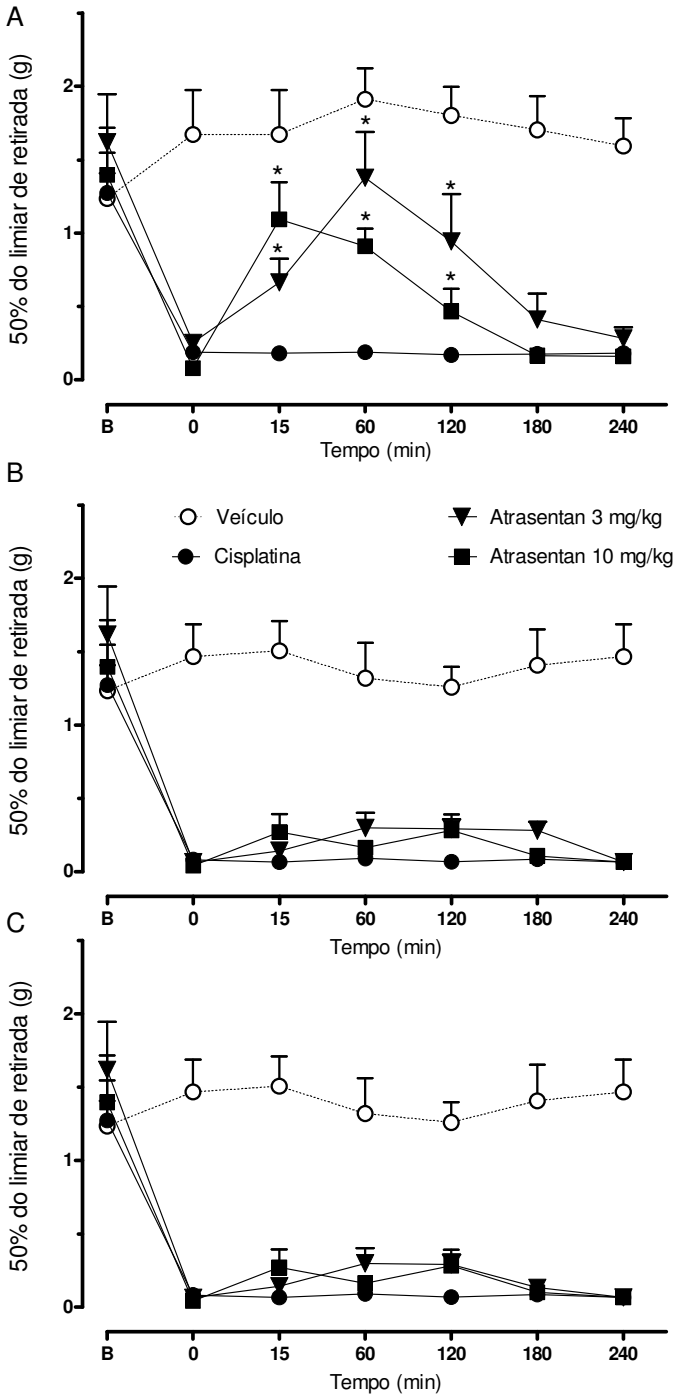

Figura 13. *Efeitos da administração do antagonista seletivo do receptor ET_A, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica da pata causada por repetidos tratamentos com cisplatina. . Os dados representam 50% do limiar de retirada da pata (g) calculado no método de up-down. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

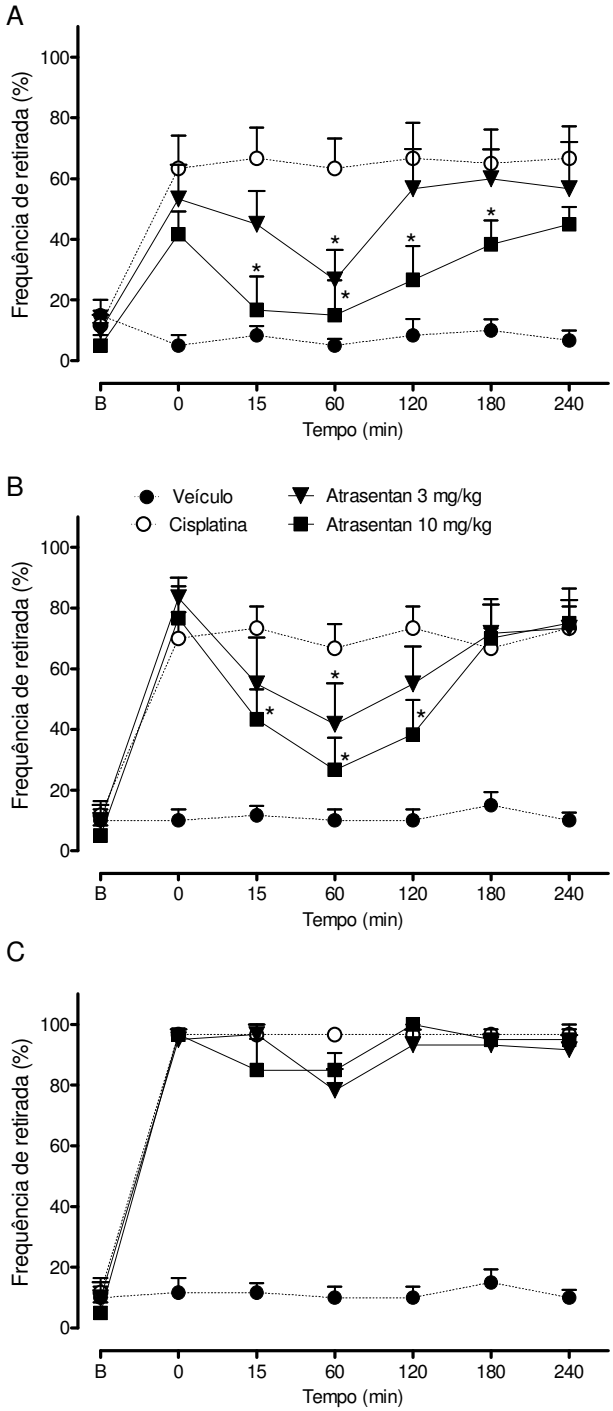

Figura 14. *Efeitos da administração do antagonista seletivo do receptor ET_A, nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C), na hiperalgesia mecânica facial causada por repetidos tratamentos com cisplatina. Os dados representam a frequência da resposta na face após 10 testes. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni em comparação com os respectivos animais tratados com veículo.*

4.5. Efeitos do tratamento com cisplatina sobre a expressão gênica e densidade de receptores ET_A e ET_B

Para verificar se houve interferência do tratamento com cisplatina na transcrição gênica de receptores de endotelina, foram realizados ensaios de RT-PCR quantitativo em amostras de gânglios trigeminais, medula e gânglios da raiz dorsal de animais tratados com cisplatina por 1, 2 e 4 semanas

(**Tabelas 2, 3 e 4)**. Os resultados obtidos demonstram que houve um aumento dos níveis de RNA mensageiro no gânglio trigeminal para receptores ET_A e ET_B após quatro semanas de tratamento com cisplatina.

Tabela 2. *Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos. Resultados obtidos a partir da técnica de RT-PCR para o material coletado 7 dias após o ínicio do tratamento com cisplatina. ND= não detectado. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais. Não foram detectadas diferenças com P<0,05 entre os grupos pelo teste t bicaudal de Student não pareado.*

Tecido	ET_A controle	ET_A cisplatina	ET_B controle	ET_B cisplatina	GAPDH controle	GAPDH cisplatina
Medula	ND	ND	ND	ND	0,80 ± 0,08	0,78 ± 0,06
Gânglio da Raiz Dorsal	ND	ND	ND	ND	0,84 ± 0,07	0,82 ± 0,12
Gânglio doTrigêmeo	ND	ND	ND	ND	0,72 ± 0,13	0,87 ± 0,08

Tabela 3. *Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos. Resultados obtidos a partir da técnica de RT-PCR para o material coletado 14 dias após o ínicio do tratamento com cisplatina ND= não detectado. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de teste T não pareado, bicaudal.*

Tecido	**ET_A controle**	**ET_A cisplatina**	**ET_B controle**	**ET_B cisplatina**	**GAPDH controle**	**GAPDH cisplatina**
Medula	ND	ND	ND	ND	0,76 ± 0,1	0,81 ± 0,09
Gânglio da Raiz Dorsal	ND	ND	ND	ND	0,69 ± 0,14	0,88 ± 0,1
Gânglio doTrigêmeo	0,22 ± 0,06	0,55 ± 0,07 *	0,33 ± 0,08	0,66 ± 0,09 *	0,83 ± 0,09	0,85 ± 0,14

Tabela 4. *Níveis de RNAm para ET_A e ET_B analisados a partir de amostras de medula, gânglio da raiz dorsal e gânglio trigeminal de camundongos. Resultados obtidos a partir da técnica de RT-PCR para o material coletado 28 dias após o ínicio do tratamento com cisplatina ND= não detectado. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 5-6 animais, onde * P<0,05, na realização de teste T não pareado, bicaudal.*

Tecido	**ET_A controle**	**ET_A cisplatina**	**ET_B controle**	**ET_B cisplatina**	**GAPDH controle**	**GAPDH cisplatina**
Medula	ND	ND	ND	ND	0,90 ± 0,12	0,79 ± 0,08
Gânglio da Raiz Dorsal	ND	ND	ND	ND	0,76 ± 0,14	0,88 ± 0,09
Gânglio doTrigêmeo	0,19 ± 0,20	0,59 ± 0,08 *	0,45 ± 0,15	0,71 ± 0,11 *	0,86 ± 0,06	0,79 ± 0,13

Com a intenção de verificar se este aumento de RNA mensageiro para receptores ET_A e ET_B também se traduzia em aumento da expressão protéica, foi realizado o ensaio de Western Blot com amostras de medula espinhal lombar **(Figura 15)** e de gânglios trigeminais **(Figura 16)** coletados 1, 2 e 4 semanas após o início do tratamento com cisplatina. Foi verificado um aumento da expressão de ET_B no gânglio trigeminal na quarta semana de tratamento corroborando, em parte, com os achados do experimento anterior**.**

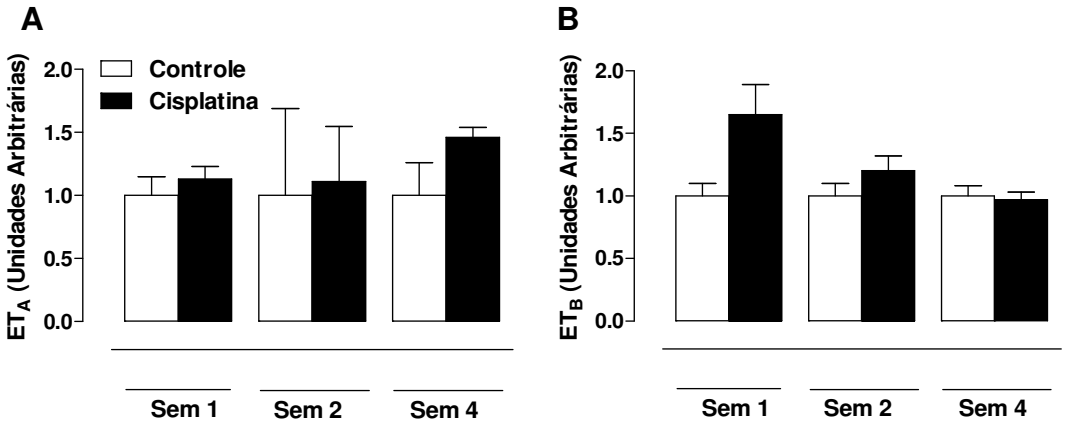

Figura 15. *Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A e ET_B em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos. Dados obtidos através da técnica de Western Blot para Imunodetecção de receptores ET_A (A) e ET_B (B) em amostras coletadas 1, 2 e 4 semanas após o início do tratamento com Cisplatina. Cada valor representa a média ± E.P.M. 5-6 animais. Não foram detectadas diferenças com $P<0,05$ entre os grupos quando se fez analise utilizando teste t bicaudal não-pareado de Student.*

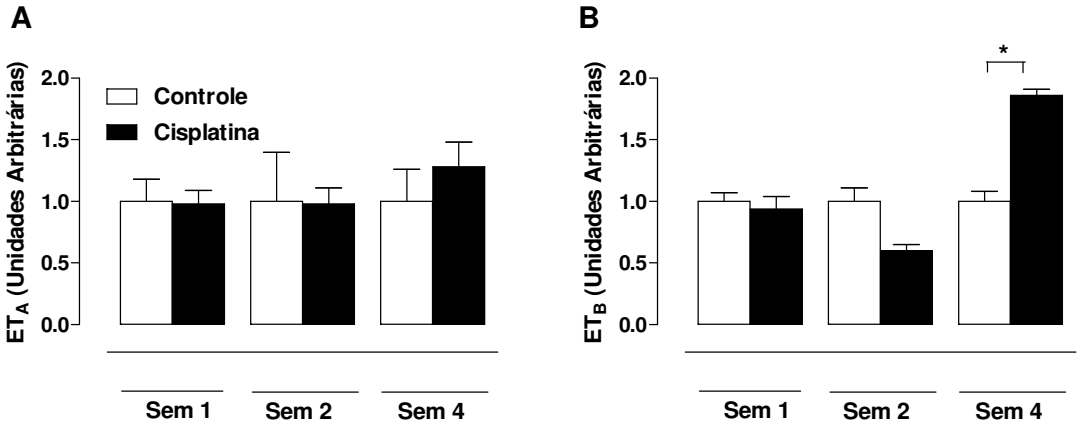

Figura 16. *Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A e ET_B em gânglios trigeminais de camundongos. Dados obtidos através da técnica de Western Blot para Imunodetecção de receptores ET_A (A) e ET_B (B) em amostras coletadas 1, 2 e 4 semanas após o início do tratamento com Cisplatina. Cada valor representa a média ± E.P.M. 5-6 animais, sendo que o * indica P<0,05 entre os grupos quando se fez analise utilizando teste t bicaudal não-pareado de Student.*

Como os gânglios da raiz dorsal dos camundongos possuem pouquíssima quantidade de proteína, isto inviabilizou a realização de ensaios de imunodetecção em amostras desse tipo de tecido. Desta forma, foram feitos ensaios de imunofluorescência nestas estruturas, para verificar a expressão e localização de receptores ET_A (**Figuras 17 e 18**) e ET_B (**Figuras 19 e 20**).

Como podemos verificar nas figuras 17 e 18, houve aumentos na expressão de receptores endotelinérgicos ET_A aos 7, 14 e 28 dias após o início do tratamento com cisplatina.

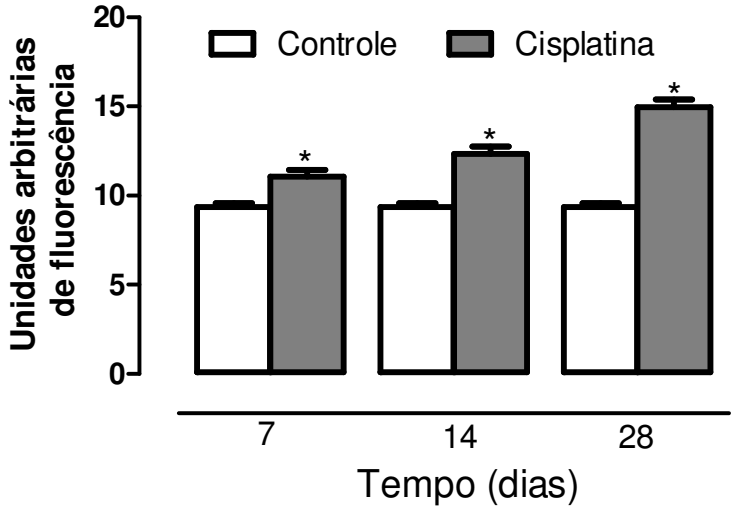

Figura 17. *Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores* ET_A *em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos. Dados obtidos através da técnica de Imunofluorescência, com quantificação realizada através do emprego do programa Image J e expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (Intensidade-Densidade/área). Cada barra corresponde a uma média ± E.P.M. de 6 a 8 cortes, onde * p<0.05na realização de teste t não pareado e bicaudal de Student, em comparação com o valor correspondente do controle tratado com veículo.*

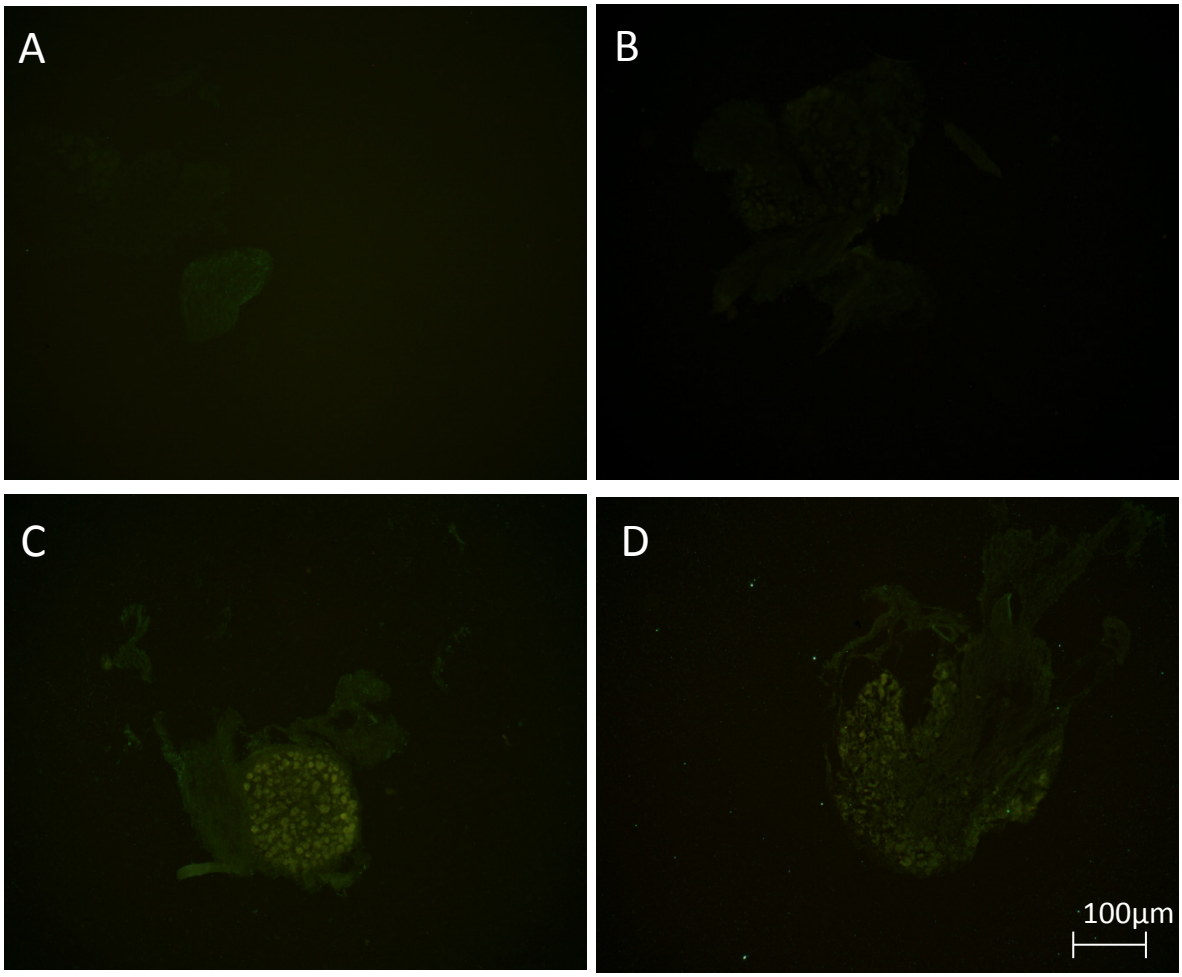

***Figura 18**. Imagens representativas da influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_A em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos .Dados obtidos através da técnica de Imunofluorescência para o receptor ET_A, onde A é um gânglio da raiz dorsal de um animal que não recebeu tratamento com cisplatina, e as demais figuras ilustram resultados obtidos em amostras colhidas 7 (B), 14 (C) e 28 (D) dias após o início do tratamento com Cisplatina. Em aumento de 10 x em microscópio de fluorescência.*

Já a expressão de receptores ET_B em amostras de gânglio de raiz dorsal lombar apresentou-se reduzida aos 7 dias, mas aumentada aos 14 e 28 dias após o inicio do tratamento com cisplatina (**Figuras 19 e 20**).

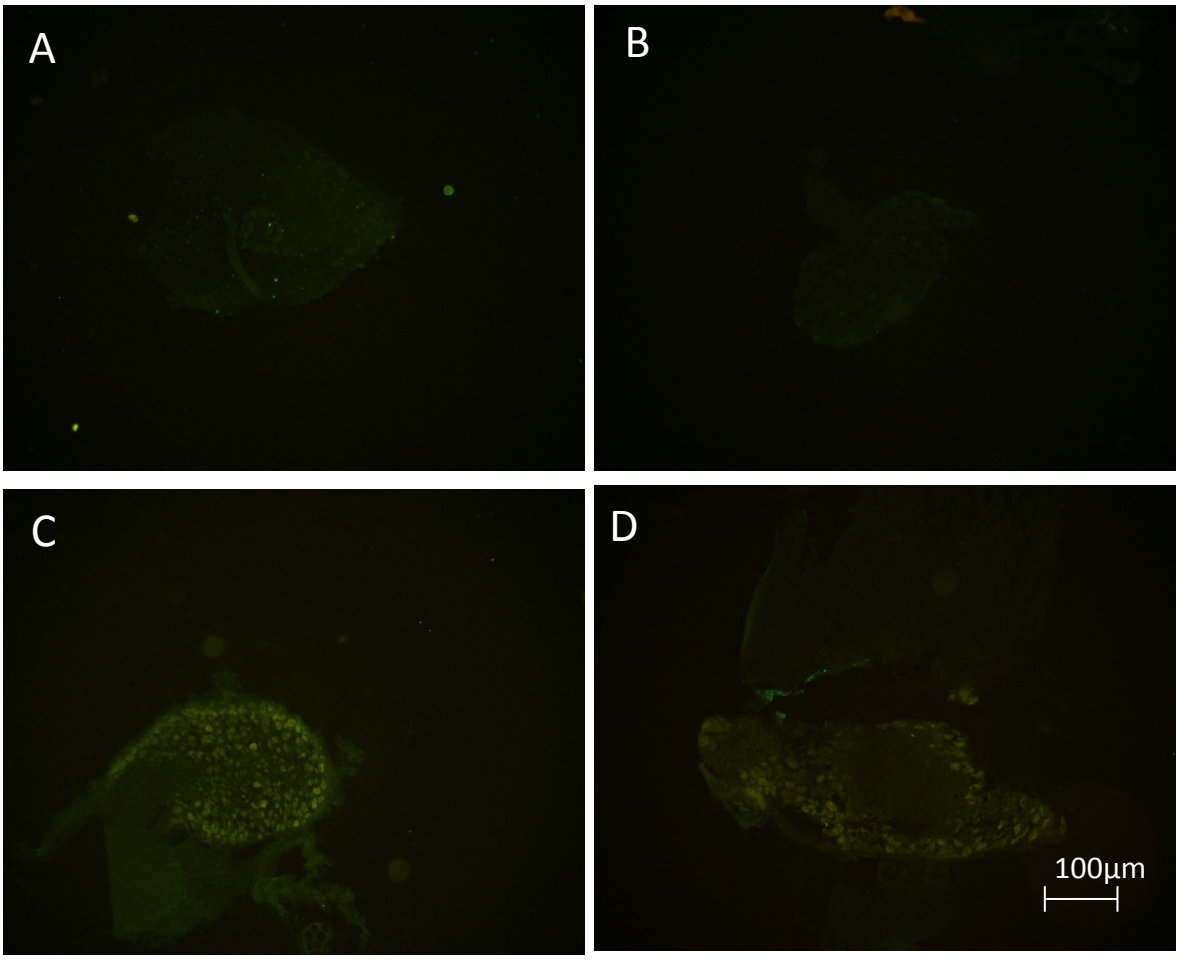

Figura 19. *Imagens representativas ilustrando a influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores ET_B em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos. Dados obtidos através da técnica de Imunofluorescência para o receptor ET_B, onde A é um gânglio da raiz dorsal de um animal que não recebeu tratamento com cisplatina, e as demais figuras ilustram resultados em amostras colhidas 7 (B), 14 (C) e 28 (D) dias após o início do tratamento com cisplatina. Em aumento de 10 x em microscópio de fluorescência.*

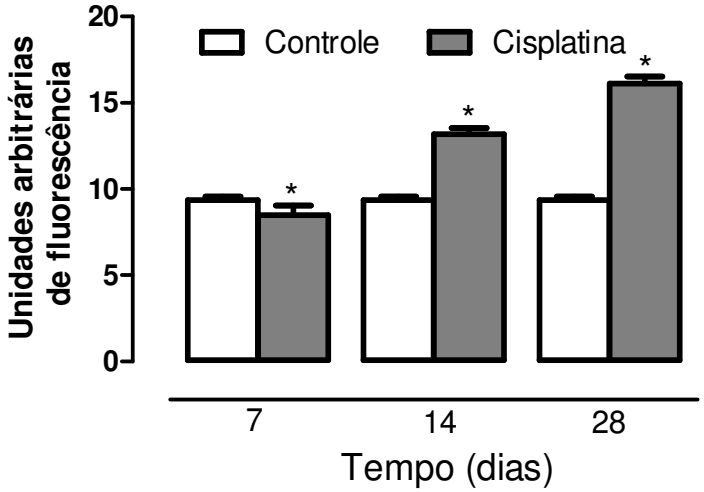

Figura 20. *Influência do tratamento repetido semanal com cisplatina na expressão de receptores* ET_B *em gânglios de raízes dorsais lombares de camundongos. Dados obtidos através da técnica de imunofluorescência para o receptor* ET_B*, com quantificação realizada através do emprego do programa Image J e expressa em unidades arbitrárias de fluorescência (Intensidade-Densidade/área). Cada barra corresponde a uma média ± E.P.M. de 6 a 8 cortes, onde * p<0.05 na realização de teste t não pareado e bicaudal de Student, quando comparado ao valor correspondente do grupo controle tratado com veículo.*

5. DISCUSSÃO

Estima-se que aproximadamente 8% da população mundial experimenta alguma forma de dor neuropática durante a vida (Torrance et al., 2006, Johannes et al., 2010). Se forem considerados dados de pacientes atendidos em clínicas para tratamento da dor, aproximadamente 27% apresentam dor neuropática e se forem levados em conta somente os pacientes em tratamento contra o câncer verifica-se que 36% apresentam dor neuropática de diversas etiologias (Johannes et al., 2010).

O uso de agentes quimioterápicos no tratamento do câncer é frequentemente associado à presença de neuropatia periférica. Os sintomas da dor neuropática associados com cada droga quimioterápica variam e podem responder diferentemente a tratamentos farmacológicos (Flatters e Bennett, 2004). Desta forma, mecanismos diferentes podem mediar o desenvolvimento de diferentes tipos de dor neuropática para cada agente antineoplásico (para revisão ver Cata et al., 2006) e o tratamento também pode diferir. Especificamente, a neurotoxidade induzida por drogas derivadas da platina é caraterizada por neuropatia sensorial dolorosa dose-dependente que apresenta sintomas nas extremidades distais dos pacientes (Quasthoff e Hartung, 2002).

A cisplatina vem sendo utilizada como agente quimioterápico desde 1970, no entanto seu principal efeito limitante, que leva inclusive a interrupção do tratamento é o aparecimento de neuropatia periférica.

A terapêutica empregada atualmente no tratamento da dor resultante da quimioterapia por cisplatina é limitada e pouco satisfatória, principalmente porque a etiologia deste efeito colateral é complexa e não responde a medicação analgésica usual (Authier et al., 2003). No protocolo experimental utilizado em nosso trabalho, as aplicações semanais de cisplatina, por quatro semanas consecutivas, causaram neuropatia confirmada pela avaliação da hiperalgesia mecânica nos camundongos de forma semelhante ao proposto por Authier e colaboradores (2003) e também por Apfel e colaboradores (1992). No entanto, o achado mais importante, foi sem dúvida, a presença de neuropatia também no território inervado pelo Nervo Trigêmeo, uma vez que este é o primeiro trabalho a demonstrar tal acometimento em um modelo animal. Fato semelhante já havia sido relatado em um estudo que usava cisplatina

intra-arterial, na carótida, para tratar tumores dentro da caixa craniana em humanos alguns pacientes relataram neuralgia do trigêmeo subsequente aos tratamentos (Newton et al., 1989). Em 2000, Sugimoto e colaboradores verificaram que a cisplatina causava morte neuroglial em ratos recém-nascidos, sugerindo já que outros autores que sugeriam que este quadro nociceptivo era meramente periférico em virtude da proteção exercida pela barreira hemato encefálica aos gânglios cranianos poderiam estar equivocados (Cavaletti et al., 1998). Além disso, um estudo demonstrou uma dessincronização na função de duas proteínas de reparo do DNA (XPA e XPC) em neurônios do gânglio ratos submetidos ao tratamento com cisplatina (Guthrie et al.,2008).

Já em 1992, Hovestadt e colaboradores verificaram que esse quadro álgico deve-se em grande parte ao acometimento das fibras sensoriais de médio e grande calibre e não ao comprometimento de fibras C. Outro estudo eletrofisiológico mais recente também demonstrou também que em ratos o tratamento com cisplatina altera a condução de fibras de grande calibre (Zhang e Tuckett, 2008). Confirmando estes dados verificamos que os animais tratados com capsaicina neonatal para dessensibilizar fibras nociceptivas tipo C sensíveis a capsaicina não tiveram um comportamento diferente daqueles que receberam solução salina ao nascer. Demonstrando mais uma vez que as fibras mais afetadas neste tipo de neuropatia parecem ser as fibras de maior calibre.

Como previamente citado, o quadro álgico resultante é de difícil tratamento farmacológico, com base nisso foram feitos experimentos para verificar a responsividade do modelo utilizado a diferentes tipos de tratamentos utilizados na clínica para dores crônicas. Verificou-se que fármacos anti-inflamatórios de forma geral (dexametasona, celecoxibe e indometacina) apresentaram efeito em 7 e 14 dias, o que não aconteceu em 28 dias. Isso sugere que talvez o modelo utilizado apresente uma primeira fase, de caráter inflamatório, seguida por uma fase mais tardia, de caráter neuropático. Corroborando esta ideia uma recente revisão elaborada por Austin e Moalem-Taylor (2010) demonstra que diversas células inflamatórias estão envolvidas nas diferentes fases da gênese e manutenção de diferentes etiologias de dor neuropática.

A morfina teve resultados bastante semelhantes aos dos anti-inflamatórios, uma vez que apresentou efeito somente na fase inicial, de forma muito semelhante ao que ocorre na clínica. Apesar de os guias de conduta terapêutica avaliarem os opióides como drogas de segunda escolha para o tratamento da dor neuropática (O'Connor e Dworkin, 2009) alguns outros estudos vêm demonstrando alternativas para aumentar a eficácia do uso destas drogas para o tratamento de neuropatias. Um destes estudos sugere a co-administração de morfina com um inibidor da glicoproteína P, conseguindo efeitos mais satisfatórios no controle da nocicepção em ratos em um modelo de neuropatia induzida por cisplatina (Balayssac et al., 2009). Outro estudo, este um humanos, demonstra que quando injetada de forma intratecal em humanos a morfina é efetiva em controlar a dor neuropática decorrente da mielite transversa (Wu et al., 2013).

Recentes guias de conduta preveem como drogas de primeira escolha para o tratamento antiepiléticos e antidepressivos tricíclicos (O'Connor e Dworkin, 2009). Desta forma, conforme o esperado, a gabapentina, que inicialmente não demonstrou eficácia, foi a única droga de referência capaz de atenuar a hiperalgesia dos animais 28 dias após o início do tratamento com cisplatina. Reforçando a hipótese que o modelo utilizado tenha duas fases distintas, uma inflamatória e outra, mais tardia, neuropática.

Um problema recentemente aventado para o uso de antiepiléticos no tratamento de dores crônicas é o aumento da taxa de suicídios em pacientes que utilizam este tipo de terapia (Pereira et al., 2013). Desta forma, novas terapias precisam ser buscadas de forma oferecer um tratamento efetivo e seguro para a população que desenvolve este tipo de condição.

Estudos demonstram que diversos sistemas estão implicados na mediação das alterações sensoriais em modelos de dor neuropática; ademais, alguns trabalhos do nosso grupo evidenciaram uma importante participação dos sistemas de endotelinas neste tipo de doença (Chichorro et al., 2006; Werner et al., 2007). Dessa forma, uma vez que tenha sido possível padronizar essa neuropatia após tratamento prolongado com cisplatina, para tentar atenuar essa resposta nociceptiva, objetivou-se investigar a possível participação dos receptores para endotelinas ET_A e ET_B, além da possível participação de mediadores pró-

inflamatórios neste processo. Recentemente diversas revisões sobre manejo da dor neuropática colocam o sistema endotelinérgico como um alvo de grande importância para o manejo da dor neuropática e consequentemente para o desenvolvimento de novos fármacos (Murphy, O'Callaghan, Gaine, 2010; Jaggi e Singh, 2011; Hoyer e Bartfa, 2012).

Os antagonistas dos receptores ET_A (BQ-123) e ET_B (BQ-788), também diminuíram significativamente a resposta hiperalgésica da pata dos animais apenas na primeira semana de tratamento. Contudo, quando administrados na nuca para verificarmos sua ação frente à neuropatia facial causada por cisplatina verificamos que ambos eram efetivos em atenuar ou reverter o quadro hiperalgésico facial. Sugerindo que também o sistema endotelinérgico está relacionado à neuropatia facial causada por doses repetidas de cisplatina em camundongos, mas não na neuropatia periférica causada por este quimioterápico.

Quanto ao antagonista seletivo do receptor ET_A (Atrasentan), o mesmo diminuiu significativamente a hiperalgesia na face dos camundongos nas duas primeiras semanas, sendo ineficaz na quarta semana (vigésimo oitavo dia), enquanto que, na pata traseira dos animais, esta redução ocorreu apenas na primeira semana. Isso indica que nas doses avaliadas o antagonista não peptídico dado de forma sistêmica não foi capaz de combater a fase neuropática do modelo utilizado, mas tão somente a fase inflamatória. Como citado anteriormente, estão sendo conduzidos estudos clínicos e pré clínicos para a utilização do Atrasentan como forma de terapia combinada com quimioterápicos tendo em vista que o antagonismo do receptor ET_A parece não só ter efeito anti-hiperalgésico como aqui demonstrado mas também tem efeito na diminuição do crescimento tumoral e da angiogênese que acompanha este quadro (Lalich et al., 2007; Russo et al., 2010).

Houve aumento dos níveis de RNAm tanto para ET_A quanto para ET_B nos gânglios trigeminais, duas e quatro semanas após o início do tratamento com cisplatina. Este fenômeno não foi observado em amostras de medula espinhal lombar obtidas em qualquer um dos tempos após inicio do tratamento com cisplatina. Isto pode estar relacionado ao achado farmacológico previamente citado de que os antagonistas endotelinérgicos obtiveram mais sucesso na reversão da hiperalgesia mecânica da face que na hiperalgesia mecânica na pata dos

camundongos tratados com cisplatina. Os únicos outros estudos existentes que quantificaram RNAm em modelos de neuropatia induzida por cisplatina evidenciaram o aumento de RNAm da enzima hidrolizadora de endocanabinóides (FAAH) na medula espinal mas não no gânglio da raiz dorsal de ratos (Guindon et al., 2013) e também o aumento de RNAm de receptores vanilóides no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos ao tratamento com cisplatina (Ta et al., 2010). Não existem na literatura estudos que demonstrem uma correlação de RNAm de receptores endotelinérgicos com algum modelo de neuropatia.

Verificou-se aumento do sinal de imunodetecção para receptores ET_B nos gânglios trigeminais quatro semanas após o início do tratamento com cisplatina. Evidenciando aumento destes receptores na membrana das células do tecido em questão. No entanto não foram encontradas alterações para o receptor ET_A no gânglio trigeminal em nenhum tempo avaliado. Não houve também nenhuma diferença significativa na expressão de receptores endotelinérgicos na medula dos animais tratados com cisplatina em nenhum dos tempos avaliados. Na literatura pode-se observar que num modelo de neuropatia diabética em ratos houve uma diminuição na expressão de ET_B no ciático dos animais, sem haver nenhuma diferença no gânglio da raiz dorsal. Neste mesmo estudo, quando avaliado o receptor ETA não foi encontrada nenhuma diferença significativa, nem no ciático e nem no gânglio da raiz dorsal (Berti-Mattera et al., 2006). Um estudo anterior do nosso grupo evidenciou aumento de receptores ET_A e ET_B no nervo espinhal de ratos submetidos a ligadura do nervo espinhal (Werner et al., 2010).

Receptores endotelinérgicos (ET_A e ET_B) já haviam sido detectados por imunofluorescência no gânglio da raiz dorsal de ratos (Plant et al., 2007) No entanto, neste trabalho notou-se pela primeira vez, via técnica de imunofluorescência, a existência de ambos os receptores endotelinégicos no gânglio da raiz dorsal de camundongos. Houve fluorescência aumentada nas células marcadas tanto para receptores ET_A quanto ET_B nos gânglios da raiz dorsal de camundongos que receberam tratamento com cisplatina e desenvolveram neuropatia, nos tempos de uma (de receptores ET_A apenas), duas e quatro semanas após o início da administração do quimioterápico. Conclui-se que o tratamento prolongado com cisplatina aumenta o número de ambos os receptores endotelinérgicos na membrana de células nesta estrutura.

De modo interessante, os resultados obtidos neste estudo sugerem que novos alvos terapêuticos para o tratamento da dor neuropática podem evidenciar ações em períodos específicos no decurso de cronicidade desta patologia. Desta forma conclui-se o modelo utilizado parece ter uma fase inflamatória (até 14 dias após o início do tratamento com cisplatina) e uma fase neuropática que os sistemas estudados estão envolvidos predominantemente na neuropatia facial secundária à administração de cisplatina. Pode-se dizer ainda que o endotelinérgico parece estar envolvido na fisiopatologia da neuropatia facial induzida por cisplatina em camundongos, mas não na neuropatia periférica, neste mesmo modelo.

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados deste estudo sugerem uma participação significativa do sistema endotelinérgico na gênese e manutenção da nocicepção neuropática induzida por cisplatina em camundongos. Além disso, verificou-se que:

- Os animais que receberam cisplatina desenvolveram hiperalgesia mecânica na pata que se manifestou quase que imediatamente e manteve-se por, no mínimo, 60 dias nos animais que receberam injeções semanais do quimioterápico por 4 semanas. Na face, o início dos sinais de hiperalgesia mecânica foi um pouco mais lento, alcançando seu pico cerca de 15 dias após a primeira administração de cisplatina e perdurando por no minimo 90 dias nos animais que receberam as 4 doses de Cisplatina.
- As endotelinas endógenas e seus receptores parecem estar envolvidos na hiperalgesia mecânica induzida por tratamento com Cisplatina em camundongos. Pode se observar ainda que a hiperalgesia mecânica da face dos animais parece estar mais relacionada ao sistema endotelinérgico do que a hiperalgesia da pata posterior.
- Corroborando dados encontrados na literatura, as fibras aferentes primárias do tipo C sensíveis à capsaicina não parecem ter papel relevante na hiperalgesia mecânica associada à neuropatia induzida por cisplatina em camundongos.
- As drogas anti-inflamatórias utilizadas *a posteriori* reverteram parcial e temporariamente o quadro de hiperalgesia mecânica tanto na face quanto na pata posterior, na primeira e na segunda semana após o início do tratamento com cisplatina, mas deixaram de ser efetivas na quarta semana após o início do tratamento com cisplatina, sugerindo que o desenvolvimento do quadro neuropático depende de uma fase inicial de caráter inflamatório.
- A morfina teve um comportamento semelhante ao das drogas anti-inflamatórias, tendo sido efetiva em reverter parcial e temporariamente a hiperalgesia mecânica na face e na pata dos animais na primeira e na segunda semana após o início do tratamento com cisplatina, perdendo sua eficácia antihiperalgésica na quarta semana.

- A gabapentina mostrou-se como a única droga de referência testada que reverteu parcial e temporariamente a hiperalgesia mecânica na face e na pata dos animais tratados com cisplatina em todos os períodos de observação.
- Houve aumento dos níveis de RNAm tanto para ET_A quanto para ET_B nos gânglios trigeminais, duas e quatro semanas após o início do tratamento com cisplatina. Este fenômeno não foi observado em amostras de medula espinhal lombar obtidas em qualquer um dos tempos após inicio do tratamento com cisplatina.
- Houve aumento do sinal de imunodetecção para receptores ET_B nos gânglios trigeminais quatro semanas após o início do tratamento com cisplatina. Evidenciando aumento destes receptores na membrana das células do tecido em questão.
- Houve aumento significativo da fluorescência nas células do gânglio trigeminal marcadas tanto para receptores ET_A quanto ET_B nos gânglios da raiz dorsal de camundongos que receberam tratamento com cisplatina e desenvolveram neuropatia, nos tempos de uma (de receptores ET_A apenas), duas e quatro semanas após o início da administração do quimioterápico. Conclui-se que o tratamento prolongado com cisplatina aumenta o número de ambos os receptores endotelinérgicos na membrana de células nesta estrutura.

O conjunto de resultados obtidos sugere que antagonistas de receptores ET_B possam ser úteis no manejo de dores neuropáticas da região craniofacial decorrentes do tratamento prolongado com Cisplatina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-ALEEN, S.A.; MORALEZ-AZA, B.M.; MCQUEEN, D.S.; DONALDSON, L.F. Inflammation alters somatostatin mRNA expression in sensory neurons in the rat. **Eur J Neurosci**. 21: 135-41, 2005.

ALMEIDA, T.F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.

ALOE, L.; MANNI, L.; PROPERZI, F.; DE SANTIS, S.; FIORE, M. Evidence that nerve growth factor promotes the recovery of peropheral neuropathy induced in mice by Cisplatin: behavioral, structural and bioquemical analysis. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, vol 86, 2000. pp. 84 -93.

APFEL, S.C.; AREZZO, J.C.; LIPSON, L.; KESSLER, J.A. Nerve grow factor prevents experimental ciaplatin neuropathy**. Ann Neurol**., 31:76-80, 1992.

ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHCUBO, H.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, 348: 730-732, 1990.

AUSTIN, P.J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-imune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J Neuoimmunol**, 229:26-50, 2010.

AUTHIER, N.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORÉ, F. Assessment of allodynia and hyperalgesia after cisplatin administration to rats. **Neurosci Lett**., 291: 73-6, 2000.

AUTHIER, N., GILLET, J.P.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F. An animal model of nociceptive peripheral neurophaty following repeated cisplatin injections. **Experimental Neurology**, 182:12 – 20, 2003

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; VILLAZON, M.; BORDALLO, J.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 369: 245-251, 2004a.

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; FRESNO, M.F.; LLAMES, S.; MEANA, A.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Implantation of tumoral XC cells induces chronic, endothelindependent, thermal hyperalgesia in mice. **Cell. Mol. Neurobiol**., 24(2): 269-281, 2004b.

BACKONJA, M.; GLANZMAN, R.L. Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence fron randomized, placebo-contrelled clinical trials. **Clin Ther**., 25: 81-104, 2003.

BACKONJA, M.; WOOLF, C.J. Future directions in neuropathic pain therapy: closing the translational loop. **Oncologist**, 15: 24-29, 2010.

BALCH, R.J.; TRESCOT, A. Extended-release morphine sulfate in treatment of severe acute and chronic pain. **J Pain Res**., 21: 191-200, 2010.

BARAJON, I.; BERSANI, M.; QUARTU, M.; DEL FIACCO, M.; CAVALETTI, G.; HOLST, J.J.; TREDICI, G. Neuropeptides and morpholocgical changes in cisplatin-induced dorsal root ganglion neuronopathy. **Exp. Neurol**., 138: 93-104, 1996.

BARON, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain- a clinical perspective. **Nat Clin Pract Neurol**, 2: 95- 106, 2006.

BARR, T.P.; KAM, S.; KHODOROVA, A.; MONTMAYEUR, J.P.; STRICHARTZ, G.R. New perspectives on the endothelin axis in pain. **Pharmacol Res**., 63: 532 – 540, 2011.

BASBAUM, A.I. Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. **Proc Natl Acad Sci USA**., 96: 7739-43, 1999.

BENNETT, G.J. Neuropathic pain. Textbook of pain (Wall and Melzak) apud: AUTHIER, N.; GILLET, J.P.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. **Exp Neurol**., 182: 12 – 20, 2003.

BERTI-MATTERA, L.N.; GARIEPY, C.E.; BURKE, R.M.; HALL, A.K. Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. **Exp. Neurol.,** 201: 399-406, 2006

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.

BIRCH, J.R. BHATTACHARYA, S. Emerging trends in diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. **Prim Care**, 37: 779 -792, 2010.

CAMARON, N.E.; COTTER, M.A. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetes,** 46, S31–S37, 1997.

CAVALETTI, G.; MARZORATI, L.; BOGLIUM, G.; COLOMBO, N.; MARZOLA, M.; PITELLI, M.R.; TREDICI, G. Cisplatin-induced peripheral neurotoxicity is dependent on total-dose intensitu and single-dose intensity. **Cancer.** 69:203-7, 1992.

CAVALLETI, D.; FABBRICA, D.; MINOIA, C.; FRATTOLA, L.; TREDICI, G. Carboplatin toxic effects on the peripheral nervous system of the rat. **Annals of Oncology**, 9:443-7, 1998.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, 53: 55-63, 1994.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, 353: 2233 -2237, 1999.

CHICHORRO, J.G.; ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G.E.P.; ERA, G.A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain,** 123: 64–74, 2006.

CHICHORRO, J.G.; ZAMPRONIO, A.R.; CABRINI, D.A.; FRANCO, C.R.C.; RAE, G.A. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, 43: 133-142, 2009Chong e Bajwa, 2003

CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, 52: 259-285, 1993.

COUTO, M. Laboratory guidelines for animal care. **Methods Mol Biol**, 770: 579-599, 2011.

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

DAHLOF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, D.; JERN, S.; HANSSON, L. Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. **J. Hypert**., 8: 811-817, 1990.

DAVENPORT, A.P.; MAGUIRE, J.J. Endothelin. **Handb Exp Pharmcol.** 176:295-329, 2006.

DE IUDICIBUS, S.; FRANCA, R.; MARTELOSSI, S.; VENTURA, A.; DECORTI, G. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 17: 1095-1108, 2011.

DE-MELO, J.D.; TONUSSI, C.R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RAE, G.A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints of the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, 77: 261-270, 1998.

DOSTROVSKY, J.O. Role of thalamus in pain. **Prog. Brain Res**., 129:245-245, 2000.

DZAGNIDZE, A.; KATSARAVA, Z.; MAKHALOVA, J.; LIEDERT, B.; YOON, M.S.; KAUBE, H.; LIMMROTH, V.; THOMALE, J. Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. **J Neurosci**., 27:9451 -9457, 2007.

FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13(3): S220-S222, 1989

FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflamatory drugs. **Int J Clin Pract Suppl**., 128: 2- 10, 2002.

FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S. Spinal cord injury pain-mechanisms and treatment. **Eur. J. Neurol.**, 11: 73-82, 2004

FINK, K.; MEDER, W.; DOOLEY, D.J.; GOTHERT, M. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and subsequent reduction of neurotransmitter release fron rat neocortical slices**. Br J Pharmacol**., 130:900 – 906, 2000.

GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. **Neurosci Biobehav Rev.,** 27: 729 – 737, 2004.

GOLD, M.S. e GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Focus in pain. **Nat. Medicine.** 16: 1248-1257, 2010.

GRISWOLD, D.E.; DOUGLAS, S.A.; MARTIN, L.D.; DAVIS, T.G.; AO, Z.; LUTTMANN, M.A.; PULLEN, M.; NAMBI, P.; HAY, D.W.; OHLSTEIN, E.H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Mol. Pharmacol.**, 56: 807-812, 1999.

GUTHRIE, O.W. Dys-synchronous regularion of XPC and XPA in trigeminal ganglion neuron following cisplatin treatment cycles. **Anticancer Res.,** 28: 2637 – 2640, 2008.

HANS, G.; DESEURE, K.; ADRIAENSEN, H. Endothelin1-induced pain and hyperalgesia: A rewiew of pathophysiology, clinical manifestations and future therapeutic options. **Neuropeptides**, 42: 119-32, 2008.

HANS, G.; SCHMIDT, B.L.; STRICHARTZ, G. Nociceptive sensitization by endothelin-1. **Brain Res Rev**., 60: 36 – 42, 2009.

HOVESTADT, A.; VAN DER BURG, M.E.L.; VERBIEST, W.L.J.; VAN PUTTEN, W.L.J., VECHT, C.J. The course of neuropathy after the cessation of cisplatin treatment, combined with ORG 2766 or placebo. J Neurol, 1992 apud AUTHIER, N.; GILLET, J.P.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A.; COUDORE, F.; An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following cisplatin injections. **Exp Neurol**, 182: 12 – 20, 2003.

HOYER, D.; BARTFAI, T. Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. **Chem Biodivers**. 9: 2367 – 2387, 2012.

HYGGE-BLAKEMAN, K.; BRUMOVSKI, P.; HAO, J.X.; XU, X.J.; HÖKFELT, T.; CRAWLEY,J.N.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Galanin over-expression decreases

the development of neurophatic pain-like behaviors in mice after partial sciatic nerve injury. **Brain Res**., 1025: 152-8, 2004Jaggi e Singh, 2011

JAMES, S.E.; DUNHAM, M.; CARRION-JONES, M.; MURASHOV, A.; LU, Q. Rho kinase inhibitor Y-27632 facilitates recovery from experimental peripheral neuropathy induced by anti-cancer drug cisplatin. **Neurotoxicology**, 31: 188-194, 2010.

JI, R.R.; WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction on nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis**., 8: 1-10, 2001.

KAMEI, J. HITOSUGI, H.; KAWASHIMA, N.; MISAWA, M.; KASUYA, Y. Effects of diabetes on the antinociceptive affects of intrathecally administered endothelin-1. **Res. Commun. Pathol. Pharmacol.**, 79(2): 209-217, 1993.

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

KHODOROVA, A.; FAREED, M.U.; GOKIN, A.; STRICHARTZ, G.R.; DAVAR, G. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. **J Neurosci**., 22: 7788-7796, 2002.

KHODOROVA, A.; NAVARRO, B.; JOUAVILLE, L.S.; MURPHY, J.E.; RICE, F.L.; MAZURKIEWICZ, J.E.; LONG-WOODWARD, D.; STOFFEL, M.; STRICHARTZ, G.R.; YUKHANANOV, R.; DAVAR, G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat. Med**., 9: 1055-1061, 2003.

KHODOROVA, A.; RICHTER, J.; VASKO, M.R.; STRICHARTZ, G. Early and late contributions of glutamate and CGRP to mechanical sensitization by endothelin-1**. J Pain**, 10:740 – 749, 2009.

KHODOROVA, A.; MONTMAYEUR, J.P.; STRICHARTZ, G. Endothelins receptors and pain. **J Pain**, 10: 4 – 28, 2009.

KLASS, M.; HORD, A.; WILCOX, M.; DENSON, D.; CSETE, M. A Role for Endothelin in Neuropathic Pain after Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve. **Anesth. Analg.**, 101: 1757-1762, 2005.

KLEEF, M.; VAN GENDEREN, W.E., NAROUZE, S.; NURMIKKO, T.J.; VAN ZUNDERT, J.; GEURTS, J.W.; MEKHAIL, N. Trigeminal neuralgia. **Pain Pract**., 9: 252 – 259, 2009.

KRAFFT, R.M. Trigeminal neuralgia**. Am. Fam. Physician**., 77:1291-1296, 2008.

KUSUNOSE, N.; KOYANAGI, S.; HAMAMURA, K.; MATSUNAGA, N.; YOSHIDA, M.; UCHIDA, T.; TSUDA, M.; INOUE,K.; OHDO,S. Molecular bases for the dosing time-dependency of anti-allodynic effects of gabapentin in a mouse model of neuropathic pain. **Mol Pain**, 6: 83, 2010.

LALICH, M.; MCNEEL, D.G.; WILDING, G.; LIU, G. Endothelin receptor antagonists in cancer therapy. **Cancer Invest**. 25: 785 – 794, 2007.

LAUGHLIN, T.M.; TRAM, K.V.; WILCOX, G.L.; BIRNBAUM, A.K. Comparison of antiepileptic drugs tiagabine, lamotrigine and gabapentin in mouse models of acute, prolonged, and chronic nociception. **J Pharmacol Exp Ther**., 302: 1166 – 1175, 2002.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137: 473-477, 2008.

LOVE, S.; COAKHAM, H.B. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. **Brain**, 124: 2347 – 2360, 2001.

MAI, H.Q.; ZEN, Z.Y.; FENG, K.T.; YE, Y.L.; ZHANG, C.Q.; LIANG, W.J.; GUO, X.; MO, H.Y.; HONG, M.H.; Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human nasophaingeal carcinoma. **Cancer Sci**., 97: 1388-95, 2006.

MANJAVACHI, M.N.; MOTTA, E.M.; MAROTTA, D.M.; LEITE, D.F.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**. 151: 345 – 355, 2010.

MASEREEUW, R.; TERLOUW, S.A.; VAN AUBEL, R.A.; RUSSEL, F.G.; MILLER, D.S. Endothelin B receptor-meddiated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule**. Mol Pharmacol**. 57: 59-67, 2000.

MCLEAN, M.J. Gabapentin in the management of convulsive disorders. **Epilepsia**; 40: 39 – 50, 1999.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Cinical practice. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**. 348: 1243- 1255, 2003.

MENÉNDEZ, L.; LASTRA, A.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local ET-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**., 367(1): 28-34, 2003.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**., 57: 1 – 164, 1999.

MILLAN, M.J. The descending control of pain. **Prog Neurobiol**, 66: 355 – 474, 2002

MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. Cyclo-ocygenase-2:pharmacologym physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br J Pharmacol**, 128: 1121-1132.

MÜLLER, L..; GERRITSEN VAN DER HOOP, R.; MOORER-VAN DELFT, C.M.; GISPEN W.H., ROUBOS, E.W. Morphological and electrophysiological study of

the effects of cisplatin and ORG.2766 o rat spinal ganglion neurons. **Cancer Res.**, 50: 2437-42, 1990.

MURPHY, D.M.; O'CALLAGHAN, D.S.; GAINE, S.P. Relief of chronic neuropathic pain throught endothelin antagonism. **Am J Med.**, 123: e7, 2010.

NEWTON, H.B.; PAGE, M.A.; JUNCK, L.; GREENBERG, H.S. Intra-arterial cisplatin for the treatment of malignant gliomas. **J Neurooncol**., 7: 39 -45, 1989.

NIKOLOV, R.; SEMKOVA, I.; MASLAROVA, J.; MOYANOVA, S. Antinociceptive effect of centrally administered endothelin-1 and endothelin-3 in the mouse**.** **Methods Find Exp Clin Pharmacol**., 15: 447 – 453, 1993.

NOMURA, T.; MIMATA, H.; YAMASAKI, M.; NOMURA, Y. Cisplatin inhibits the expresion of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human LNCaP cells. **Urol Oncol.**, 22: 453-60, 2004.

NURMIKKO, T.J.; ELDRIDGE, P.R. Trigeminal neuralgia – pathophysiology, diagnosis and current treatment. **Br J Anaesth**., 87: 117 – 132, 2001.

O'CONNOR, A.B.; DWORKIN, R.H. Treatment of neuropathic pain: and overview of recent guidelines. **Am J Med**, 122: s22-32, 2009.

OHKITA, M.; TAWA, M.; KITADA, K.; MATSUMURA, Y. Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. **J Pharmacol Sci**., 119: 302 – 313, 2012.

OLIVEIRA, C.M.B., BAAKLINI, L.G., ISSY, A.M., SAKATA, R.K. Neuralgia do trigêmeo bilateral: relato de caso. **Rev. Bras. Anestesiol**.,59: 476-480, 2009

OPGENORTH, T.J.; ADLER, A.L.; CALZADILLA, S.V.; CHIOU, W.J.; DAYTON, B.D.; DIXON, D.B.; GEHRKE, L.J.; HERNANDEZ, L. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 276: 473-481, 1996.

PETERS, C.M.; LINDSAY, T.H.; POMONIS, J.D.; LUGER, N.M.; GHILARDI, J.R.; SEVCIK, M.A.; MANTYH, P.W. Endothelin and the tumorigenic componente of bone Cancer pain. **Neuroscience**, 126: 1043–1052, 2004.

PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **Eur. J. Pharmacol.,** 351: 15–22, 1998.

PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-USTE, P.; SOUZA, G.E.; RAE, G.A. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br. J. Pharmacol.**, 129: 961-969, 2000.

PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-JUSTE, P. TONUSSI, C.R.; RAE, G.A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can J Physiol Pharmacol.,** 75 (6): 596-600, 1997.

POCKETT, S. Spinal cord sympathetic plasticity and chronic pain. **Anesth. Analg**., 80: 173-179, 1995.

POMONIS, J.D.; ROGERS, S.D.; PETERS, C.M.; GHILARDI, J.R.; MANTYH, P.W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J. Neurosci.**, 21: 999-1006, 2001.

QUESADA, G.A.T., BAPTISTA, C.E., PEDROSO, D.S., FLORES, D.L. Trigeminal Neuralgia – from diagnosis to treatment. **Revista Dentística on line**, Ano 5, n: 11, 2005.

RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J.; JACOBY, H.I. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** 276: 647–651, 1996.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **P Pharm Pharm Sci**, 11: 81s-110s, 2008.

REMUZZI, G.; PERICO, N.; BENIGNI, A. New therapeutic that antagonize endothelin: promises and frustations. **Nat Rev Drug Discov**., 1: 986-1001, 2002.

ROSE, F.C. Trigeminal neuralgia. **Arch. Neurol**., 56: 1163-1164,1999.

ROSLAND, J.H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, 42: 235 – 242, 1990.

RUSSO, A.; BRONTE, G.; RIZZO, S.; FANALE, D.; DI GAUDIO, F.; GEBBIA, N.; BAZAN, V. Anti-endothelin drugs in solid tumors. **Expert Opin Emerg Drugs**., 15: 27 – 40, 2010.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Cloning of a c DNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the edothelin receptor. **Nature**, 348: 732-5, 1990.

SAWYNOK, J.; LIU, X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog. Neurobiol**., 69: 313–340, 2003.

SEKI, K.; YOSHIKAWA, H.; SHIIKI, K.; HAMADA, Y.; AKAMATSU, N.; TAKASA, K. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteossarcoma. **Cancer Chemother Pharmacol**., 45: 199-206, 2000.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit. Rev. Oral Biol. Med**., 11 (1): 57-91, 2000.

SHIN, M.K.; LEVORSE, J.M.; INGRAM, R.S.; TILGHMAN, S.M. The temporal requirement for endothelin receptor-B signaling during neural crest development. **Nature**. 402: 496-501, 1999.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.; MATOS, F.J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essencial oils of Eucalyptus. **J Ethnopharmacol**., 89: 277 – 283, 2003.

STOKELY, M.E.; BRADY, S.T.; YORIO, T. Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 43: 3223-3230, 2002.

SUGIMOTO, T.; TAKEYAMA, A.; FUGITA, M.; ICHIKAWA, H.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Peripheral neuroglial death induced by cisplatin administration in neworn rats. **Neuroreport**., 12: 137 – 140, 2001.

TA, L.E.; BIEBER, A.J.; CARLTON, S.M.; LOPRINZI, C.L.; LOW, P.A.; WINDEBANK, A.J. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential of cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. **Mol Pain**., 6 – 15, 2010.

TAKEDA, M.; KOMEYAMA, T.; TSUTSUI, T.; MIZUSAWA, T.; GO, H.; HATANO, A.; TANIKAWA, T. Changes in urinary excretion of endothelin-1-like immunoreactivity in patients with testicular câncer receiving high-dose cisplatin therapy. **Am J Kidney Dis**., 24:12-6, 1994.

TANDRUP, T.; WOOLF, C.J.; COGGESHALL, R.E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transaction of the rat sciatic nerve. **J. Comp. Neurol**., 422: 172-180, 2000.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic swiych and initiation mechanisms. **Pharmacol Ther**., 109: 57-77, 2006.

UMAPATHI, T.; CHAUDHRY, V. Toxic Neuropathy. **Curr Opin Neurol**., 18: 574-80, 2005.

USUNOFF, K. G., MARANI, E., SCHOEN, J. H. R. The trigeminal system in man. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**., 136:1-126, 1997.

VAN HOOFT, J.A.; DOUGHERTY, J.J.; ENDERMAN, D.; NICHOLS, R.A.; WADMAN, W.J. Gabapentin inhibits presynaptic Ca(2+) influx and synaptic transmission in rat hippocampus and neocortex**. Eur J Pharmacol**,, 449: 221-228, 2002.

VENTURA, M.T.; CALOGIURI, G.F.; MATINO, M.G.; DAGNELLO, M.; FOTI, C.; DI CORATO, R. Alternative glucocorticoids for use in cases of adverse reaction to systemic glucocorticoids: a study on 10 patients. **Br J Dermatol**. 148: 139-141.

VERRI., W.A. Jr; MOLINA, R.O.; SCHIVO, I.R.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin acting on ET_B receptors in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 315(2): 609-615, 2005.

VOOGD, J., NIEUWENHUYS, R., VAN DONGEN, P. A. M., TEN DONKELAAR, H. J. Mammals. In: NIEUWENHUYS, R., TEN DONKELAAR, H. J., NICHOLSON, C. The central nervous system of vertebrates, v. 3, Springer,Berlin, p. 1637-2098, 1998.

WALL, P.D., SCADDING, J.W., TOMKIEWICZ, M.M. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. **Pain**, 6 (2): 175- 182, 1979.

WEBB, M.L.; MEEK, T.D. Inhibitors of endothelin. **Med. Res. Rev**., 17: 17-67, 1997.

WERNER, M.F.; TREVISANI,M.; CAMPI, B.; ANDRÉ, E.; GEPPETTI, P.; RAE, G.A. Contribution of peripheral endothelin ETA and ETB receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Eur. J. Pain**, 14: 911-917, 2010.

WOOLF, C.J. Pain. **Neurobiol Dis**, 7 (5): 504 – 510, 2000.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND,P.; REYNOLDS, M. RIDINGS, J.; DOUBELL, J.; CAGGESHALL, R.E. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **J. Comp. neurol**., 360: 121-134, 1995.

WOOLF, C.J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sci**., 74: 2605-2610, 2004.

YOUNG, H.Y.; LUO, Y.L.; CHENG, H.Y.; HSIEH, W.C.; LIAO, J.C.; PENG, W.H. Analgesic and anti-inflammatory eactivities of [6]-gingerol. **J Ethnopharmacol.**, 96: 207 – 210, 2005.

ZHANG, X., BAO, L., SHI, T.J., JU, G., ELDE, R., HOKFELT, T. Down-regulation of μ-opiod receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neurosci.**,82: 223-240, 1998.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**., 429: 23 – 37, 2001.