

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

**Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da  
participação das endotelinas em um modelo experimental**

**JULIANA GEREMIAS CHICHORRO**

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

**Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto**  
**Zampronio**

Florianópolis/SC, 04 de agosto de 2006.

CHICHORRO, Juliana Geremias. **Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental.** Florianópolis, 2006, 164 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae.

Defesa: 04/08/2006.

O presente estudo avaliou as respostas nociceptivas evocadas por estímulos de diferentes modalidades em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital, um modelo de dor neuropática orofacial, bem como a participação das endotelinas e de seus receptores. A constrição do nervo infraorbital induziu hipernocicepção térmica (ao frio e ao calor) unilateral entre 2 e 12 dias, hipernocicepção mecânica bilateral a partir do 12º dia e potencializou a fase II da resposta à formalina (1%) 12, 20 e 40 dias após a cirurgia. A hipernocicepção térmica foi resistente à indometacina e ao celecoxibe, mas reduzida por dexametasona, anticonvulsivantes, cloridrato de morfina ou de lidocaína. A hipernocicepção mecânica só foi modificada por estes dois últimos tratamentos. A injeção de ET-1 no lábio superior de ratos não operados induziu hipernocicepção mecânica e térmica. Nestes animais, receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> são expressos no gânglio do trigêmeo, e a expressão dos mesmos está aumentada 15 dias, mas não 4 dias, após a constrição do nervo infraorbital. Em gânglios de animais não operados, receptores ET<sub>A</sub> foram identificados em fibras A e C (não peptidérgicas, que expressam isolectina B4), enquanto que receptores ET<sub>B</sub> foram detectados em fibras C e células da glia. Em gânglios de animais constritos, a presença destas fibras é menos evidente, de modo que a expressão de ambos receptores é menos nítida. No entanto, a expressão de receptores ET<sub>A</sub> em fibras A, bem como de receptores ET<sub>B</sub> em células da glia permanece bastante clara. A hipernocicepção térmica foi reduzida por antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> (atrasentan e BQ-123), ET<sub>B</sub> (A-192621 e BQ-788), ou de ambos (bosentan). Em contraste, a hipernocicepção a estímulos químicos e mecânicos envolveu a ativação de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, respectivamente. Estes resultados sugerem que as endotelinas são importantes mediadores da hipernocicepção orofacial e que receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> podem constituir alvos terapêuticos potencialmente relevantes para o controle da dor neuropática trigeminal.

Palavras-chave: [neuralgia do trigêmeo], [endotelinas], [dor], [hipernocicepção].

*Ao meu marido Gustavo, por participar tão  
intensamente da minha vida e por me ajudar a  
superar os obstáculos.*

## *Agradecimentos*

*Ao meu orientador Prof. Giles A. Rae pela valiosa orientação, apoio, incentivo e amizade, os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho;*

*Ao Prof. Aleksander Roberto Zampronio pela co-orientação e pelas importantes sugestões;*

*Aos professores doutores Sérgio Henrique Ferreira, Yara Cury, João Batista Calixto, Rogério Tonussi e Adair Roberto Soares dos Santos por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta tese e cujas considerações contribuíram substancialmente para a melhoria deste trabalho;*

*Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Dr. João Batista Calixto e Dr. Jamil Assreuy, pela rica convivência e por contribuírem para minha formação;*

*Aos amigos “antigos” do laboratório Patrícia, Kathryn, Marcília, Janice, Fernanda e Emerson, pela amizade, companheirismo, e por todos os bons momentos que passamos juntos;*

*Aos novos amigos, Amélia, Rafaela e Leandro, por seu apoio durante a fase de conclusão deste trabalho;*

*Às professoras da UFPR, Daniela Cabrini e Célia Regina Franco, e à pós-graduanda Kátia Paludo pela paciência e auxílio na realização dos experimentos que envolveram imunohistoquímica;*

*À professora Maria Salete de Abreu Castro e ao pós-graduando Átila Savernini Lopes do Departamento de Farmacologia da UFMG pela acolhida e por me ensinarem a técnica de estímulo térmico ao calor, por eles padronizada;*

*A todos os colegas do Departamento, especialmente Rodrigo Medeiros, Jarbas Mota Siqueira Jr. e Felipe, pela colaboração e amizade;*

*Aos funcionários do biotério, especialmente ao Pedro, por sua solicitude;*

*Aos meus pais pelo apoio irrestrito em todos os momentos;*

*Aos meus irmãos, Gian, Rodrigo e Júnior e à minha cunhada Adriana, pelo carinho, apoio e por sempre acreditarem em mim;*

*À minha sobrinha, Luísa, por alegrar a minha vida;*

*Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.*

*A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.*

## Sumário

<b>Lista de abreviações</b> .....	i
<b>Lista de figuras e esquemas</b> .....	iii
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>1. Introdução</b> .....	01
<b>2. Objetivos</b> .....	34
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	37
3.1.1 Animais .....	38
3.1.2 Reagentes, drogas e soluções .....	38
3.2.1 Construção do nervo infraorbital .....	41
3.2.2 Testes comportamentais .....	42
3.2.3 Tratamento neonatal com capsaicina .....	45
3.2.4 Análise dos níveis de expressão dos receptores de endotelina .....	45
3.2.5 Localização dos receptores endotelinérgicos .....	46
3.2.6 Análise estatística .....	48

<b>4. Resultados</b> .....	49
4.1 Caracterização dos comportamentos nociceptivos induzidos pela estimulação, térmica, mecânica ou química da face após a constrição do nervo infraorbital de ratos .....	50
4.2 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipernocicepção térmica..	55
4.3 Influência de diferentes tratamentos sobre a hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos no modelo de constrição do nervo infraorbital .....	62
4.4 Influência da ET-1 exógena na hipernocicepção térmica e mecânica da região orofacial .....	73
4.5 Alterações na expressão dos receptores de endotelina ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos induzidas por constrição do nervo infraorbital .....	75
4.6 Distribuição dos receptores de endotelina ETA e ETB no gânglio do trigêmeo de ratos .....	77
4.7 Influência do tratamento com antagonistas de receptores de endotelina ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> na hipernocicepção a estimulação térmica, mecânica e química causada por constrição do nervo infraorbital .....	85
4.8 Influência da administração oral de múltiplas doses de atrasentan ou A-192621 no desenvolvimento e na manutenção da hipernocicepção ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital .....	93
<b>5. Discussão</b> .....	95
5.1 Desenvolvimento da hipernocicepção a estímulos térmico, mecânico e químico após a constrição do nervo infraorbital .....	96
5.2 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipernocicepção mecânica, térmica e química após a constrição do nervo infraorbital .....	100
5.3 Influência de diferentes tratamentos na hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos no modelo de constrição do nervo infraorbital .....	106
5.4 Participação das endotelinas na dor neuropática induzida por constrição do nervo infraorbital em ratos .....	111
<b>6. Conclusão</b> .....	122
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	128

## Lista de abreviações

Sp5	Núcleo do trato espinhal
Sp5O	Núcleo do trato espinhal oral
Sp5I	Núcleo do trato espinhal interpolar
Sp5C	Núcleo do trato espinhal caudal
SNC	Sistema nervoso central
DRG	Gânglio da raiz dorsal
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
ANKTM1	Ankyrin-like protein with transmembrane domains 1
CMR1	<i>Cold menthol receptor 1</i>
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transitório melastatina 8
COX	Ciclooxigenase
PG	Prostaglandina
EP	Receptores de prostaglandinas
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral – alfa
IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NGF	Fator de crescimento do nervo
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células da glia
TrKA	Receptores tirosina quinase A
NMDA	N-metil-D-aspartato
NK	Receptor de neurocininas
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico



5HT	Serotonina
ET	Endotelina
ECE	Enzima conversora de endotelina
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
AMP <sub>c</sub>	Adenosina monofosfato cíclico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
i.p.	Intraperitoneal
i.c.v.	Intracerebroventricular
s.c.	Subcutâneo
i.v.	Intravenoso
pmol	Picomol
nmol	Nanomol
IB <sub>4</sub>	Isolectina B <sub>4</sub>
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
NF	Neurofilamento
e.p.m	Erro padrão da média
PBS	Solução Salina Tamponada
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais

## Lista de Figuras e Esquemas

- Figura 1.** Decurso temporal da hipernocicepção térmica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....52
- Figura 2.** Decurso temporal da hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital..... 53
- Figura 3.** Decurso temporal da hipernocicepção a estímulos químicos em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital ..... 54
- Figura 4.** Influência do tratamento neonatal com capsaicina no decurso temporal da hipernocicepção térmica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital ..... 57
- Figura 5.** Influência da capsazepina na hipernocicepção térmica induzida por capsaicina ou por constrição do nervo infraorbital de ratos..... 58
- Figura 6.** Influência da injeção local de icilina no lábio superior de ratos na hipernocicepção ao frio..... 59
- Figura 7.** Influência do tratamento com capsazepina ou com capsaicina no período neonatal na hipernocicepção ao frio induzida por icilina ..... 60
- Figura 8.** Influência do tratamento com icilina ou capsazepina na hipernocicepção ao frio em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital..... 61
- Figura 9.** Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital..... 63
- Figura 10.** Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital..... 64

<b>Figura 11.</b> Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao frio induzida por carragenina .....	65
<b>Figura 12.</b> Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	67
<b>Figura 13.</b> Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital ..	68
<b>Figura 14.</b> Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital..	69
<b>Figura 15.</b> Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou lidocaína na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	70
<b>Figura 16.</b> Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou de lidocaína na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital ..	71
<b>Figura 17.</b> Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou lidocaína na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	72
<b>Figura 18.</b> Influência da ET-1 exógena na hipernocicepção térmica e mecânica em ratos não operados.....	74
<b>Figura 19.</b> Influência da constrição do nervo infraorbital na expressão dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> de endotelinas no gânglio do trigêmeo de ratos .....	76
<b>Figura 20.</b> Receptores ET <sub>A</sub> são expressos por fibras mielinizadas do gânglio do trigêmeo de ratos .....	79
<b>Figura 21.</b> Fibras mielinizadas do gânglio do trigêmeo não expressam receptores do tipo ET <sub>B</sub> .....	80
<b>Figura 22.</b> Receptores ET <sub>A</sub> são expressos por uma subpopulação de fibras de pequeno diâmetro do gânglio do trigêmeo de ratos .....	81

<b>Figura 23.</b> Receptores ET <sub>B</sub> são expressos por uma subpopulação de fibras de pequeno diâmetro do gânglio do trigêmeo de ratos.....	82
<b>Figura 24.</b> Células da glia do gânglio do trigêmeo não expressam receptores do tipo ET <sub>A</sub> .....	83
<b>Figura 25.</b> Receptores ET <sub>B</sub> estão presentes em células da glia do gânglio do trigêmeo .....	84
<b>Figura 26.</b> Efeito do tratamento local com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	87
<b>Figura 27.</b> Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	88
<b>Figura 28.</b> Efeito do tratamento local com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	89
<b>Figura 29.</b> Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	90
<b>Figura 30.</b> Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	91
<b>Figura 31.</b> Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina no teste de formalina em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	92
<b>Figura 32.</b> Influência de administrações repetidas de atrasentan ou A-192621 no desenvolvimento da hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital .....	94

- Esquema 1.** Decurso temporal da hipernocicepção orofacial a estímulos mecânicos, térmicos e químicos induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos ..... 120
- Esquema 2.** Influência de diferentes tratamentos na hipernocicepção térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital ..... 121
- Esquema 3.** Localização dos receptores envolvidos na hipernocicepção a estímulos mecânicos, térmicos e químicos induzida por administração de ET-1 no lábio superior de ratos não operados ..... 122
- Esquema 4.** Participação das endotelinas através da ativação de receptores ETA e/ou ETB na hipernocicepção a estímulos mecânico, térmicos e químicos induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos ..... 124

## Resumo

Este estudo avaliou as respostas nociceptivas evocadas por estímulos de diferentes modalidades em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital, um modelo de dor neuropática orofacial, bem como a participação das endotelinas e de seus receptores. A constrição do nervo infraorbital induziu hipernocicepção térmica (ao frio e ao calor) unilateral entre 2 e 12 dias, hipernocicepção mecânica bilateral a partir do 12º dia e potencializou a fase II da resposta à formalina (1%) 12, 20 e 40 dias após a cirurgia. A desnervação neonatal com capsaicina aboliu a hipernocicepção ao frio e ao calor por 6 e 8 dias, respectivamente, e reduziu em 60% a fase II da resposta à formalina. A hipernocicepção térmica foi resistente ao tratamento com AINEs (indometacina, 4 mg/kg e celecoxibe, 10 mg/kg), mas reduzida pelo tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg), anticonvulsivantes (carbamazepina, oxcarbazepina e gabapentina, 3 a 30 mg/kg), cloridrato de morfina (2,5 mg/kg) ou de lidocaína (10 mg/kg). A hipernocicepção mecânica só foi modificada por estes dois últimos tratamentos. A injeção de ET-1 (10 pmol) no lábio superior de ratos não operados induziu hipernocicepção mecânica e térmica. Nestes animais, receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> são expressos no gânglio do trigêmeo, e a expressão dos mesmos é aumentada 15 dias, mas não 4 dias, após a constrição do nervo infraorbital. Em gânglios de animais não operados, receptores ET<sub>A</sub> foram identificados em fibras A e C, enquanto que receptores ET<sub>B</sub> foram detectados em fibras C e células da glia. Em gânglios de animais constritos, a presença destas fibras é menos evidente, de modo que a expressão de ambos receptores é menos nítida. No entanto, a expressão de receptores ET<sub>A</sub> em fibras A, bem como de receptores ET<sub>B</sub> em células da glia permanece bastante clara. A hipernocicepção térmica foi reduzida por antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> (atrasentan, 10 mg/kg; BQ-123, 3 a 30 nmol), ET<sub>B</sub> (A-192621, 20 mg/kg; BQ-788, 3 a 30 nmol), ou de ambos (bosentan, 10 mg/kg). Em contraste, a hipernocicepção a estímulos químicos e mecânicos envolveu a ativação de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, respectivamente. Estes resultados sugerem que as endotelinas são importantes mediadores da hipernocicepção orofacial e que receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> podem constituir alvos terapêuticos potencialmente relevantes para o controle da dor neuropática trigeminal.

## Abstract

The present study evaluate orofacial nociceptive responsiveness evoked by various stimulus modalities in rats submitted to infraorbital nerve constriction, as well as the participation of the endothelin system. Chronic constriction of the infraorbital nerve induced unilateral thermal hypernociception to cold and heat, starting 2 days after surgery and lasting up to 12 days, as well as sustained bilateral mechanical hypernociception starting 12 days after constriction and potentiation of 1% formalin-induced phase II nociception on days 12, 20 and 40. Neonatal denervation with capsaicin abolished thermal hypernociception to cold and heat over the first 6 and 8 days, respectively, and reduced formalin-induced phase II nociception by 60%. Thermal hypernociception to cold or heat was resistant to the NSAIDs indomethacin (4 mg/kg) or celecoxib (10 mg/kg), but was significantly reduced by dexamethasone (0.5 mg/kg), the anticonvulsants carbamazepine, oxcarbazepine and gabapentin (3 to 30 mg/kg). Both thermal and mechanical hypernociception were significantly attenuated by morphine or lidocaine hydrochloride (2.5 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). ET-1 (10 pmol) injected into the upper lip of naive rats induced mechanical and thermal orofacial hypernociception. Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors were expressed in the trigeminal ganglia of naïve rats, and chronic constriction of the infraorbital nerve increased the expression of both receptors at 15 (but not at 4) days after the surgery. In naïve rats, ET<sub>A</sub> receptors were identified on C- and A-fibers, while ET<sub>B</sub> receptors were detected on satellite glial cells and non-peptidergic C-fibers. Immunoreactive non-peptidergic C fibers were less evident in the trigeminal ganglia of constricted rats, so that expression of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors on these neurons was less marked. However, ET<sub>A</sub> receptors on A-fibers and ET<sub>B</sub> receptors on glial cells were clearly evident. Thermal hypernociception was reduced by the blockade of ET<sub>A</sub> endothelin receptors (atrasentan, 10 mg/kg or BQ-123, 3 to 30 nmol), ET<sub>B</sub> endothelin receptors (A-192621, 20 mg/kg or BQ-788, 3 a 30 nmol), or both (bosentan, 10 mg/kg). However, hypernociception to formalin and to mechanical stimulation was reduced solely by blockade of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors, respectively. Collectively, the results of the current study suggest that endothelins are important mediators of orofacial hypernociception in this model and that ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors represent promising therapeutic targets for the control of trigeminal neuropathy.

## 1. Introdução

---



## 1.1 O sistema sensorial trigeminal

A neuralgia do trigêmeo, embora represente uma condição pouco prevalente na população, é a forma mais comum de dor neuropática crânio-facial e considerada a causa da dor mais severa que uma pessoa pode experimentar.

O nervo trigêmeo, como o próprio nome indica, é composto de três grandes ramos, oftálmico, maxilar e mandibular, os quais, juntamente com suas inúmeras ramificações, fornecem a inervação somato-sensorial da cabeça e da face. O ramo oftálmico inerva testa, pálpebra, córnea, conjuntiva, mucosas sinusais do frontal, etmóide e esfenóide e dorso do nariz; o ramo maxilar inerva o 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, juntamente com o terceiro ramo trafegam axônios motores responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios (Brodal, 1981; Usunoff et al., 1997; Voogd et al., 1998).

As fibras aferentes primárias do nervo trigêmeo apresentam terminações nervosas periféricas livres, ou podem estar associados a estruturas sensoriais especializadas que detectam estímulos tácteis inócuos ou estímulos proprioceptivos. De acordo com sua modalidade sensorial, e ainda com seu diâmetro e velocidade de condução, estas fibras foram classificadas em: A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\delta$  e C. As fibras A $\alpha$  e A $\beta$ , que representam proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar, são altamente mielinizadas, mais calibrosas (6-22

---

$\mu\text{m}$ ), têm a maior velocidade de condução (40-120 m/s) e são especialmente numerosas na superfície da pele e mucosas. As fibras A $\delta$ , possuem diâmetro e velocidade de condução intermediários (1-5  $\mu\text{m}$  e 4-30 m/s, respectivamente), enquanto que as fibras C, as únicas não mielinizadas, apresentam os menores diâmetro e velocidade de condução (0,3-1,5  $\mu\text{m}$  e 0,5-2 m/s, respectivamente). Estes dois últimos grupos representam receptores térmicos e nociceptores, isto é, fibras que são ativadas por estímulos nocivos (Burgess e Perl, 1973; Dubner e Bennett, 1983; Lawson, 1992).

Em mamíferos, a proporção entre fibras não mielinizadas e mielinizadas é bem menor nos ramos do nervo trigêmeo do que a observada nos nervos espinhais. Outra diferença diz respeito à inervação simpática, que também é menos abundante nos aferentes do trigêmeo em relação aos aferentes espinhais (Matthews e Robinson, 1980; Marfurt et al., 1986; Hoffmann e Matthews, 1990; para revisão ver Sessle, 2000).

Os corpos celulares da grande maioria dos neurônios sensoriais trigeminiais estão localizados no gânglio do trigêmeo, também denominado gânglio semilunar ou gânglio de Gasser (Marfurt, 1981). Em humanos, o gânglio trigeminal está localizado na superfície cerebral do osso temporal, lateralmente à ponte e à artéria carótida interna. As projeções centrais dos neurônios trigeminiais adentram o tronco cerebral, ao nível da ponte, e terminam nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo, os quais também recebem aferentes provenientes dos nervos facial, vago, glossofaríngeo e cervical superior. Esta convergência de projeções de nervos cranianos e cervicais para o mesmo sítio é outra característica que distingue o sistema sensorial trigeminal do espinhal (para revisão ver Sessle, 2000).

---

O complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo pode ser dividido em núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal (Sp5). Este último compreende três diferentes subnúcleos: oral (Sp5O), interpolar (Sp5I) e caudal (Sp5C) (para revisão ver Sessle 2000).

O subnúcleo caudal, que se localiza no bulbo e pode se estender até as vértebras espinhais C2 e C3, é o principal sítio de processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial. A grande maioria das fibras C e A $\delta$  projetam-se para as lâminas I, II, V e VI deste subnúcleo, enquanto que as fibras A $\beta$  projetam-se principalmente para as lâminas III a VI, assim como para estruturas mais rostrais do complexo sensorial trigeminal. Em adição, o Sp5C apresenta a maior concentração de mediadores químicos (i.e. glutamato, substância P) e de receptores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva, bem como de mediadores implicados na modulação destas informações (i.e. 5-HT, encefalina, GABA) em comparação com os outros subnúcleos. Devido à sua continuidade e semelhança estrutural com o corno dorsal da medula espinhal, o subnúcleo caudal também é denominado corno dorsal bulbar (Sessle, 1987; Gobel et al., 1981; para revisão ver Sessle, 2005).

Em uma posição mais rostral, e distante de 3 a 4 mm do subnúcleo caudal, está localizado o subnúcleo oral, o qual também está implicado na transmissão nociceptiva. Uma das principais diferenças entre estes dois subnúcleos está relacionada à substância gelatinosa, presente no subnúcleo caudal, porém ausente no subnúcleo oral. A substância gelatinosa compreende um grupo de interneurônios envolvidos na inibição da passagem de informações nociceptivas aferentes, e ainda recebe grande parte das

---

terminações centrais dos aferentes não mielinizados (fibras C). Apesar da ausência de substância gelatinosa no subnúcleo oral, este também transmite informações provenientes de fibras C, as quais são enviadas a partir do subnúcleo caudal, por meio de interneurônios (para revisão ver Woda, 2003).

Ao nível do tronco cerebral, a informação nociceptiva pode ainda ser modulada pela ativação de diversas estruturas centrais, incluindo núcleo maior da rafe, substância cinzenta periaquedutal, área pré-tectal anterior e área parabraquial (Chiang et al., 1991; para revisão ver Sessle, 2000).

Embora o complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo represente o principal destino dos aferentes trigeminais, uma pequena proporção deles se dirige para outras estruturas do tronco cerebral, que incluem a formação reticular, e os núcleos do trato solitário e supratrigeminal (para revisão ver Darian-Smith, 1966, Sessle, 1996).

Os neurônios aferentes primários fazem sinapse com os neurônios trigeminais de segunda ordem nos núcleos sensoriais do tronco cerebral, que em seguida, conduzem as informações nociceptivas para diferentes núcleos do tálamo (Dostrovsky, 2000). Esses neurônios de segunda ordem são classificados em: a) nociceptivos específicos, b) de amplo espectro dinâmico e c) receptores mecânicos de baixo limiar. Os primeiros são ativados exclusivamente por estímulos nocivos, ao contrário dos últimos, que respondem somente a estimulação tátil inócua. Por outro lado, os neurônios de amplo espectro dinâmico são ativados por estímulos dentro de uma ampla faixa de intensidades, desde inócuos até nocivos (para revisão ver Sessle, 2005).

Os núcleos talâmicos são somatotopicamente organizados. As informações tácteis provenientes da face e da boca dirigem-se para a porção medial do tálamo ventrobasal (núcleo ventro-pósteromedial). Esta região também contém neurônios nociceptivos que se projetam para áreas do córtex somato-sensorial relacionadas à discriminação e localização dos estímulos nociceptivos. Por outro lado, neurônios nociceptivos de núcleos mais mediais do tálamo conectam-se com o hipotálamo, córtex cingulado anterior, e outras regiões corticais, implicadas nos aspectos afetivo-motivacionais da dor (para revisão ver Sessle, 2005).

Tanto ao nível do tálamo, como do córtex somato-sensorial, a informação nociceptiva também está sujeita à modulação, no entanto é no tronco cerebral que as informações ascendentes sofrem a maior parte das influências inibitórias ou facilitatórias (para revisão ver Sessle, 2005).

## **1.2 Neuralgia do trigêmeo**

A lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso pode resultar em dor neuropática, a qual se caracteriza por dor espontânea, provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos (hiperalgesia). O termo hipernocicepção refere-se à sensibilização dos nociceptores, isto é, a diminuição do seu limiar de ativação, e tem sido empregado para designar alodinia ou hiperalgesia em animais de experimentação (Cunha et al., 2004).

A forma mais comum de dor neuropática crânio-facial é a neuralgia do trigêmeo, cuja incidência anual está estimada em 4,3 habitantes a cada

---

100.000 (Yoshimasu et al., 1972; Katusic et al., 1990, 1991). A dor decorrente da neuralgia do trigêmeo é descrita como lancinante, paroxística, na forma de choque elétrico ou queimação e limitada à área inervada por um ou mais ramos do nervo trigêmeo. Em cerca de 60% dos casos há o envolvimento de apenas um ramo, maxilar ou mandibular, enquanto que em aproximadamente 35% dos casos ambos estão envolvidos. Por outro lado, o envolvimento da divisão oftálmica é raro, sendo observado em menos de 3% dos pacientes.

Os episódios de dor normalmente são desencadeados por estimulação de áreas específicas (*trigger points* ou zonas de gatilho), geralmente localizadas no território inervado pelo trigêmeo. Os estímulos desencadeadores dos ataques de dor incluem o leve toque da face, escovação dos dentes, ativação dos músculos mastigatórios e faciais, como por exemplo, durante a fala e a alimentação, entre outros. Cada episódio de dor é seguido por um período refratário que pode durar alguns segundos até vários minutos. Quando os episódios de dor tornam-se muito freqüentes, os pacientes ficam incapacitados de realizar suas atividades diárias, e evitam até mesmo alimentar-se e comunicar-se temendo desencadear uma nova crise (para revisão ver Türp e Gobetti, 1996, Delzell e Grelle, 1999).

A etiologia da neuralgia trigeminal e os mecanismos subjacentes a esta condição ainda são pouco entendidos. A teoria mais aceita sobre a causa da neuralgia trigeminal refere-se à compressão vascular das raízes nervosas do trigêmeo na altura da ponte. Esta compressão normalmente resulta em desmielinização das fibras nervosas, as quais passam a disparar ectopicamente (Jannetta et al., 1967, 1980; Kerr, 1967). No entanto, esta alteração estrutural não é observada em todos os pacientes que sofrem desta

---

condição, e também são detectadas em pacientes que não apresentam a neuralgia do trigêmeo (Adams, 1989).

A neuralgia do trigêmeo clássica, também denominada idiopática ou essencial, deve ser diferenciada da neuralgia secundária. Esta última é uma forma rara de neuralgia causada por lesões intracranianas, que podem ser causadas por tumores ou malformações arteriais, mas também está relacionada à esclerose múltipla (afetando de 2 a 4 % dos pacientes). Nesta condição a dor perde o caráter paroxístico, podendo ser contínua ou na forma de ataques prolongados (para revisão ver Türp e Gobetti, 1996).

Em 1991, Vos e Maciewicz desenvolveram um modelo animal para o estudo da neuralgia do trigêmeo que consiste na constrição do nervo infraorbital de ratos. Este nervo é predominantemente sensorial e corresponde a quase toda divisão maxilar do trigêmeo (Greene, 1955). O nervo infraorbital é formado por 18 a 25 feixes nervosos, os quais contêm aproximadamente 20.000 fibras mielinizadas (60%) e 13.000 fibras não mielinizadas (40%) (Jacquin et al., 1984).

Estudos posteriores demonstraram que ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital desenvolvem hipernocicepção a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Vos et al., 1994; Imamura et al., 1997; Anderson et al., 2003). No entanto, os mecanismos que contribuem para o surgimento destas alterações sensoriais neuropáticas ainda são pouco entendidos e provêm, principalmente, de estudos que empregaram modelos de dor por lesão de nervos espinhais (Wiesenfeld-Hallin e Xu, 1996; Woolf et al., 1995; Lekan et al., 1996). Além disso, devido às evidências de que a lesão de nervos espinhais ou trigeminais induzem alterações anatômicas e fisiológicas diferentes, faz-se

---

necessário avaliar se a dor neuropática que se desenvolve nestes dois sistemas compartilha os mesmos mecanismos. Dentre as diferenças que já foram demonstradas está o “brotamento” de fibras nervosas simpáticas ao redor dos gânglios, que parece ocorrer somente após lesão de nervos espinhais, e o registro da atividade espontânea, significativamente menor em ramos do nervo trigêmeo lesados (Tal e Devor, 1992; Bongenhielm et al., 1999; Benoliel et al., 2001; Grelik et al., 2005).

### **1.3 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento das dores neuropáticas**

Como mencionado anteriormente, as dores neuropáticas resultam da lesão ou disfunção do sistema nervoso e incluem sintomas como dor espontânea e alodínia e/ou hiperalgesia (ou hipernocicepção) a estímulos mecânicos e/ou térmicos. Embora sua etiologia seja bastante variada, incluindo trauma, desordens metabólicas e vasculares, infecções virais ou bacterianas, entre outros fatores, o denominador comum destas patologias é o dano neural, o qual é seguido por algumas alterações que também parecem ser comuns a diversos tipos de dor neuropática (Devor, 2006).

No sistema nervoso periférico, as principais conseqüências da lesão de nervos são alterações na excitabilidade e no fenótipo das fibras aferentes primárias. Estes fenômenos vão contribuir para as alterações que ocorrem no SNC, que incluem: excitabilidade aumentada, inibição diminuída e reestruturação organizacional das células (para revisão ver Dickenson et al., 2002; Woolf, 2004). A seguir, encontra-se uma descrição mais detalhada



---

destes mecanismos e de sua possível contribuição para o desenvolvimento da dor neuropática.

Neurônios sensoriais lesionados, ou fibras próximas a eles, podem desenvolver alterações na sua excitabilidade suficientes para gerar potenciais de ação ectópicos (Chen e Devor, 1998; Liu et al., 2002). Estes podem resultar da desmielinização e/ou do aumento da expressão de canais de sódio e diminuição da expressão de canais de potássio (Waxman et al., 1999). Dentre os inúmeros tipos de canais de sódio dependentes de voltagem expressos no SNC e periférico, dois são de particular interesse, os sensíveis e os resistentes à tetrodotoxina. Os primeiros são expressos preferencialmente por fibras de médio a grande diâmetro, enquanto que os últimos são encontrados principalmente em fibras C, e ambos têm sua expressão alterada após a lesão de nervos ou a axotomia (Quashoff et al., 1995; Akopian et al., 1996; Cummins e Waxman, 1997). Ambos canais parecem ser os principais responsáveis pela geração dos disparos ectópicos, que contribuem para a dor espontânea e sensibilização de neurônios periféricos e do sistema nervoso central (para revisão ver Woolf, 2004).

Por outro lado, alguns autores sugerem que a desmielinização, seja por compressão crônica ou esclerose múltipla, é a principal responsável pela geração de disparos ectópicos em neurônios do trigêmeo (Calvin et al., 1977; Truini et al., 2005). Segundo estes autores, a atividade ectópica nas fibras A $\beta$ , que se conectam com neurônios de amplo espectro dinâmico no núcleo do trato espinhal, induziria uma ativação em alta frequência destes neurônios, os quais transmitiriam as informações geradas nos receptores mecânicos de baixo limiar como informações nociceptivas. Este seria um dos mecanismos que

---

contribui para o desenvolvimento de alodinia mecânica, um dos sintomas mais comumente observados em pacientes com neuralgia do trigêmeo (Calvin et al., 1977; Truini et al., 2005).

Outro mecanismo que parece contribuir para o desenvolvimento da alodinia mecânica está relacionado à reorganização dos circuitos neurais. Após a lesão de nervos espinhais, há perda de neurônios, principalmente do tipo C. Fibras A $\beta$ , que normalmente terminam na lâmina III do corno dorsal, passam então a “brotar” para lâminas mais superficiais da medula, ocupando os espaços anteriormente ocupados pelas fibras C. Desta forma, são formadas novas sinapses entre fibras A $\beta$  e neurônios de segunda ordem, que normalmente respondem a estímulos nocivos (Woolf et al., 1995; Lekan et al., 1996; Tandrup et al., 2000). Entretanto, ainda não foi objetivamente demonstrado que alterações similares ocorram no sistema sensorial trigeminal.

As alterações fenotípicas dos neurônios sensoriais lesionados não se limitam aos canais iônicos diretamente envolvidos na transmissão dos impulsos nervosos. Diversas outras proteínas têm sua expressão modificada após a lesão de um nervo, o que pode tanto contribuir para a sensibilização periférica e central, como para o efeito analgésico de algumas substâncias (para revisão ver Woolf, 2004). Um dos receptores que tem seu padrão de expressão alterado após lesão de nervos, e que contribui para o desenvolvimento da dor neuropática, é o TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide-1; Breese et al., 2005; Hong e Wiley, 2005; Biggs et al., 2006). Este receptor é um canal de cátions não seletivo, expresso por neurônios sensoriais de pequeno diâmetro, que pertence à família de receptores TRP (para revisão ver Clapham et al., 2003).

Dentre os ativadores conhecidos do TRPV1 estão a capsaicina, ingrediente pungente da pimenta vermelha, o calor (>43°C), prótons, alguns endocanabinóides e produtos da lipoxigenase (Caterina et al., 1997; Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000; Hwang et al., 2000). Este receptor também pode ser sensibilizado por mediadores liberados durante a resposta inflamatória, que ativam a via de sinalização da fosfolipase C, tais como a bradicinina e o fator de crescimento neural (NGF) (Chuang et al., 2001).

Devido às suas características de ativação e sensibilização, o TRPV1 tem sido considerado um integrador molecular dos estímulos nocivos nas terminações periféricas dos neurônios sensoriais. Pelo fato de funcionar como um sensor de calor nocivo, tem sido amplamente implicado como mediador da hiperalgesia térmica, tanto em condições de dor inflamatória como neuropática (Walker et al., 2003; Jhaveri et al., 2005). Agonistas dos receptores TRPV1, como capsaicina e resiniferotoxina, têm sido utilizados como ferramentas farmacológicas para o estudo da contribuição das vias sensíveis à capsaicina para o desenvolvimento de respostas nociceptivas. A administração de altas doses destes agonistas, em animais neonatos ou adultos, leva à destruição dos neurônios de pequeno a médio diâmetro que expressam receptores TRPV1, através do influxo maciço de íons cálcio para o interior destas células (Holzer, 1991; Hiura, 2000).

Evidências adicionais para a participação dos canais TRP como sensores térmicos surgiram recentemente com a clonagem de dois canais iônicos que parecem mediar a detecção do frio (Mckemy et al., 2002; Story et al., 2003). O primeiro suposto receptor de frio clonado foi inicialmente denominado CMR1 (*cold menthol receptor 1*), devido à sua ativação em

---

resposta à aplicação de mentol (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002). Este receptor, atualmente denominado TRPM8 (receptor de potencial transitório melastatina 8), é expresso por aproximadamente 20% dos neurônios do DRG e 35% dos neurônios do gânglio do trigêmeo de ratos, e possui limiar de ativação em torno de 25°C (Peier et al., 2002; Kobayashi et al., 2005). Um ano mais tarde foi identificado outro receptor TRP ativado por temperaturas menores que 17°C, o que se aproxima do limiar de frio nocivo para humanos (15°C, Davis e Pope, 2002). Inicialmente denominado de ANKTM1, este receptor atualmente é chamado de TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1; Story et al., 2003).

Além de diferirem quanto ao limiar de ativação, TRPA1 e TRPM8 não apresentam nenhuma similaridade estrutural. Enquanto o primeiro é ativado por compostos pungentes, como cinamaldeído e isotiocianato de alila, presentes nos óleos de canela e mostarda, respectivamente, o segundo é ativado por mentol, eucaliptol e compostos relacionados (Bandell et al., 2004; Behrendt et al., 2004). No entanto, a despeito da pronunciada diferença estrutural, um composto refrescante sintético, denominado icilina, constitui um ativador comum de ambos receptores (Story et al., 2003).

Apesar dos achados iniciais quanto à localização precisa dos receptores para frio serem discrepantes, estudos recentes confirmam que receptores TRPA1 são expressos juntamente com receptores TRPV1 em aproximadamente 40% das fibras sensoriais de pequeno diâmetro do DRG de ratos, enquanto que receptores TRPM8 são expressos por uma sub-população diferente de fibras C e por um grupo de fibras mielinizadas do tipo A $\delta$  (Story et

---

al., 2003; Kobayashi et al., 2005). Não há relatos de fibras C que co-expresssem TRPA1 e TRPM8.

Estudos recentes indicam que os receptores TRPA1 medeiam a hiperalgesia ao frio, enquanto que os receptores TRPM8 são sensores do frio não nocivo e da sensação de refrescância, evocada por substâncias como o mentol. Em modelos animais, a inflamação ou a lesão de nervos leva ao aumento da expressão dos receptores TRPV1 e TRPA1, mas não de receptores TRPM8, e a hiperalgesia ao frio e ao calor observadas em tais condições são controladas, respectivamente, através do bloqueio farmacológico destes receptores ou da supressão dos genes do TRPA1 e do TRPV1 (Karai et al., 2004; Obata et al., 2004, 2005; Breese et al., 2005; Jhaveri et al., 2005).

Em modelos de dor inflamatória têm sido amplamente demonstrado que determinados mediadores, como citocinas e prostaglandinas (PGs), liberados após a lesão do tecido, são capazes de sensibilizar os nociceptores contribuindo para o desenvolvimento da hiperalgesia (Cunha et al., 1992; Dray, 1995; Woolf e Doubell, 1994). Existem evidências de que estes mediadores também são liberados após a lesão de nervos periféricos, o que poderia resultar na sensibilização destas fibras e contribuir para o desenvolvimento da hiperalgesia em condições de dor neuropática (Watkins et al., 1995; De Leo et al., 1997).

As prostaglandinas (PGs) são sintetizadas a partir do metabolismo do ácido araquidônico por uma das isoformas da enzima cicloxigenase (COX). Geralmente, a isoforma COX-1 é constitutiva, enquanto que a COX-2 é induzida em resposta a diversos estímulos, inclusive inflamatórios (para revisão

ver Samad et al., 2002). Embora as PGs tenham papel fundamental na dor de origem inflamatória, sua importância na dor neuropática ainda é questionável. Estudos demonstram que a lesão de nervos periféricos induz aumento nos níveis espinhais de PGE<sub>2</sub>, na expressão de receptores EP1, bem como das enzimas COX-1 e COX-2 (Zhu e Eisenach, 2003; Hefferan et al., 2003; Ma e Eisenach, 2002; Durrenberger et al., 2006). Em adição, antiinflamatórios não esteroidais (AINES), cujo efeito analgésico é atribuído principalmente à inibição da síntese de PGs, reduzem a hipernocicepção a diversos estímulos em modelos de dor neuropática (Syriatowicz et al., 1999; Zhao et al., 2000; Ma e Eisenach, 2002; Takahashi et al., 2005). Contudo, em estudos clínicos o tratamento com AINES não parece ser efetivo no controle dos sintomas das dores neuropáticas (Max et al., 1988; Weber et al., 1993).

A lesão de nervos também induz o recrutamento e o acúmulo de células inflamatórias no sítio da lesão. Em adição, a degranulação dos mastócitos ou a depleção de neutrófilos ou macrófagos é capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela lesão de nervos periféricos (Clatworthy et al., 1995; Perkins e Tracey, 2000). Dentre os inúmeros mediadores que são liberados por essas células, citocinas pró-inflamatórias, especialmente fator de necrose tumoral (TNF) $\alpha$ , interleucina (IL) -1 $\beta$  e IL-6, estão sendo consideradas um elo entre a ativação ou o recrutamento das células imunes para o sítio da lesão e o desenvolvimento da hiperalgesia em condições de dor neuropática (para revisão ver Moalem e Tracey, 2005).

Outra importante fonte de citocinas e PGs, cuja participação no desenvolvimento das dores neuropáticas tem ficado cada vez mais evidente, é a glia. As células da glia envolvem e dão suporte aos neurônios do SNC, onde

são de 10 a 50 vezes mais numerosas. No sistema nervoso periférico são representadas pelas células de Schwann, enquanto que no SNC são classificadas em astrócitos, oligodendrócitos e microglia (para revisão ver Hanani, 2005). A microglia representa de 5 a 10% das células da glia, as quais atuam como macrófagos do SNC. Quando ativadas, por estímulos como trauma, isquemia ou inflamação, passam a expressar o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e atuam como células apresentadoras de antígeno, além de liberarem citocinas, PGs e outros mediadores pró-inflamatórios (Piehl e Lidman, 2001). Os astrócitos, que são as células mais numerosas do SNC e estão em íntimo contato com os neurônios, são responsáveis pela manutenção da homeostasia do microambiente, através da regulação da concentração extracelular de íons e neurotransmissores e do pH extracelular (para revisão ver Hanani, 2005).

Estudos recentes sugerem que a microglia contribui para o desenvolvimento da dor neuropática, enquanto que os astrócitos são mais importantes para a manutenção desta condição (Colburn et al., 1999; Raghavendra et al., 2003). Várias evidências corroboram esta hipótese. A lesão de nervos periféricos leva à ativação da microglia, e esta precede a ativação dos astrócitos (Colburn et al., 1997, 1999; Tanga et al., 2004). Em adição, após o estabelecimento da dor neuropática, o nível de ativação dos astrócitos, mas não da microglia, apresenta correlação com a intensidade das respostas nociceptivas em diversos modelos de dor neuropática (Colburn et al., 1997; Coyle, 1998; Raghavendra et al., 2003a, b). Contudo, ainda resta determinar quais estímulos levam à ativação destas células na medula espinhal, após a lesão de nervos periféricos, bem como as parcelas de

contribuição dos mediadores liberados por estas células para a dor neuropática, visto que muitos deles também são liberados por neurônios (para revisão ver McMahon et al., 2005).

No sistema nervoso periférico, as células da glia são divididas em três tipos: células satélites, presentes nos gânglios sensoriais, e células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes. Enquanto que cada célula de Schwann mielinizante envolve uma fibra A $\beta$  ou A $\delta$  aumentando sua velocidade de condução, células de Schwann não mielinizantes envolvem várias fibras do tipo C. A proximidade que existe entre estes dois últimos tipos de células explica porque eventos que ocorrem em células de Schwann são capazes de modificar a excitabilidade dos nociceptores (para revisão ver Jessen et al., 2004). As células de Schwann não mielinizantes, bem como às células satélites, assemelham-se em inúmeros aspectos aos astrócitos, inclusive no fato de que estes três tipos celulares contêm proteína fibrilar acídica, um neurofilamento do citoesqueleto que facilita sua identificação (para revisão ver Hanani et al., 2005). O envolvimento das células da glia periféricas na dor neuropática parece estar relacionado, principalmente, à sua capacidade de liberar mediadores pró-hiperalgésicos, tais como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE $_2$ , quando ativadas (para revisão ver Moalem e Tracey, 2005).

A demonstração desta característica das células periféricas da glia tem contribuído para a elucidação de um dos mecanismos propostos para a iniciação da dor neuropática. Em 1850, Augustus Waller descreveu pela primeira vez o processo de degeneração dos axônios após a secção de um nervo. Atualmente sabe-se que este processo, denominado degeneração Walleriana, ocorre após qualquer tipo de lesão de nervo onde a integridade do



---

axoplasma seja rompida, e que ele se correlaciona com o desenvolvimento da dor neuropática. A degeneração Walleriana envolve a destruição dos axônios e das células de Schwann, as quais passam a fagocitar os detritos de mielina. No entanto, são os macrófagos atraídos para o local da lesão que dominam o processo de fagocitose, e este processo parece ser mediado por citocinas pró-inflamatórias, especialmente  $TNF\alpha$ , as quais são liberadas por células de Schwann ativadas (Lisak et al., 1997; Shamash et al., 2002; para revisão ver Myers et al., 2006).

Outra consequência da degeneração neuronal está relacionada ao suprimento de fatores neurotróficos. Após a lesão de nervos periféricos, células de Schwann em processo de degeneração Walleriana, passam a sintetizar fatores neurotróficos, como os fatores de crescimento neural (NGF) e derivado de células da glia (GDNF), os quais normalmente são produzidos e fornecidos pelos tecidos-alvo. Estes, por sua vez, continuam a fornecer fatores neurotróficos para as fibras, que agora estão em menor número em virtude do processo de degeneração. Em adição, células inflamatórias que foram recrutadas para o sítio da lesão também são fonte destes fatores, e quando ativadas passam a liberá-los. O resultado destes eventos é o suprimento aumentado de fatores neurotróficos para as fibras remanescentes, os quais podem tanto contribuir como tentar impedir o desenvolvimento da dor neuropática (para revisão ver McMahon et al., 2005).

O NGF pode atuar nos dois sentidos. Por um lado, contribui para a regeneração de neurônios lesionados. Por outro, causa sensibilização dos nociceptores, de maneira direta, por interagir com receptores *trkA*, e indireta, pela ativação de células pró-inflamatórias (Horigome et al., 1993; McMahon et

---

al., 1995; Woolf et al., 1996). Em contraste, o GDNF (fator neurotrófico derivado da glia) não causa hiperalgesia e ainda é capaz de reduzir alguns dos sintomas relacionados à dor neuropática. Além disso, o tratamento com GDNF é capaz de reverter alterações na expressão de proteínas induzidas pela lesão de nervos (e.g. canais de sódio), as quais contribuem para a dor neuropática (Boucher et al., 2000).

Vários dos processos descritos acima, como por exemplo, disparos ectópicos, sensibilização das fibras aferentes primárias e ativação de células da glia, vão contribuir para a sensibilização central, que consiste na redução dos limiares de ativação dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Este processo é mediado pelo glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, e parece resultar principalmente da sua interação com receptores do tipo NMDA (Dickenson et al., 1997; Doubell et al., 1999). Existem inúmeras evidências de que o bloqueio destes receptores é capaz de reduzir a hipernocicepção associada à dor neuropática, tanto em modelos experimentais como na clínica (Christoph et al., 2006; para revisão ver Parsons, 2001; Chizh e Headley, 2005). Em adição, Substância P e Neurocinina A, que são liberadas juntamente com o glutamato, também contribuem para a sensibilização central, pois a ativação dos seus receptores, NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> respectivamente, levam à fosforilação de receptores NMDA, aumentando sua atividade (Randic et al., 1990; Lao et al., 2003).

Uma consequência adicional da lesão de nervos, que contribui para o desenvolvimento da dor neuropática, é a redução das influências inibitórias endógenas sobre a transmissão das informações nociceptivas. A maior parte dos interneurônios inibitórios presentes no corno dorsal da medula espinhal

contém GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) ou glicina. Tem sido demonstrado que a lesão de nervos periféricos induz a apoptose seletiva de interneurônios gabaérgicos, resultando na redução da síntese de GABA, com conseqüente perda do tônus inibitório na transmissão das informações nociceptivas (Baba et al., 2003). Ainda neste sentido, outro mecanismo que contribui para a dor neuropática é a redução da eficácia do sistema opióide na medula espinhal, que parece ser resultado tanto do aumento da expressão de mediadores considerados “anti-opioides” como, colecistocinina e dinorfina, bem como na redução dos receptores opióides presentes nas terminações de fibras aferentes primárias (Zhang et al., 1998; Vanderah et al., 2000).

Em adição aos mecanismos periféricos e espinhais que contribuem para a dor neuropática, evidências recentes têm indicado a contribuição de influências supra-espinhais neste processo (Narita et al., 2003). Como mencionado anteriormente, o sistema espinhal de transmissão das informações nociceptivas sofre influências inibitórias e facilitatórias de estruturas supra-espinhais, em especial o bulbo ventro-medial rostral. Contudo, apesar de alguns estudos apontarem que a lesão de nervos periféricos modifica estas interações (Pertovaara et al., 1996; Vanderah et al., 2001), a contribuição de estruturas supra-espinhais para o desenvolvimento da dor neuropática ainda precisa ser esclarecida.

#### **1.4 Controle farmacológico das dores neuropáticas**

As dores neuropáticas geralmente são de difícil controle e tratamento. Atualmente, anticonvulsivantes e antidepressivos ainda representam as classes de fármacos mais utilizadas no tratamento das dores neuropáticas. No entanto,

---

elas proporcionam o alívio dos sintomas em menos de 50% dos pacientes, e estão associadas a inúmeras reações adversas que limitam o seu uso (Sindrup e Jensen, 1999). Além disso, apesar do seu caráter crônico e muitas vezes inflamatório, as dores neuropáticas envolvem mecanismos específicos e, portanto, são resistentes ou pouco sensíveis aos AINES e aos opióides, fármacos de escolha para o tratamento de dores inflamatórias e crônicas, respectivamente.

O efeito analgésico dos anticonvulsivantes foi descrito pela primeira vez em 1942, a partir da observação de que a fenitoína era capaz de reduzir a dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo (Bergouignan, 1942). Vinte anos mais tarde, Blom (1962) demonstrou que o anticonvulsivante carbamazepina também era efetivo no tratamento da neuralgia do trigêmeo, o que foi confirmado por inúmeros estudos clínicos (Rockliff e Davis, 1966; Sweet, 1986). Atualmente, a carbamazepina é o único tratamento aprovado pela agência norte americana FDA (*Food and Drug Administration*) para a neuralgia do trigêmeo.

A carbamazepina é eficaz em reduzir os sintomas associados à neuralgia do trigêmeo em 60 a 80% dos pacientes, e por esta razão, é utilizada no diagnóstico diferencial entre esta e outras formas de dor orofacial (Campbell et al., 1966; Rockliff e Davis, 1966). No entanto, o uso prolongado de carbamazepina está associado com reações adversas que incluem sonolência, sedação, desconforto gastro-intestinal e hepatotoxicidade, e com recorrência dos sintomas em até 50% dos pacientes (para revisão ver Delzell e Grelle, 1999). Por estas razões, tem-se avaliado a eficácia de outros fármacos para o tratamento da neuralgia do trigêmeo. Dentre os anticonvulsivantes, estudos

---

clínicos ou em modelos animais indicam que lamotrigina, oxcarbazepina, gabapentina, entre outros, apresentam eficácia variada no tratamento da neuralgia do trigêmeo (Lunardi et al., 1997; Christensen et al., 2001; Gilron et al., 2001; Cheshire et al., 2002; Carrazana e Mikoshiba, 2003). Os principais mecanismos pelos quais esses anticonvulsivantes causam seu efeito analgésico nas dores neuropáticas são: bloqueio de canais de sódio e/ou cálcio, aumento da neurotransmissão gabaérgica e redução da neurotransmissão glutamatérgica (para revisão ver Söderpalm, 2002).

O efeito analgésico da carbamazepina, fenitoína, lamotrigina e oxcarbazepina parece ser decorrente do bloqueio da geração de potenciais de ação em alta frequência, o mesmo mecanismo envolvido no seu efeito anti-epiléptico. Os alvos para ação destes anticonvulsivantes na dor neuropática são os canais de sódio, cuja expressão e distribuição alteradas geram a hiperexcitabilidade das fibras lesionadas (para revisão ver Rogawski e Löscher, 2004). Tem sido demonstrado, por exemplo, que concentrações plasmáticas efetivas de carbamazepina no controle da neuralgia do trigêmeo em humanos, inibem a geração de disparos ectópicos em modelos experimentais de neuroma (Burchiel, 1988).

A gabapentina foi desenvolvida como um análogo do GABA, no entanto estudos demonstram que ela não interage com nenhum dos receptores gabaérgicos, nem com os transportadores de alta afinidade para o GABA (Taylor et al., 1998; Marais et al., 2001). Atualmente, considera-se que o efeito analgésico da gabapentina decorre da sua ação sobre subunidades  $\alpha_2$  de canais de cálcio, as quais têm sua expressão aumentada no DRG e na medula espinhal, após a lesão de nervos, e está associada ao desenvolvimento da

alodinia mecânica. A gabapentina liga-se com alta afinidade às subunidades  $\alpha_2$ , resultando no bloqueio de canais de cálcio e na redução da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central (Luo et al., 2002; Cheng e Chiou, 2006). Outros anticonvulsivantes como topiramato, valproato de sódio e pimizida, já foram avaliados para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, porém nenhum deles apresentou efetividade comparável à da carbamazepina (para revisão ver Delzell e Grelle, 1999).

A despeito das evidências de que antidepressivos tricíclicos são efetivos no tratamento de algumas formas de dor neuropática, estudos que avaliam sua efetividade na neuralgia do trigêmeo são escassos e contraditórios. Em um estudo envolvendo um pequeno grupo de pacientes, o tratamento com clomipramina, mas não com imipramina, durante três meses resultou no alívio dos sintomas da neuralgia do trigêmeo (Carasso et al., 1979). No entanto, no modelo de constrição do nervo infraorbital de ratos, ambas foram ineficazes em reduzir a alodinia mecânica (Idänpään-Heikkilä e Guilbaud, 1999). O efeito analgésico dos antidepressivos tricíclicos é atribuído, principalmente, à inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina. O aumento nos níveis destas aminas nas fendas sinápticas do SNC reforçaria a influência inibitória dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos sobre a transmissão da dor, contribuindo para o restabelecimento do equilíbrio entre as influências excitatórias e inibitórias nas dores neuropáticas (para revisão ver Sindrup et al., 2005).

Ainda com relação à ativação de mecanismos centrais de analgesia, foi demonstrado que agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> ou 5HT<sub>1B/1D</sub> reduzem significativamente a alodinia mecânica no modelo de constrição do nervo

infraorbital, mas não no modelo de ligação do nervo ciático (Kayser et al., 2002; Deseure et al., 2002). Agonistas de receptores 5HT<sub>1B/1D</sub>, como os triptanos, são eficazes na terapia da enxaqueca, a qual também envolve a ativação do sistema sensorial trigeminal (Pauwels e John, 1999). Estes dados sugerem que a ativação de vias serotoninérgicas pode representar um mecanismo inibitório importante no controle da neuralgia do trigêmeo.

Com relação à eficácia analgésica dos opióides na dor neuropática, os resultados obtidos em modelos animais são bastante controversos e parecem depender do modelo utilizado, da natureza do estímulo e da via de administração do opióide. No entanto, em estudos clínicos parece haver um consenso de que opióides são efetivos no tratamento das dores neuropáticas, desde que sejam administrados em altas doses (para revisão ver Dickenson e Suzuki, 2005). De maneira análoga, antagonistas de receptores de glutamato do tipo NMDA também são considerados eficazes na clínica, mas sua indicação é limitada pelas reações adversas decorrentes do seu uso, tais como, sedação, alucinações e ataxia (para revisão ver Parsons, 2001). Embora pacientes com neuralgia do trigêmeo tratados com antagonistas de receptores NMDA não relatem melhora dos sintomas (Mathisen et al., 1995; Gilron et al., 2000), a administração combinada de um destes antagonistas com o analgésico opióide morfina reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica no modelo de constrição do nervo infraorbital (Christensen et al., 1999). A potencialização do efeito analgésico da morfina por antagonistas de receptores NMDA já foi extensivamente demonstrada após a lesão de nervos periféricos, e tem sido atribuída à somação do efeito da morfina, de inibir a liberação de glutamato na medula espinhal, com o efeito dos antagonistas, de bloquear os

---

receptores NMDA (Ossipov et al., 1995; Nichols et al., 1997; Christensen et al., 1998; Kauppila et al., 1998).

A administração sistêmica de lidocaína (anestésico local e agente anti-arrítmico) para o tratamento da dor foi introduzido em 1961 por dois anestesiólogos, que relataram que a infusão endovenosa de lidocaína causava alívio da dor pós-operatória (Bartlett e Hutaserani, 1961). No entanto, devido às suas ações cardiovasculares e no SNC, o uso da lidocaína como analgésico foi bastante restrito até a década de 80, quando foram apresentadas as primeiras evidências do seu potencial terapêutico no tratamento das dores neuropáticas (Boas et al., 1982). O interesse pelo uso da lidocaína aumentou ainda mais na década de 90, por duas razões. A primeira foi a demonstração de que os disparos ectópicos dos nervos lesionados, os quais poderiam ser suprimidos pela lidocaína, era um mecanismo importante para o desenvolvimento da dor neuropática. O segundo foi o desenvolvimento de congêneres da lidocaína para uso por via oral, como a mexiletina, o que possibilitaria uma terapia mais conveniente e prolongada com esta classe de fármacos (para revisão ver Mao e Chen, 2000).

Em pacientes com neuralgia do trigêmeo, a administração endovenosa de lidocaína foi efetiva em 75% dos casos avaliados em um estudo clínico (Nagaro et al., 1995). Em adição, a tocinida, um derivado da lidocaína que pode ser administrado por via oral, reduziu os sintomas da neuralgia do trigêmeo em pacientes, na mesma proporção que a carbamazepina (Lindström e Lindblom, 1987). No entanto, outro estudo em um pequeno grupo de pacientes com neuralgia do trigêmeo tratados com mexiletina não evidenciaram qualquer melhora dos sintomas durante os sete dias de tratamento (Pascual e



---

Berciano, 1989). Além do uso sistêmico, lidocaína e outros anestésicos locais, como tetracaína e bupivacaína, são utilizados no tratamento da neuralgia do trigêmeo através da administração direta no gânglio ou em ramos do nervo trigêmeo, a qual produz um bloqueio nervoso que abole os episódios de dor nos pacientes por até oito meses (Stajcic et al., 1990; Goto et al., 1999).

Outra alternativa de tratamento, direcionada ao bloqueio periférico da transmissão dolorosa, consiste na aplicação tópica de capsaicina na região acometida pela dor. Estudos clínicos que avaliaram a efetividade deste tratamento, em pacientes com neuralgia do trigêmeo, reportaram remissão total ou parcial dos sintomas em 60 a 80% dos casos (Fusco e Alessandri, 1992; Epstein e Marcoe, 1994). As principais desvantagens deste tratamento são a desistência, ocasionada pelo desconforto sentido principalmente nas primeiras aplicações da capsaicina, e o reaparecimento dos sintomas, observado em até 60% dos casos (Epstein e Marcoe, 1994; para revisão ver Mason et al., 2004).

Apesar de terem sido propostas novas opções terapêuticas para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, estudos clínicos ou em modelos animais, demonstraram que nenhuma delas apresenta eficácia analgésica superior à da carbamazepina, a qual está relacionada com tolerância e inúmeras reações adversas. Novas modalidades de tratamento cirúrgico da neuralgia do trigêmeo também têm sido propostas. No entanto, são indicadas apenas nos casos mais graves ou naqueles resistentes à terapia medicamentosa, devido aos riscos associados com o procedimento cirúrgico e ao alto índice de reaparecimento dos sintomas. Desta forma, estudos adicionais devem ser direcionados tanto para a descoberta de novos alvos moleculares, quanto para a avaliação da

---

eficácia analgésica de compostos, que possam ser úteis no tratamento desta condição.

### **1.5 Endotelinas na dor**

As endotelinas são peptídeos que produzem efeitos variados em múltiplos tecidos e sistemas. A endotelina-1 (ET-1) é o representante mais importante desta família, que também inclui a ET-2 e a ET-3, sendo todas elas constituídas por 21 aminoácidos. Embora as células endoteliais vasculares sejam a principal fonte de ET-1, os genes que codificam os três peptídeos são expressos, em graus variados, por uma ampla variedade de células, incluindo miócitos cardíacos, células musculares lisas vasculares, intestinais e tubulares renais, gliais, pituitária, macrófagos, mastócitos, entre outras (para revisão ver Kedzierski & Yanagisawa, 2001). Além das suas ações vasculares, as endotelinas exercem efeitos pleiotrópicos em diversos tecidos dos tratos respiratório, gastrointestinal, urogenital, e no sistema nervoso central e periférico.

A biossíntese das diferentes isoformas de endotelina ocorre de maneira semelhante, no entanto, o precursor de cada uma delas é codificado a partir de um gene específico. A síntese da ET-1 ocorre a partir de um polipeptídeo com aproximadamente 212 aminoácidos denominado pré-pro-endotelina-1, o qual é clivado por convertases ou peptidases dando origem à big-endotelina-1, um peptídeo que pode conter de 37 a 41 aminoácidos, dependendo da espécie. O segundo passo para a síntese da ET-1 é a clivagem da big-endotelina-1 por endopeptidases específicas, denominadas enzimas conversoras de endotelina

(ECE), sendo conhecidas pelo menos duas isoformas (para revisão ver Nussdorfer et al., 1999).

Em mamíferos, as ações das endotelinas são mediadas através de dois receptores específicos, denominados ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, os quais pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G. O receptor ET<sub>A</sub> apresenta uma maior afinidade (70-100 vezes) pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3, enquanto que o receptor ET<sub>B</sub> exibe afinidade semelhante pelas três isoformas de endotelina (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). Os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> podem ainda ser discriminados pelo uso de agonistas ou antagonistas seletivos. Assim, receptores ET<sub>A</sub> são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123, ou não peptídicos, como o atrasentan. Por outro lado, os receptores ET<sub>B</sub> são ativados seletivamente por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala<sup>1,3,11,15</sup>] ET-1, o BQ-3020 e o IRL 1620, e seletivamente bloqueados por antagonistas peptídicos, como o BQ-788, ou não peptídicos, como o A-192621 (para revisão ver Masaki et al., 1994; Sokolovsky, 1995; Webb & Meek, 1997).

A meia vida da ET-1 no plasma é de aproximadamente 1,5 min. Depois da ligação da ET-1 aos seus receptores, a qual é considerada praticamente irreversível, ambos são rapidamente internalizados. No entanto, após a internalização, os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> são alvos de diferentes sistemas intracelulares. Enquanto que os receptores ET<sub>A</sub> são reciclados e retornam à superfície da membrana, os receptores ET<sub>B</sub> são encaminhados para os lisossomos, onde são degradados. O processo de reciclagem rápida dos receptores ET<sub>A</sub> contribui, por exemplo, para sua capacidade de induzir respostas contráteis de longa duração em vasos sanguíneos, enquanto que a

degradação dos receptores ET<sub>B</sub> é importante para a função de *clearance* desempenhada por este receptor (Fukuroda et al., 1994; Bremnes et al., 2000).

Embora as endotelinas estejam relacionadas ao controle fisiológico de algumas funções, sua maior relevância parece ser no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, incluindo aqueles que envolvem hipertensão, câncer, inflamação e dor (para revisão ver Remuzzi et al., 2002; Herrmann et al., 2006; Liu et al., 2006).

A primeira evidência da participação das endotelinas na dor foi apresentada por Ferreira e colaboradores (1989), um ano após a sua descoberta (Yanagisawa et al., 1988). Neste estudo, foi demonstrado que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos, incapacitação articular em cães, e sensação de prurido e hipernocicepção mecânica no antebraço de humanos. Também em humanos, Dahlof e colaboradores (1990) demonstraram que a infusão de ET-1 na artéria braquial causava dor profunda e hipernocicepção mecânica no antebraço.

Dois anos mais tarde, Raffa e colaboradores demonstraram que as três isoformas de endotelina, bem como a big-endotelina-1, causavam contorções abdominais em camundongos, e que ao menos o efeito da ET-1 era bloqueado pela administração sistêmica, intratecal ou intracerebroventricular (i.c.v.) de morfina (Raffa et al., 1991; Raffa et al., 1991).

Paralelamente a estes estudos, foram desenvolvidos alguns estudos clínicos que tinham como objetivo investigar a existência de uma relação entre aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 e dor em pacientes com angina, cefaléia tensional ou enxaqueca, mas somente nesta última condição foi

demonstrada uma correlação (Stewart et al., 1991; Nakamura et al., 1993; Gallai et al., 1994).

Assim como observado para outras substâncias álgicas, a injeção de ET-1 na pata de camundongos induziu o comportamento de lambida da pata, o qual é considerado um comportamento nociceptivo. Em adição, potencializou o edema e a nocicepção evocados por formalina (Piovezan et al., 1997; Piovezan et al., 2000).

Com a clonagem dos receptores de endotelina (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990), sua participação nas ações nociceptivas e hiperalgésicas começou a ser elucidada. Raffa e colaboradores (1996) demonstraram que receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> medeiam as contorções abdominais evocadas por ET-1 em camundongos. No entanto, a resposta nociceptiva e a hipernocicepção térmica decorrentes da injeção de ET-1 na pata de camundongos envolveu somente a ativação de receptores ET<sub>A</sub> (Piovezan et al., 2000; Menéndez et al., 2003).

Em 1994, foram produzidos os primeiros camundongos que não expressavam receptores ET<sub>B</sub> (Hosoda et al., 1994) e através desta ferramenta, Griswold e colaboradores (1999) demonstraram a participação destes receptores nas respostas nociceptivas induzidas por fenil-benzoquinona, um modelo de dor inflamatória visceral. Também em modelos de dor inflamatória, induzida por carragenina ou por CFA, demonstrou-se que receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> mediavam a hipernocicepção mecânica, enquanto que apenas receptores ET<sub>A</sub> estavam envolvidos na hipernocicepção térmica (Baamonde et al., 2004a). O bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> também foi capaz de reduzir a nocicepção e a hiperalgisia mecânica e térmica em modelos de dor associada ao câncer,

---

induzido por inoculação de células tumorais de próstata ou de fibrosarcoma em camundongos (Wacnik et al., 2001; Peters et al., 2004; Baamonde et al., 2004b; Yuyama et al., 2004).

Em ratos, a administração subcutânea de ET-1 na pata também induziu comportamentos nociceptivos, os quais coincidiram com a despolarização de fibras aferentes primárias, e foram mediados por receptores ET<sub>A</sub> (Gokin et al., 2001). Adicionalmente, a aplicação de ET-1 na superfície do nervo ciático induziu respostas nociceptivas, que persistiram por 60 min, e que foram bloqueadas por morfina ou por um antagonista seletivo de receptores ET<sub>A</sub> (Davar et al., 1998).

Quando administrada na articulação de ratos, a ET-1 causou nocicepção e hiperalgesia mecânica através da ativação de receptores ET<sub>A</sub> (de Melo et al., 1998a). Por outro lado, os receptores ET<sub>B</sub> mediarão a nocicepção articular induzida por LPS em articulação sensibilizada previamente com carragenina, bem como a hipernocicepção mecânica induzida por injeção intraplantar de IL-18 e IL-12 (de Melo et al., 1998b; Verri et al., 2004; Verri et al., 2005).

Apesar de todas as evidências da participação das endotelinas e de seus receptores em diferentes modelos de dor, até o momento, apenas três estudos avaliaram a sua contribuição para o desenvolvimento da dor neuropática. O primeiro (Jarvis et al., 2000) demonstrou que o bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> reduz a hipernocicepção mecânica associada à neuropatia diabética. O segundo (Klass et al., 2005) mostrou a participação de receptores ET<sub>A</sub> na hipernocicepção mecânica e térmica induzida por constrição do nervo ciático de ratos, bem como o aumento da expressão destes receptores e da ET-1 no local da lesão. O terceiro (Berti-Mattera et al., 2006) demonstrou que

tanto ratos diabéticos como àqueles que não expressavam receptores ET<sub>B</sub> apresentavam hipernocicepção mecânica em relação aos grupos controles correspondentes, e que ratos diabéticos apresentam redução na expressão de receptores ET<sub>B</sub> no nervo ciático, mas não no DRG.

Com relação aos mecanismos envolvidos nos efeitos nociceptivos da ET-1, Zhou e colaboradores (2002) demonstraram que a ET-1 aumenta a ativação de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina, através da ativação de receptores ET<sub>A</sub>. Pelo fato dos canais de sódio com esta característica serem expressos exclusivamente em fibras sensoriais de pequeno diâmetro (Amaya et al., 2000), este resultado é consistente com a ativação de nociceptores pela ET-1 “in vivo”. Também através da ativação de receptores ET<sub>A</sub>, a ET-1 causou aumento na concentração intracelular de cálcio em neurônios sensoriais o que, possivelmente, contribui para suas ações nociceptivas (Zhou et al., 2001). A ET-1, através da ativação de receptores ET<sub>B</sub>, induziu aumento dos níveis de AMPc e ativação de proteínas quinases C, e estes mecanismos parecem estar envolvidos na hipernocicepção mecânica induzida por este peptídeo em ratos (da Cunha et al., 2004). Em cultura de neurônios do DRG de camundongos, também foi demonstrada a participação de proteínas quinases C no efeito potencializador da ET-1 sobre as correntes evocadas pela capsaicina (Yamamoto et al., 2006). Por outro lado, altas doses de ET-1 parecem estar relacionadas a efeitos anti-nociceptivos e anti-hiperalgésicos, em ratos e camundongos, via ativação de receptores ET<sub>B</sub> (Piovezan et al., 2000; Khodorova et al. 2002). O efeito modulatório resultante da ativação de receptores ET<sub>B</sub> sobre respostas nociceptivas é atribuído a um mecanismo

dependente de opióides, o qual envolve a liberação de  $\beta$ -endorfinas a partir de queratinócitos (Khodorova et al., 2003).

No sistema sensorial trigeminal, o RNA mensageiro de receptores ET<sub>B</sub> foi detectado em fibras sensoriais de camundongos, enquanto que no gânglio do trigêmeo foram identificados tanto receptores ET<sub>B</sub> como imunoreatividade para endotelinas (Kitano et al., 1998; Brändli et al., 1996). Os níveis das endotelinas no gânglio foram drasticamente reduzidos após a desnervação sensorial com capsaicina, sugerindo que estes peptídeos localizam-se predominantemente em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro (Milner et al., 2000). Interessantemente, a estimulação elétrica do gânglio do trigêmeo ou a administração endovenosa de capsaicina induziu inflamação neurogênica na dura-máter cefálica de ratos, a qual foi prevenida apenas pelo bloqueio de receptores ET<sub>B</sub>. A injeção de capsaicina também causou elevação dos níveis de ET-3, mas não de ET-1 no seio sagital superior, o que sugere que esta seja a principal isoforma liberada pelas fibras aferentes do trigêmeo (Brändli et al., 1996).

Em contraste às ações nociceptivas das endotelinas administradas periféricamente, a injeção intratecal de ET-1 ou i.c.v. de ET-1 ou ET-3 produziu efeitos antinociceptivos em diversos modelos de dor em camundongos. Enquanto que a antinocicepção produzida pela ET-1 na medula espinhal parece envolver a ativação de receptores opióides, visto que é bloqueada por naloxona, no cérebro, os efeitos da ET-1 e da ET-3 não se mostraram sensíveis a este tratamento (Kamei et al., 1993; Nikolov et al., 1993). Além disso, camundongos com deleção gênica para a ET-1 neuronal apresentam maior sensibilidade à estimulação mecânica e térmica, em modelos de dor



inflamatória e neuropática. Ao menos na dor inflamatória, o hipotálamo parece ser o sítio de ação anti-nociceptiva da ET-1 (Hasue et al., 2005). Outra estrutura cerebral que está envolvida no efeito antinociceptivo da ET-1 é a substância cinzenta periaquedutal, onde a injeção de antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> bloqueia a supressão da dor induzida por este peptídeo (D'Amico et al., 1997).

O envolvimento das endotelinas na mediação de diversas ações potencialmente importantes no contexto fisiopatológico tem levado ao desenvolvimento de drogas capazes de bloquear suas ações, a fim de serem testadas como novas modalidades de terapia. Alguns destes antagonistas têm demonstrado resultados promissores em modelos experimentais de doença renal, hipertensão, insuficiência cardíaca e vários tipos de câncer. Em humanos, eles vêm sendo testados para o tratamento do câncer de próstata, vasoespasmos cerebrais, nefropatia diabética e insuficiência cardíaca. O bosentan, um antagonista dual de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, já foi aprovado nos Estados Unidos, Europa e Brasil para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar, o que aumenta substancialmente as chances de que outros antagonistas tornem-se novas alternativas de tratamento em condições fisiopatológicas onde for demonstrada uma participação relevante das endotelinas. Na dor neuropática, o envolvimento das endotelinas começou a ser investigado apenas recentemente (Jarvis et al., 2000; Klass et al., 2005; Berti-Mattera et al., 2006), mas somente em modelos que envolvem a estimulação de nervos espinhais.

## 2. Objetivos

---

## **2.1 Objetivo Geral**

As dores neuropáticas, apesar de menos comuns, trazem danos maiores aos pacientes, os quais ainda não dispõem de uma terapêutica satisfatória para o seu controle. O sistema sensorial trigeminal, devido à sua organização anátomo-fisiológica peculiar, parece ser mais propenso ao desenvolvimento de dor neuropática. Além disso, existem evidências de que os mecanismos envolvidos nas dores neuropáticas de origem trigeminal e espinhal apresentam diferenças significativas. Esta observação pode ser importante para que se faça uso de uma terapêutica diferenciada nos dois sistemas. Desta forma, utilizando um modelo de dor neuropática trigeminal, pretendemos aprofundar os conhecimentos acerca do controle e dos mecanismos envolvidos, bem como avaliar a participação das endotelinas no desenvolvimento desta patologia.

## **2.2. Objetivos Específicos**

- Padronizar a cirurgia para constrição do nervo infraorbital, a fim de obter um modelo de dor neuropática relacionada ao nervo trigêmeo e estabelecer os parâmetros mais adequados de avaliação da reatividade dos animais à estimulação química, térmica e mecânica aplicada à região orofacial;
- Avaliar o desenvolvimento e o decurso temporal da hipernocicepção a estímulos mecânico, térmicos e químicos em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital;
- Verificar a influência da depleção de fibras C, através do tratamento neonatal dos animais com capsaicina, no desenvolvimento da hipernocicepção térmica;

- 
- Avaliar possíveis receptores envolvidos na transdução dos estímulos térmicos, através do tratamento dos animais com alguns agonistas e antagonistas dos mesmos;
  - Caracterizar farmacologicamente este modelo, através do emprego de drogas comumente utilizadas na clínica para o tratamento da neuralgia do trigêmeo;
  - Avaliar a habilidade da ET-1 exógena em mimetizar os efeitos produzidos pela constrição do nervo infraorbital, i.e. causar hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos em animais não operados;
  - Analisar possíveis alterações na expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos, induzidas pela constrição do nervo infraorbital, através da técnica de *Western Blot*;
  - Determinar os tipos neuronais que expressam receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos, através de imunohistoquímica.
  - Investigar a participação de endotelinas na hipernocicepção mecânica, térmica e química induzida pela constrição do nervo infraorbital, através do tratamento dos animais com antagonistas duais ou seletivos dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>;

### 3. Materiais e Métodos

---

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Animais**

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 180-250 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. No mínimo 3 dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.1.2 Reagentes, drogas e soluções**

Foram empregados os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- Anticorpo monoclonal anti-proteína acídica fibrilar glial de camundongos (GFAP, Chemicon Internacional Inc., California, USA);
- Anticorpo monoclonal anti-neurofilamento 200 de camundongos (NF200, Chemicon Internacional Inc., California, USA);
- Anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a Alexa Flúor 488 (Molecular Probes, Oregon, USA);
- Anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a Alexa Flúor 594 (Molecular Probes, Oregon, USA);

- 
- Anticorpo anti-isolectina IB4 conjugado a Alexa Flúor 594 (Molecular Probes, Oregon, USA);
  - Anticorpo contra receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> de endotelina (Alomone Labs., Jerusalém, Israel);
  - A-192621 [2R-(2a, 3b, 4a)]-4-(1,3-benzodioxol-5il)-1-[2-(2, 6 dietilfenil) amino]-2-oxoetil]-2-(4-propoxifenil)-3- ácido pirrolidinacarboxílico], (Abbott Laboratories, North Chicago, USA), antagonista não peptídico seletivo de receptores ET<sub>B</sub>;
  - Atrasentan (Abbott Laboratories, North Chicago, USA), antagonista não peptídico seletivo de receptores ET<sub>A</sub>;
  - Bosentan (Actelion, Auschwil, Suíça), antagonista não peptídico dual de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>;
  - BQ-123 (ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]), (RBI, Natick, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET<sub>A</sub>;
  - BQ-788 (N-*cis*-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L-γ-metileucil-D-1-metoxicarbonil-D-norleucina), (RBI, Natick, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET<sub>B</sub>;
  - Capsaicina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
  - Capsazepina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
  - Carbamazepina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
  - Carragenina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
  - Celecoxibe (Celebra<sup>®</sup>, Searle-Pfizer, Caguas, Porto Rico);
  - Cloridrato de Cetamina (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil);
  - Cloridrato de lidocaína (Xylestesin<sup>®</sup>, Cristália, SP, Brasil);
  - Cloridrato de morfina (Sigma, St. Louis, MO, USA);

- 
- Dexametasona (Decadronal<sup>®</sup>, Laboratórios Prodome, SP, Brasil);
  - Endotelina-1 (Bachem, Natick, MA, USA);
  - Gabapentina (Neurontin<sup>®</sup>, Pfizer, SP, Brasil);
  - Icilina (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, Michigan, USA);
  - Indometacina (Merck, Sharpe & Dohme Ltda);
  - Oxitetraciclina (Terramicina<sup>®</sup>, Pfizer, Guarulhos, Brasil);
  - Oxcarbazepina (Trileptal<sup>®</sup>, Novartis Pharma AG, Basileia, Suíça);
  - Solução de formalina a 98% (Nuclear, Diadema, SP, Brasil);
  - Solução salina estéril 0,9% (Core Healthcare, Gujarat, Índia);
  - Salina tamponada com fosfato em tabletes (*phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA);
  - Xilazina (Dopaser<sup>®</sup>, Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha).

O Atrasentan e o A-192621 foram dissolvidos em PBS contendo 3% de etanol e 100 µL de NaOH 0,1 N, para administração por via endovenosa, enquanto que, para a administração oral, foram suspensos em 0,3% de metilcelulose em salina. O veículo do Bosentan foi água para injeção aquecida a 50° C. Na preparação da capsaicina foram utilizados 10% de Tween 80, 10% de etanol e 80% de PBS. As soluções estoque de capsazepina ( $10^{-2}$  M) e icilina (2 mg/ml) foram preparadas em etanol absoluto e DMSO:PBS (1:5), respectivamente. As diluições subseqüentes destas drogas foram feitas em PBS, sendo que a solução final do veículo não induziu nenhum efeito nociceptivo perceptível “per se”. As soluções estoque de ET-1( $10^{-4}$  M), BQ-123 e BQ-788 ( $10^{-3}$  M) foram preparadas em PBS e mantidas a uma temperatura de -20°C, sendo diluídas para as doses desejadas momentos antes dos



experimentos, com o mesmo veículo. A solução de formalina, assim como a dexametasona, morfina, lidocaína, gabapentina e carragenina foram preparadas em solução salina estéril. A indometacina foi dissolvida em Tris (0,2 M, pH 8,2), enquanto que o celecoxibe foi administrado na forma de suspensão contendo 0,1% de carboximetilcelulose em PBS. O veículo da carbamazepina consistiu de 20% de DMSO, 1% de etanol, 1% de Tween 80 e 78% de solução salina estéril.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Constrição do nervo infraorbital**

A constrição do nervo infraorbital foi realizada com modificações ao método proposto anteriormente por Vos et al. (1994). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, ip.) e foi realizada a assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constricto, enquanto que os animais do grupo intacto não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico. Ao

---

término da cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (oxitetraciclina, 60 mg/kg, i.m.) e mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia.

### **3.2.2 Testes comportamentais**

#### ***Estimulação mecânica***

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados por pelos menos 2 horas nas caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma pré-seleção dos animais a qual consistiu na aplicação crescente de 10 filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA, 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 10,0 g) na região inervada pelo infraorbital, em ambos os lados da face. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas, em cada lado, com um intervalo de ~30 s entre cada aplicação. Considerou-se o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape. Apenas os animais que não apresentaram, na fase de pré-seleção, estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos subsequentes, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta à estimulação mecânica superior a 10 g. Para análise do decurso temporal da hipernocicepção mecânica os animais foram estimulados em intervalos de 3, 6 ou 10 dias após a cirurgia. Em outros experimentos, entre 15 e 20 dias após a cirurgia, o limiar de resposta ao estímulo mecânico foi novamente determinado (basal pós-cirurgia), em seguida os animais receberam os diferentes

---

tratamentos, e foram repetidamente estimulados em intervalos de 30 min ou 1 hora até no máximo 6 horas.

### ***Estimulação térmica por frio***

Para a realização deste teste os animais foram previamente habituados nas caixas de observação por aproximadamente 30 min, e em seguida um spray de tetrafluoretano foi aplicado, por cerca de 1 s, na região innervada pelo nervo infraorbital (sobre a área de inserção das vibrissas). Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (i.e. *grooming*) facial bilateral foi registrado durante 2 minutos. Foram incluídos nos experimentos apenas animais cujo tempo de *grooming* facial foi  $\leq$  15 s, antes da realização da constrição. Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção ao frio a estimulação foi realizada, em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e em intervalos de 2 ou 4 dias, enquanto que para avaliação do efeito de diferentes tratamentos os animais foram estimulados, apenas no lado ipsilateral, no 4º dia após a cirurgia. Adicionalmente, a temperatura da face foi medida em um grupo separado de animais através do uso de um termômetro de contato, antes, imediatamente após e 2 min após a aplicação do spray.

Em alguns experimentos, para fins comparativos, avaliou-se a influência da injeção de carragenina (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l) ou veículo (salina, 50  $\mu$ l) no lábio superior de animais não operados, nas respostas induzidas pela aplicação do spray.

### ***Estimulação térmica por calor***

Neste teste, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante ( $\sim 50^\circ$ ) foi posicionada aproximadamente 1 cm da área de inserção das vibrissas. Em seguida, foi registrado o tempo de latência para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas. Foram incluídos nos experimentos apenas animais que apresentaram estas respostas entre 9 e 15 s a partir da aplicação do estímulo. Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção térmica a estimulação foi realizada, em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e em intervalos de 2 ou 4 dias, enquanto que para avaliação do efeito de diferentes tratamentos os animais foram estimulados, apenas no lado ipsilateral, no 4º dia após a cirurgia, em intervalos de 30 ou 60 min.

### ***Estimulação química***

Consistiu da aplicação do teste de formalina, originalmente proposto por Dubuisson e Denis (1977), em animais submetidos à constrição crônica do nervo infraorbital. Neste teste, os animais receberam uma injeção subcutânea de veículo (solução salina estéril 0,9%, 50  $\mu$ l) ou formalina (1%, 50  $\mu$ l) no lábio superior, ipsilateral à constrição, e imediatamente após a injeção os animais foram colocados nas caixas de observação e o tempo de *grooming* facial bilateral foi registrado durante 30 minutos. Para avaliação do decurso temporal da hipernocicepção química, este teste foi aplicado em grupos diferentes de animais 4, 12, 20 e 40 dias após a cirurgia, enquanto que para avaliação do

---

efeito de diferentes tratamentos os experimentos foram realizados apenas no 20º dia após a cirurgia.

### **3.2.3 Tratamento neonatal com capsaicina**

Ratos Wistar machos neonatos (2º dia de vida) foram tratados com capsaicina (50 mg/kg) ou veículo e submetidos, na idade adulta, à constrição do nervo infraorbital e posterior avaliação da reatividade a estímulos térmicos. A eficácia deste tratamento foi confirmada através da realização do teste de capsaina orofacial, previamente descrito por Pelissier et al. (2002). Neste teste, capsaicina (1,5 µg; 50 µl) ou veículo (50 µl) foram injetados no lábio superior dos animais, e o tempo despendido executando o *grooming* facial foi registrado durante 15 minutos.

### **3.2.4 Análise dos níveis de expressão dos receptores de endotelina**

Alterações nos níveis de expressão dos receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos foram avaliados através de *Western Blot*. No 4º e no 15º dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados por anestesia profunda com cetamina e xilazina. Em seguida, o gânglio do trigêmeo, ipsilateral ao feixe nervoso constricto, foi removido, lavado em PBS, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até sua utilização. Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; EDTA 1 mM; NaF 1 mM; ortovanadato de sódio 2 mM; DTT 1 mM; aprotinina 10 µg/ml; leupeptina 10 µg/ml; fenilmetil-sulfonil fluoreto 1 mM e em seguida, mantidos em repouso por 15 minutos a 4°C. Os tecidos homogeneizados foram então centrifugados a 14.000 r.p.m, por

45 min a 4°C, o sobrenadante (que corresponde ao extrato citosólico) foi descartado e o *pellet* foi lavado em PBS. Este foi resuspenso no mesmo tampão acima mencionado, acrescido de Triton X 100 a 1%, solubilizado em ultrassom, mantido em repouso por 15 minutos a 4°C e novamente centrifugado (14.000 r.p.m. por 45 min a 4°C). O sobrenadante (que corresponde ao extrato de membrana) foi coletado, e a concentração de proteínas das amostras foi dosada pelo método de Bradford. Aproximadamente 50 µg de proteína foram adicionadas ao tampão SDS-PAGE e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a 100 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, utilizando-se corrente constante de 300 mA, durante 120 min. Após a transferência, a membrana foi incubada em leite desnatado (5%) e gelatina (1,5%), durante 1 h, a fim de bloquear sítios de ligação inespecífica. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* à 4°C com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-ET<sub>A</sub> ou anti-ET<sub>B</sub> (diluição 1:200), lavadas em tampão apropriado e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a uma peroxidase (1:4000) durante 1 h, a temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por aumento da quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL (Amersham Bioscience Corp.). A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria.

### **3.2.5 Localização dos receptores endotelinérgicos**

A fim de caracterizar os tipos de neurônios sensoriais do gânglio do trigêmeo de ratos que expressam os receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, os gânglios foram coletados e preparados para análise imunohistoquímica. Para

isto, os animais foram anestesiados, perfundidos transcárdicamente com PBS (a 4° C, pH 7,4) e os gânglios trigeminais foram removidos. Os tecidos coletados foram então emblocados em Tissue Tek, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C até o momento do seu processamento. Os blocos, contendo dois gânglios cada, foram cortados em criostato (resfriado a -20° C) em secções de 12 µm, as quais foram montadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. As lâminas foram mantidas a -20° C até o início da realização do ensaio. Nesta etapa, os cortes foram primeiramente lavados com PBS (3 vezes de 10 min), incubados em acetona a 4 °C 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 4° C com anticorpo primário contra receptores ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> (1:200), cada qual diluído em tampão de bloqueio acrescido de 0,02% de azida. Após esta primeira incubação, os cortes foram lavados com PBS e incubados *overnight* a 4° C com anticorpo primário destinado à marcação de fibras mielinizadas (anti - neurofilamento 200 – NF200, 1:200) ou de células da glia (anti - proteína acídica fibrilar glial – GFAP, 1:400). Após nova lavagem dos cortes com PBS, os mesmos foram incubados com os fluoróforos Alexa Flúor 498 e 594 (1:100), por 2 h, à temperatura ambiente e protegidos da luz. Para marcação de fibras não mielinizadas, foram realizadas apenas duas incubações, a primeira com anticorpo contra os receptores endotelinérgicos, conforme descrito acima, e a segunda com um anticorpo anti-isolectina B4 (IB4) conjugado ao fluoróforo Alexa Flúor 488, simultaneamente à incubação com o Alexa Flúor 594 (por 2 h, à temperatura ambiente e na ausência de luz). Finalmente, os cortes foram lavados com PBS, protegidos com Fluoromount G

---

e cobertos com as lamínulas. As imagens foram visualizadas através de microscopia confocal.

### **3.2.6 Análise Estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias de 5 a 10 animais por grupo. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de *Newman-Keuls* foi empregada para análise dos dados obtidos no teste de formalina. Os resultados referentes à hipernocicepção mecânica foram analisados com ANOVA de *Kruskal & Wallis*, para dados não paramétricos, seguida do teste *U* de *Mann-Whitney*. Os dados obtidos dos experimentos de hipernocicepção térmica foram analisados com ANOVA de medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. Os dados da densitometria foram analisados com teste *t* de *Student*. Em todas as análises, valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.



## 4. Resultados

---

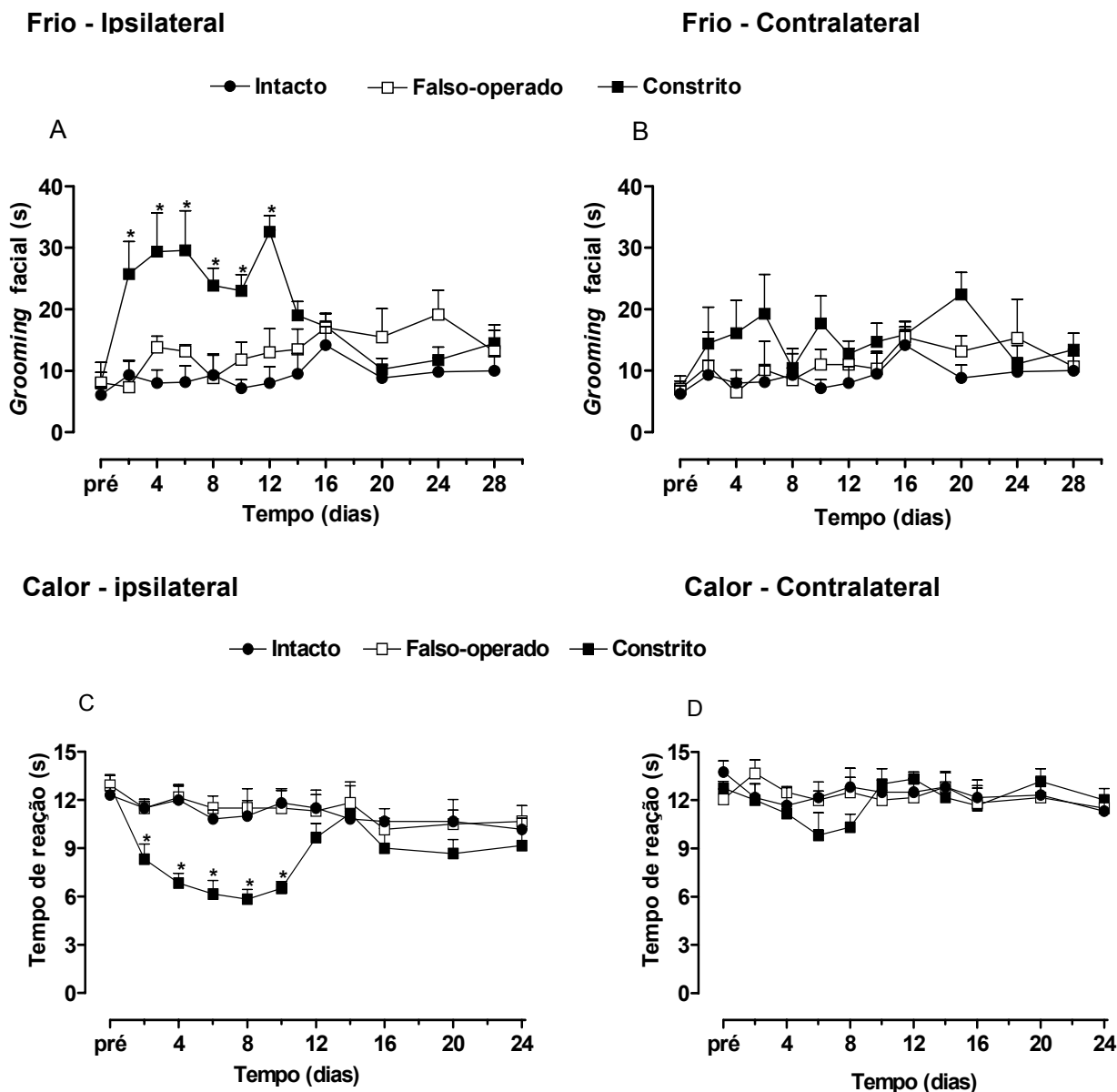
#### **4.1 Caracterização dos comportamentos nociceptivos induzidos pela estimulação térmica, mecânica ou química da face após a constrição do nervo infraorbital de ratos.**

A aplicação do spray de tetrafluoretano na face dos animais causou redução imediata da temperatura da superfície cutânea de  $29,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  para  $13,8 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  ( $n=12$ ), a qual, passados 2 min, retornou ao nível basal. Em ratos submetidos à constrição unilateral do nervo infraorbital, a aplicação do spray de tetrafluoretano induziu hipernocicepção ao frio, que foi significativa a partir do 2º dia e persistiu até o 12º dia após a cirurgia. Este aumento na responsividade ao frio só foi observado no lado ipsilateral à constrição e não foi significativamente diferente entre os animais dos grupos falso-operado e intacto em nenhum dos períodos avaliados (Figura 1A e 1B).

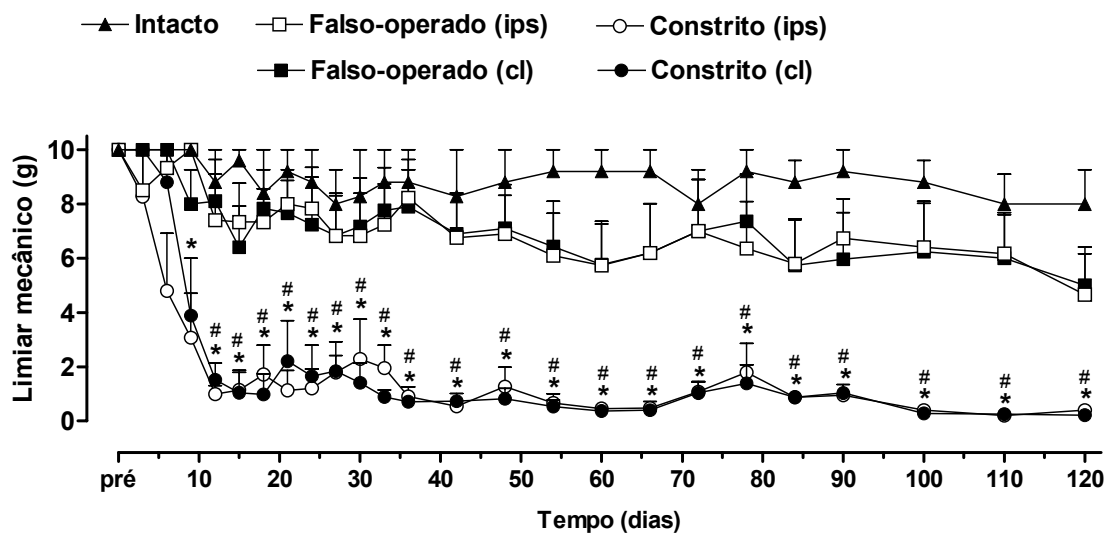
De maneira análoga, ratos do grupo constricto desenvolveram hipernocicepção à aplicação do calor, restrita ao lado ipsilateral, e que foi significativa do 2º até o 10º dia após a cirurgia. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os resultados dos grupos falso-operado e intacto (Figuras 1C e 1D).

Por outro lado, a hipernocicepção mecânica, avaliada através da aplicação de filamentos de Von Frey, desenvolveu-se em ambos os lados da face dos animais do grupo constricto, teve um início mais tardio (9 e 12 dias, nos lados ipsi- e contra-lateral, respectivamente), porém sua duração foi muito mais prolongada (pelo menos 120 dias). Novamente não foram observadas diferenças significativas entre os limiares de resposta dos animais dos grupos falso-operado e intacto durante todo o período de avaliação (Figura 2).

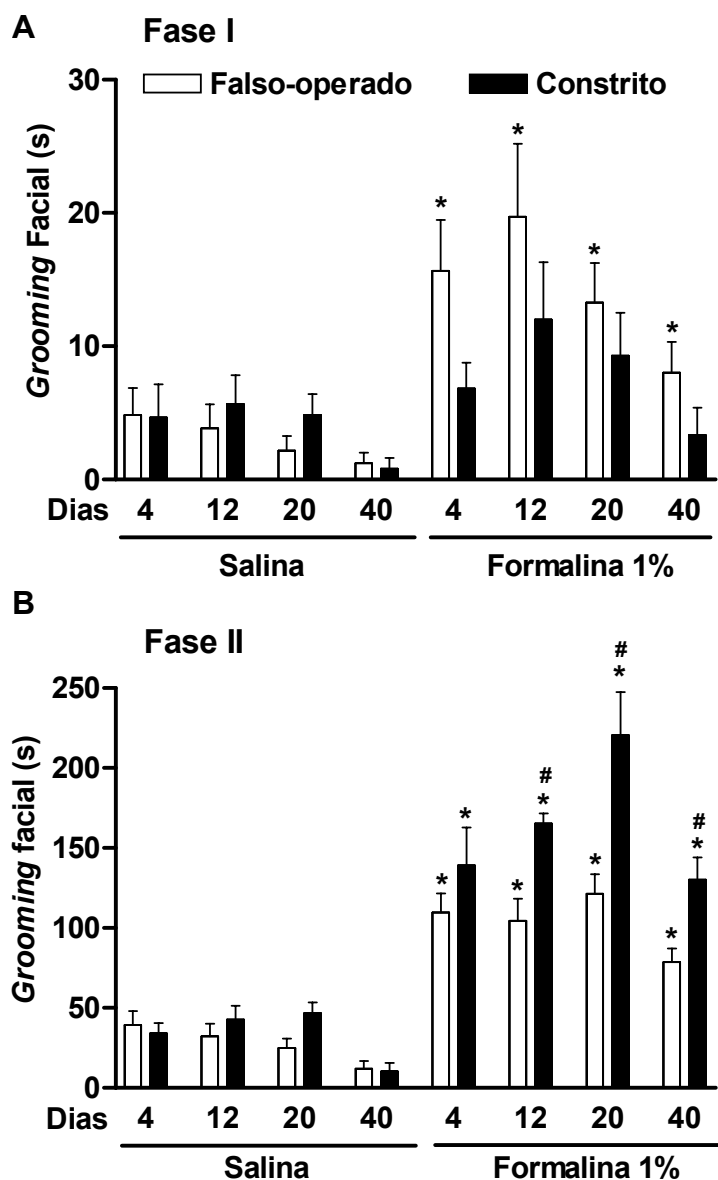
A Injeção de formalina 1% no lábio superior de animais do grupo falso-operado causou aumento do tempo de *grooming* facial significativamente diferente dos animais que receberam o mesmo volume de veículo, nas fases I e II do teste e em todos os períodos em que esta resposta foi avaliada (4, 12, 20 e 40 dias após a cirurgia; Figuras 3A e 3B). No entanto, em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital, não foi observada diferença na fase I da resposta entre os grupos tratados com veículo ou com formalina, mas a fase II foi significativamente potencializada em animais do grupo constricto nos dias 12, 20 e 40 após a cirurgia (Figuras 3A e 3B).



**Figura 1 – Decurso temporal da hipernociceção térmica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** As repostas dos animais à estimulação térmica foram avaliadas antes (pré) e em diferentes períodos após a cirurgia (grupos constricto e falso-operado). Os animais do grupo intacto foram avaliados nos mesmos períodos, mas não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Os painéis A e C mostram o decurso temporal da hipernociceção ao frio e ao calor, respectivamente, quando o estímulo foi aplicado no lado ipsilateral à cirurgia, enquanto que os painéis B e D mostram os resultados da aplicação do frio e do calor, respectivamente, no lado contralateral. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo que os animais dispenderam executando o *grooming* facial (painéis A e B) ou do tempo de reação ante a aplicação do calor (painéis C e D) (n= 6 a 8 animais por grupo). Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 2 – Decurso temporal da hipernociceção mecânica em animais submetidos à constrictão do nervo infraorbital.** As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas antes (pré) e em diferentes períodos após a cirurgia (grupos constricto e falso-operado). Os animais do grupo intacto foram avaliados nos mesmos períodos, mas não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento ( $n= 5$  a  $8$  animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P<0,05$  em relação aos dados da estimulação ipsilateral e contralateral do grupo falso-operado, respectivamente (ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste U de Mann-Whitney).



**Figura 3 – Decurso temporal da hipernociceção a estímulos químicos em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** As respostas dos animais à injeção de formalina (1%, 50  $\mu$ l) ou veículo (salina, 50  $\mu$ l) foram avaliadas em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo dependido pelos animais executando o *grooming* facial nas fases I (0-3 min, painel A) e II (12-30 min, painel B) do teste (n=6 animais por grupo). Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação aos animais tratados com veículo e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo falso-operado tratados com formalina (ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls).

## **4.2 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipernocicepção térmica.**

Existem inúmeras evidências de que fibras do tipo C constituem as principais vias de transmissão de estímulos térmicos nocivos. Desta forma, avaliamos o efeito da desnervação neonatal de ratos com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), procedimento que leva à destruição da maior parte das fibras C e de uma pequena proporção de fibras A $\delta$  (Holzer, 1991; Hiura, 2000), no desenvolvimento da hipernocicepção térmica ao frio e ao calor. Como ilustrado na Figura 4, ratos tratados no período neonatal com capsaicina e submetidos à constrição do nervo infraorbital quando adultos, não desenvolveram hipernocicepção ao frio ou ao calor até o 8<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia, respectivamente, após a cirurgia. No entanto, após este período, apresentaram respostas semelhantes às aquelas observadas em animais do grupo constricto tratados com veículo no período neonatal.

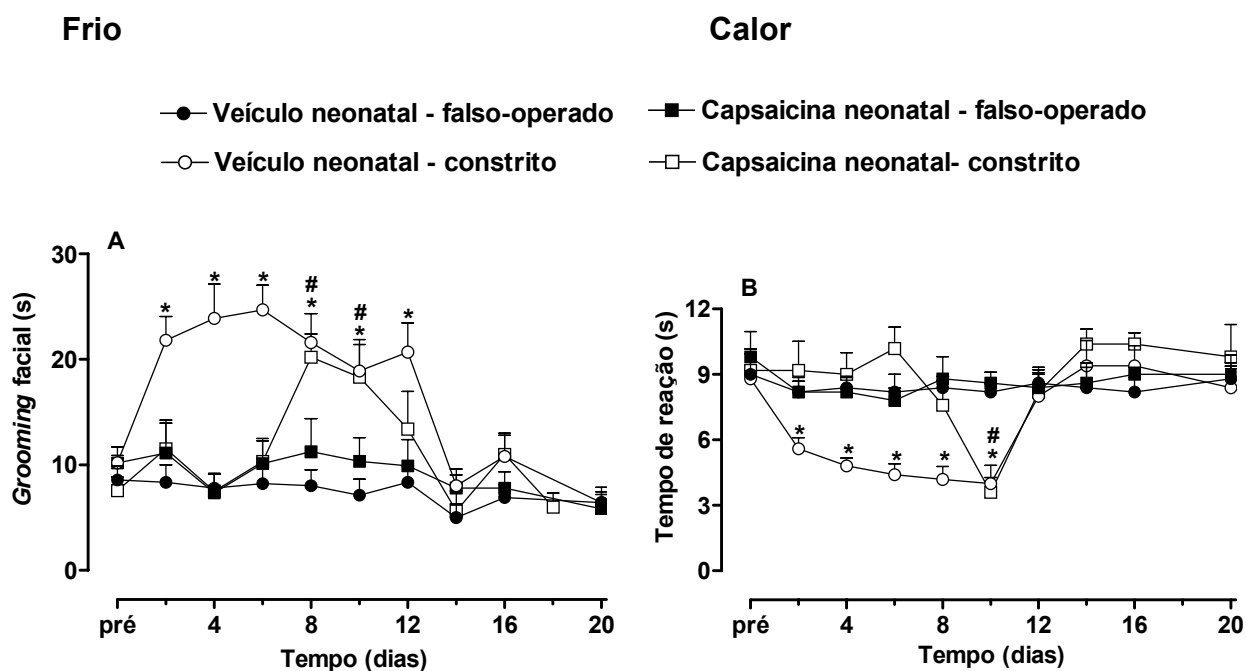
A efetividade da desnervação induzida pelo tratamento neonatal com capsaicina foi confirmada pela redução do tempo de grooming facial, induzido pela injeção de capsaicina (5  $\mu$ g/50  $\mu$ l) no lábio superior dos animais, de aproximadamente 88% em relação aos animais tratados com veículo no período neonatal (dados não mostrados).

Além de avaliar a importância das fibras C para o desenvolvimento da hipernocicepção térmica, investigamos os possíveis receptores que estariam mediando estas respostas. A Figura 5 mostra que a administração de capsaicina, agonista seletivo dos receptores TRPV1, no lábio superior de animais não operados, causa hipernocicepção ao calor, a qual é bloqueada pela desnervação neonatal dos animais, bem como pelo pré-tratamento com

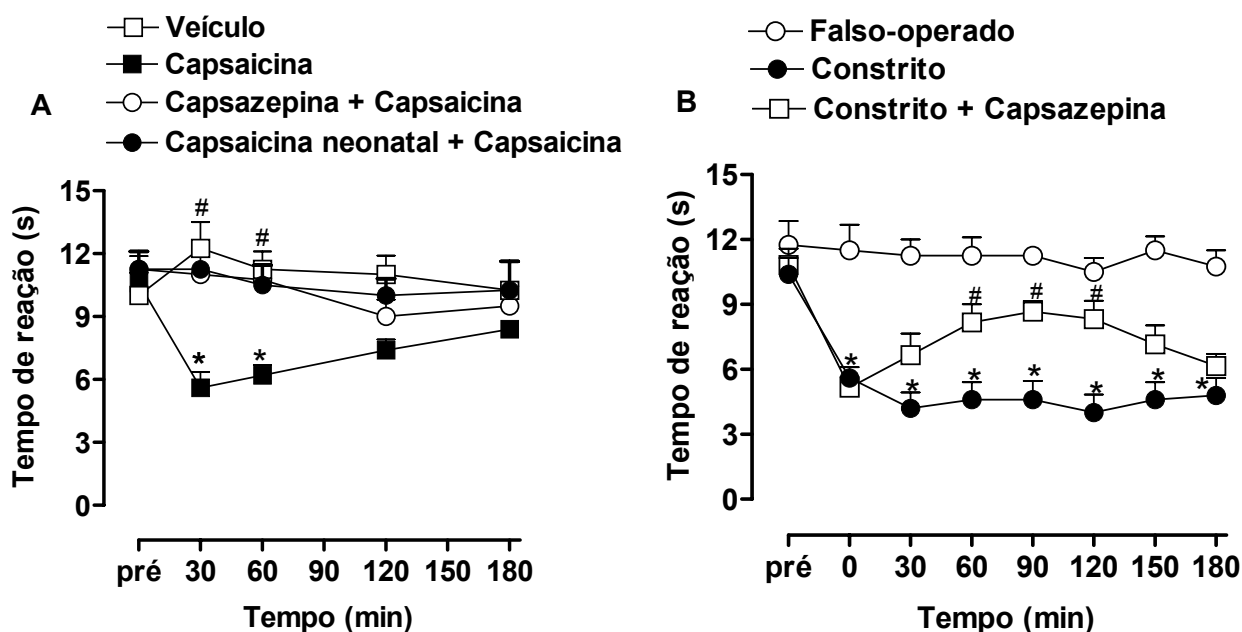
capsazepina (10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ). Adicionalmente, a capsazepina (30  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) reduziu a hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital (Figura 5B). Por outro lado, a administração de icilina (10 e 30  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ), um agonista não seletivo de receptores TRPA1, no lábio superior de ratos não operados, induziu hipernocicepção ao frio (Figura 6A), a qual foi abolida pelo tratamento neonatal com capsaicina e significativamente reduzida pelo pré-tratamento com capsazepina (Figuras 7A e 7B). Em adição, a icilina (10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) foi capaz de potencializar a hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital, enquanto que a capsazepina (30  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) aboliu esta resposta (Figura 8). No entanto, administrações repetidas de icilina (30  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) causaram redução da hipernocicepção ao frio, i.e. houve taquifilaxia à resposta (Figura 6B).

Embora se considere que receptores TRPA1 e TRPV1 sejam expressos pela mesma sub-população de neurônios sensoriais, a injeção de icilina no lábio superior não induziu hipernocicepção ao calor, assim como a injeção de capsaicina não induziu hipernocicepção ao frio. Além disso, quando co-administradas, nenhuma das duas substâncias alterou o perfil de resposta causada pela outra (dados não mostrados).

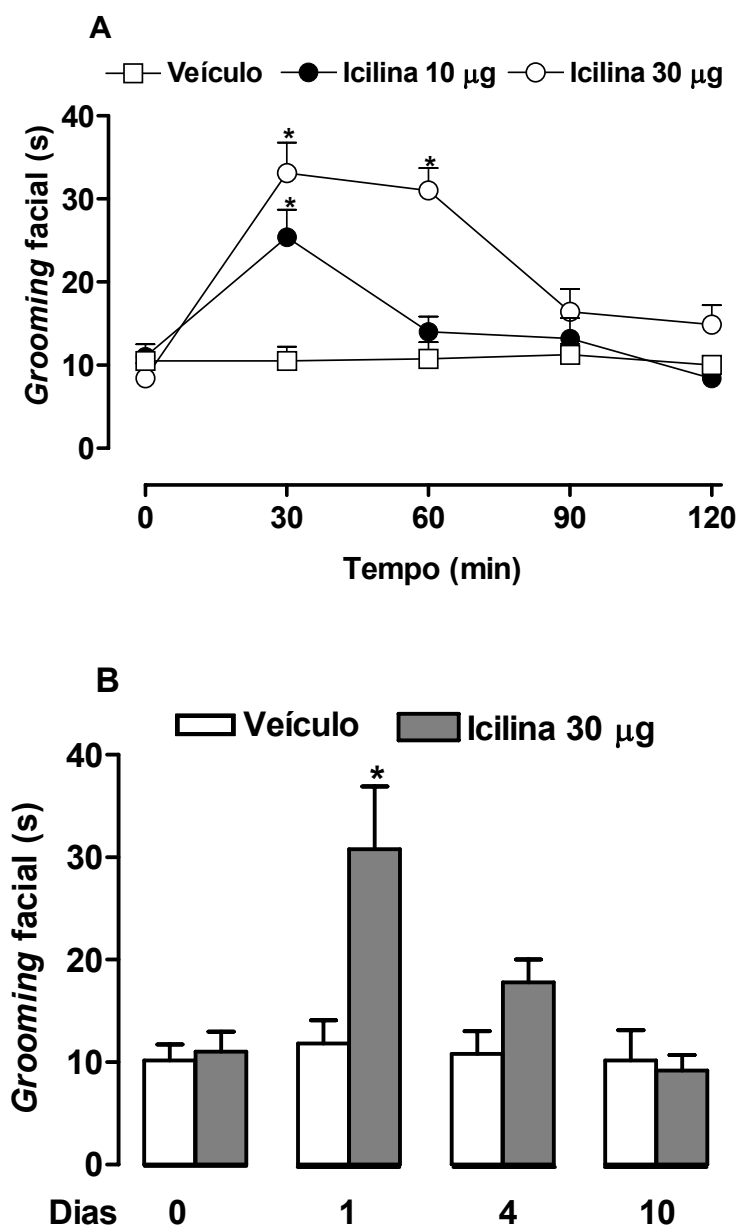




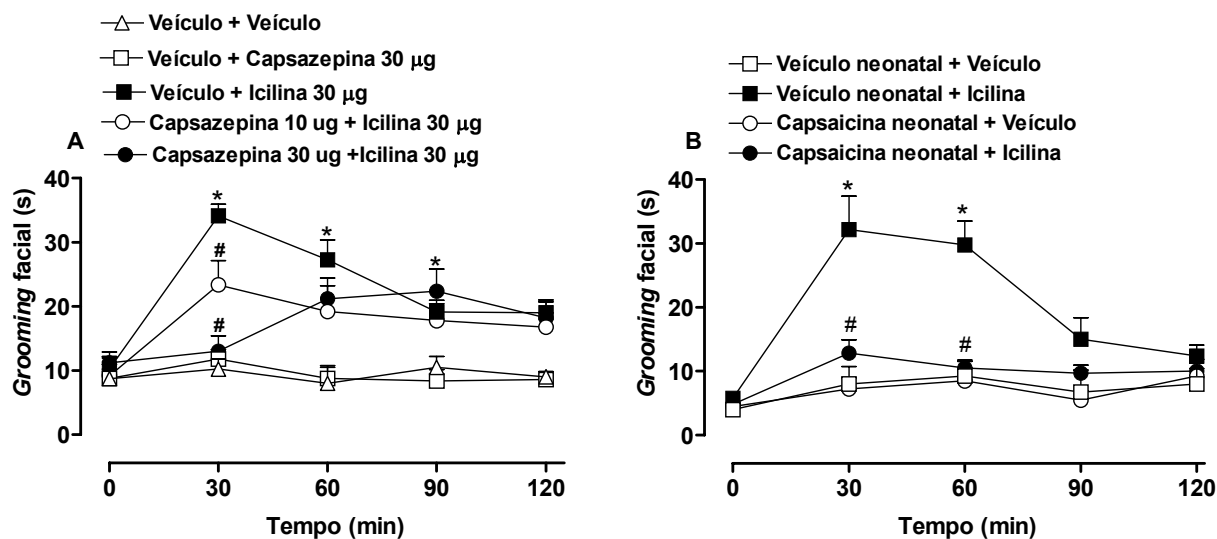
**Figura 4 – Influência do tratamento neonatal com capsaicina no decurso temporal da hipernociceção térmica em animais submetidos à constrictão do nervo infraorbital.** Ratos neonatos foram tratados com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou veículo, e submetidos quando adultos à estimulação térmica antes (pré), e em diferentes períodos após a cirurgia (grupos constricto e falso-operado). Os painéis A e B mostram o decurso temporal da hipernociceção ao frio e ao calor, respectivamente. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo que os animais despenderam executando o *grooming* facial (painel A) ou do tempo de reação ante a aplicação do calor (painel B) (n= 6 a 8 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado correspondente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



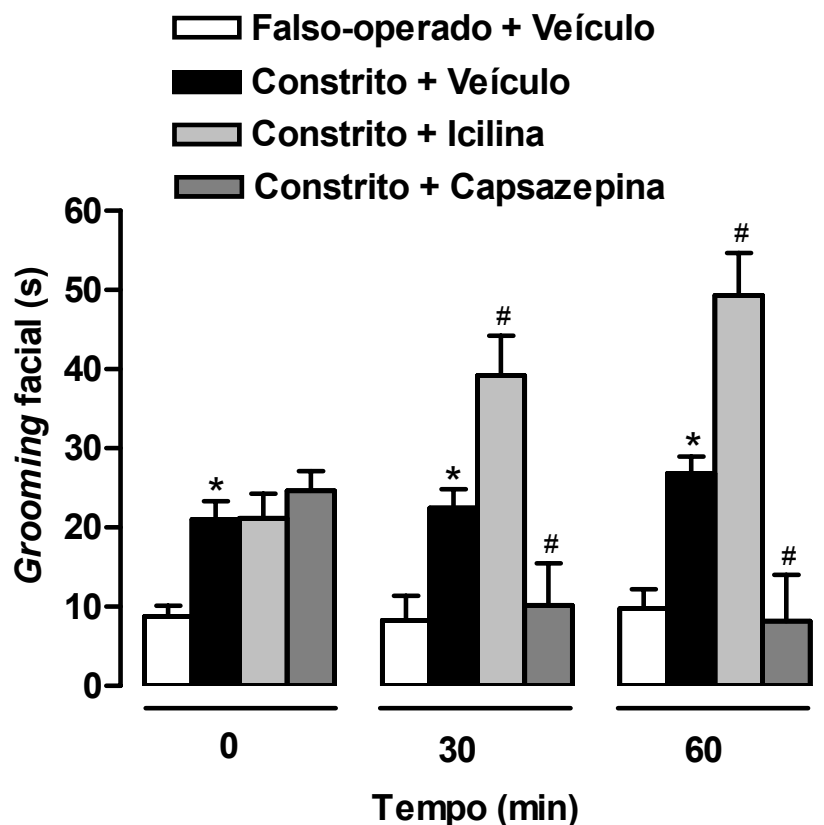
**Figura 5 – Influência da capsazepina na hipernocicepção ao calor induzida por capsaicina ou por constrição do nervo infraorbital de ratos.** No painel A, os animais foram tratados com veículo ou capsaicina no período neonatal (50 mg/kg, s.c.) ou com capsazepina (10  $\mu$ g/50  $\mu$ l, 30 min antes) e receberam uma injeção de capsaicina (0,1  $\mu$ g/50  $\mu$ l) ou veículo no lábio superior. No painel B, os animais foram tratados com capsazepina (30  $\mu$ g/50  $\mu$ l) ou veículo. Os estímulos térmicos foram aplicados antes (pré) e em diferentes períodos após os tratamentos (painel A) ou após a cirurgia (painel B). Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor (n= 5 a 6 animais por grupo). Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com veículo (painel A) ou falso-operado (painel B) e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo tratado com capsaicina (painel A) ou constrito (painel B) (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 6 - Influência da injeção local de icilina no lábio superior de ratos na hipernocicepção ao frio.** Os animais foram tratados com icilina (10 ou 30 µg/50 µl) ou veículo e submetidos à aplicação do spray de tetrafluoretano antes (tempo 0) e em intervalos de 30 min (painel A). No painel B, os mesmos animais foram tratados com veículo ou icilina (30 µg/50 µl) repetidas vezes (dias 1, 4 e 10), e o spray foi aplicado antes (dia 0) ou 30 min após cada tratamento. Os valores representam média ± e.p.m. do tempo que os animais despenderam executando o *grooming* facial durante 2 min (n= 5 animais por grupo). Asteriscos denotam P<0,05 em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



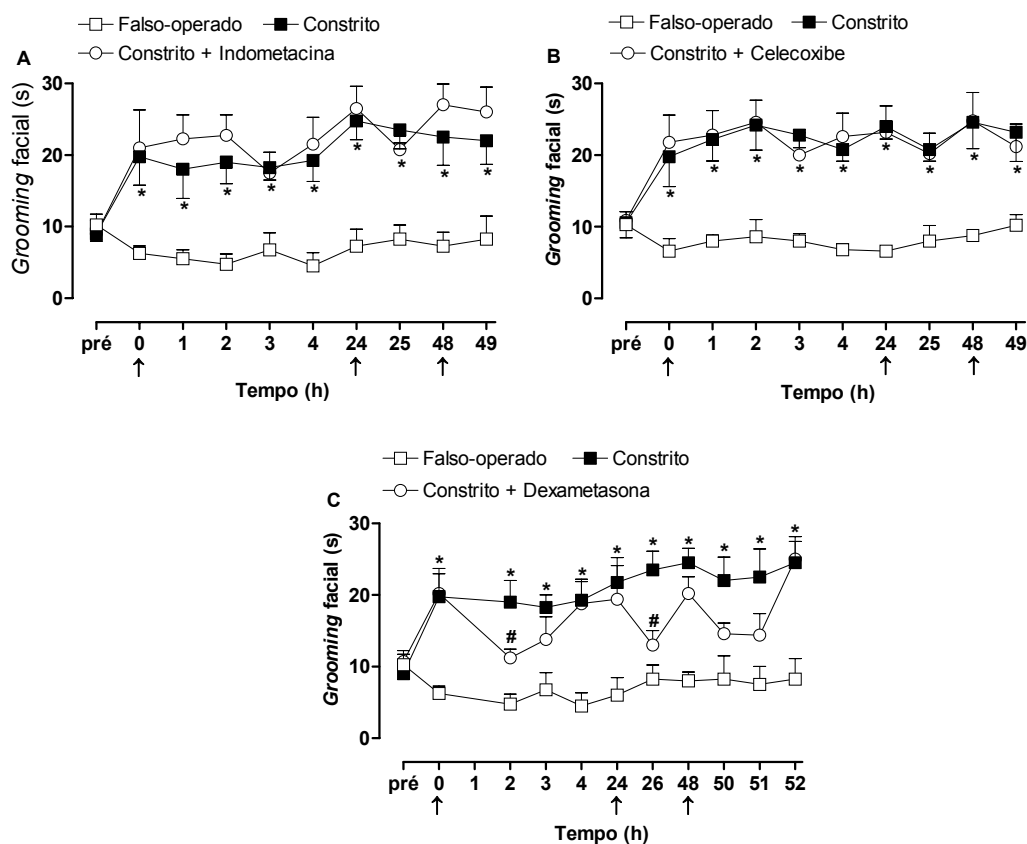
**Figura 7 – Influência do tratamento com capsazepina ou com capsaicina no período neonatal na hipernocicepção ao frio induzida por icilina.** No painel A, os animais receberam uma injeção de veículo ou capsazepina (10 ou 30 µg/50 µl) no lábio superior, e 30 min depois, receberam uma segunda injeção de veículo, capsazepina (30 µg/50 µl) ou icilina (30 µg/50 µl). No painel B, os ratos foram tratados no período neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou veículo, e quando adultos, receberam uma injeção local de veículo ou icilina (30 µg/50 µl). A estimulação térmica foi realizada antes (tempo 0) e em intervalos de 30 min após o segundo tratamento. Os valores representam média ± e.p.m. do tempo que os animais despenderam executando o *grooming* facial durante 2 min após a aplicação do spray (n= 6 a 8 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam P<0,05 em relação ao grupo controle correspondente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



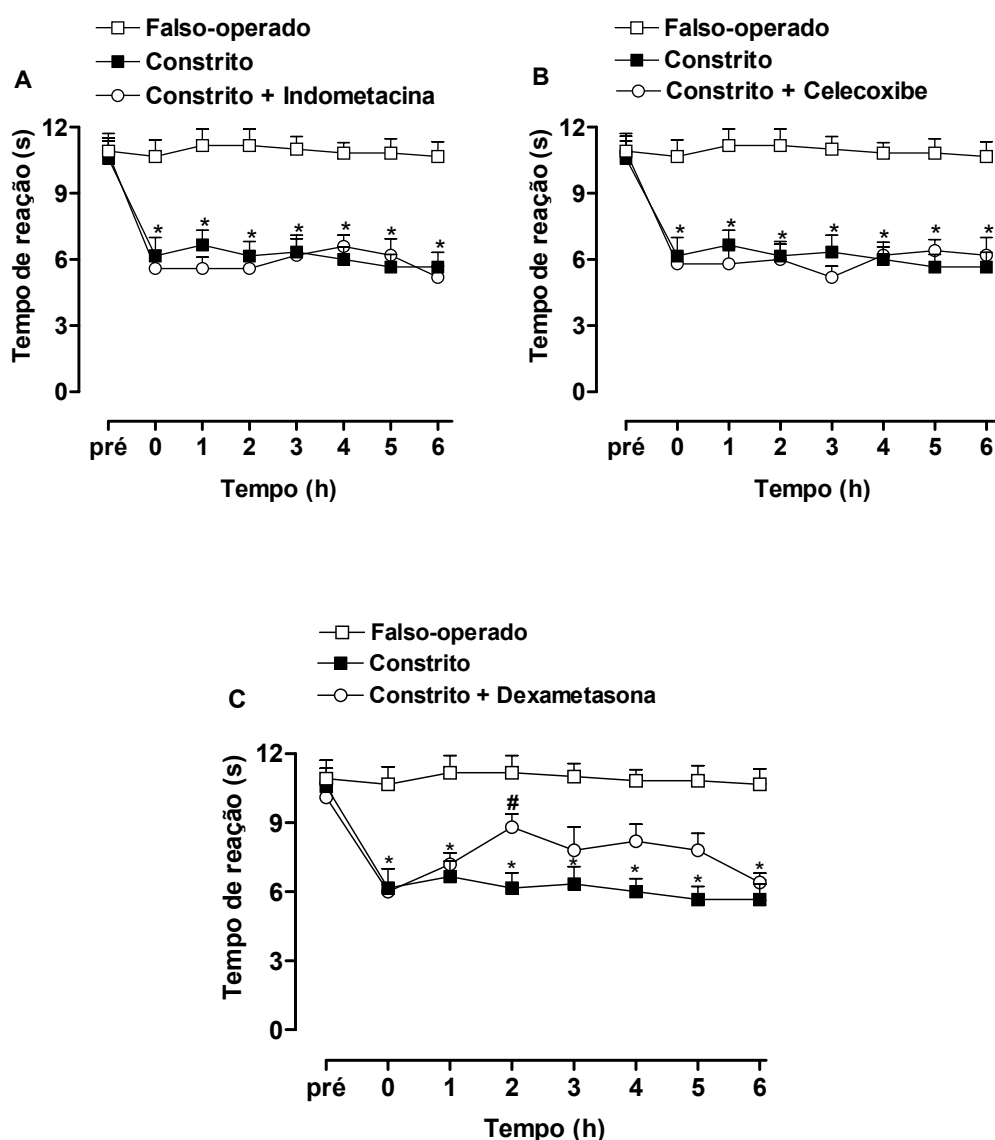
**Figura 8 – Influência do tratamento com icilina ou capsazepina na hipernociceção ao frio em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital.** Os animais receberam uma injeção de veículo, icilina (10  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) ou capsazepina (30  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ) no lábio superior. A estimulação térmica foi realizada antes (tempo 0) e em intervalos de 30 min após o tratamento. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo que os animais despenderam executando o *grooming* facial durante 2 min após a aplicação do spray (n= 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

### **4.3 Influência de diferentes tratamentos sobre a hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos no modelo de constrição do nervo infraorbital**

O tratamento dos animais com os AINEs indometacina (4 mg/kg, i.p.), ou celecoxibe (10 mg/kg, i.p.), no 4º dia após a constrição do nervo infraorbital, não influenciou a hipernocicepção ao frio, a qual foi avaliada durante 4 h após os tratamentos. A repetição destes tratamentos no 5º e no 6º dia após a cirurgia também não modificou a resposta dos animais à aplicação do spray (Figura 9A e 9B). Estes tratamentos também não modificaram a hipernocicepção ao calor, avaliada no 4º dia após a cirurgia (Figura 10A e 10 B). Por outro lado, o tratamento dos animais com o antiinflamatório esteroide dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) causou redução parcial da hipernocicepção ao frio apenas na segunda hora após a sua administração nos dias 4 e 5, e ao calor no dia 4 após a constrição (Figuras 9C e 10 C). A fim de avaliar a eficácia destes tratamentos na hipernocicepção térmica associada a uma condição inflamatória, administrou-se carragenina (50 µg/50 µl) no lábio superior de animais não operados, e as respostas à estimulação térmica foram avaliadas. A carragenina induziu hipernocicepção ao frio, a qual foi significativa apenas na 3ª e na 4ª h após sua administração. O tratamento dos animais com indometacina (4 mg/kg, i.p.) ou celecoxibe (10 mg/kg, i.p.) 2 h após a injeção local de carragenina, ou com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) 1 h após a injeção local de carragenina reduziu significativamente a hipernocicepção ao frio (Figura 11).

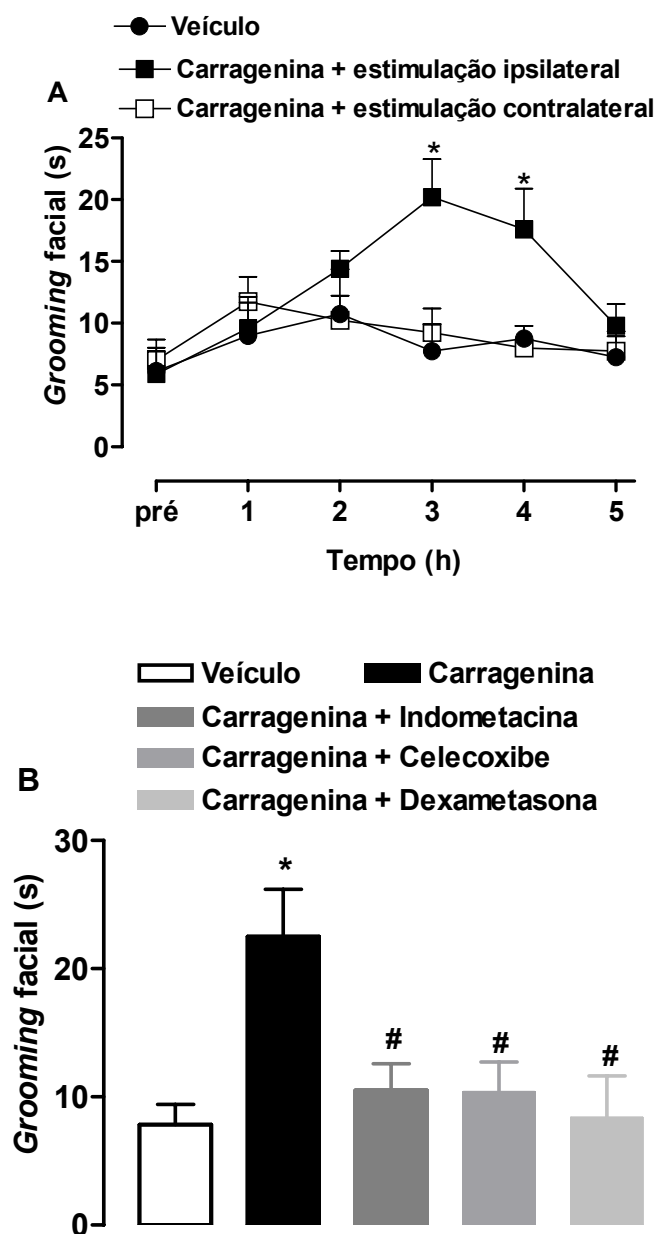


**Figura 9 – Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** Nos dias 4, 5 e 6 após a cirurgia, os animais do grupo constrito receberam doses diárias de indometacina (4 mg/kg, i.p.; painel A), celecoxibe (10 mg/kg, i.p.; painel B) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.; painel C) enquanto que, animais dos grupos controle (constrito ou falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes (nos tempos indicados pelas setas). Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial durante 2 min após a aplicação do spray, antes (pré) e em diferentes intervalos de tempo após os tratamentos (n= 5 animais por grupo). Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 10 – Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrictão do nervo infraorbital.** No 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia, os animais do grupo constricto receberam indometacina (4 mg/kg, i.p.; painel A), celecoxibe (10 mg/kg, i.p.; painel B), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.; painel C) enquanto que animais dos grupos controle (constricto ou falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes (nos tempos indicados pelas setas). Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor, antes (pré) e em diferentes intervalos de tempo após os tratamentos (n= 5 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

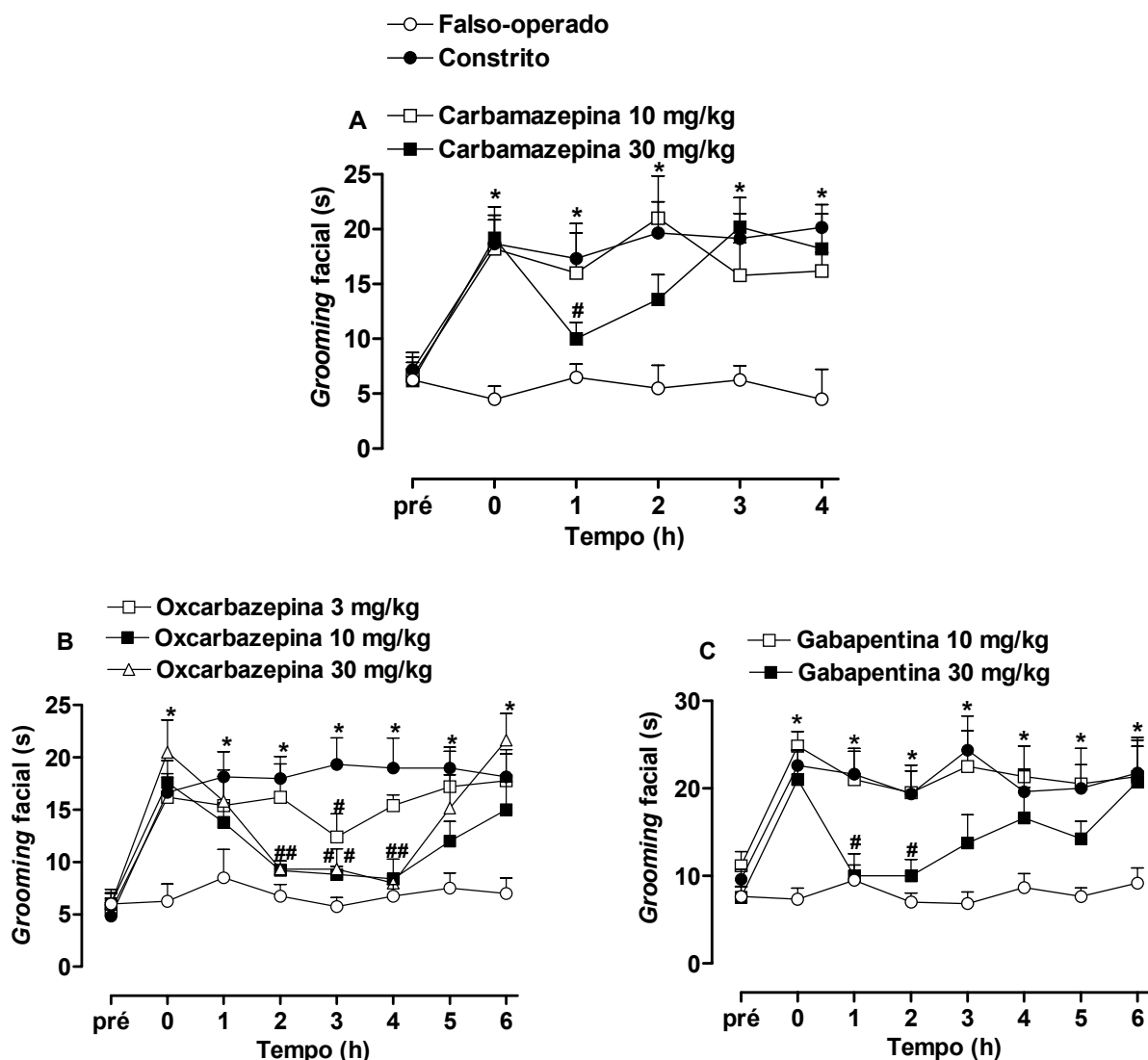




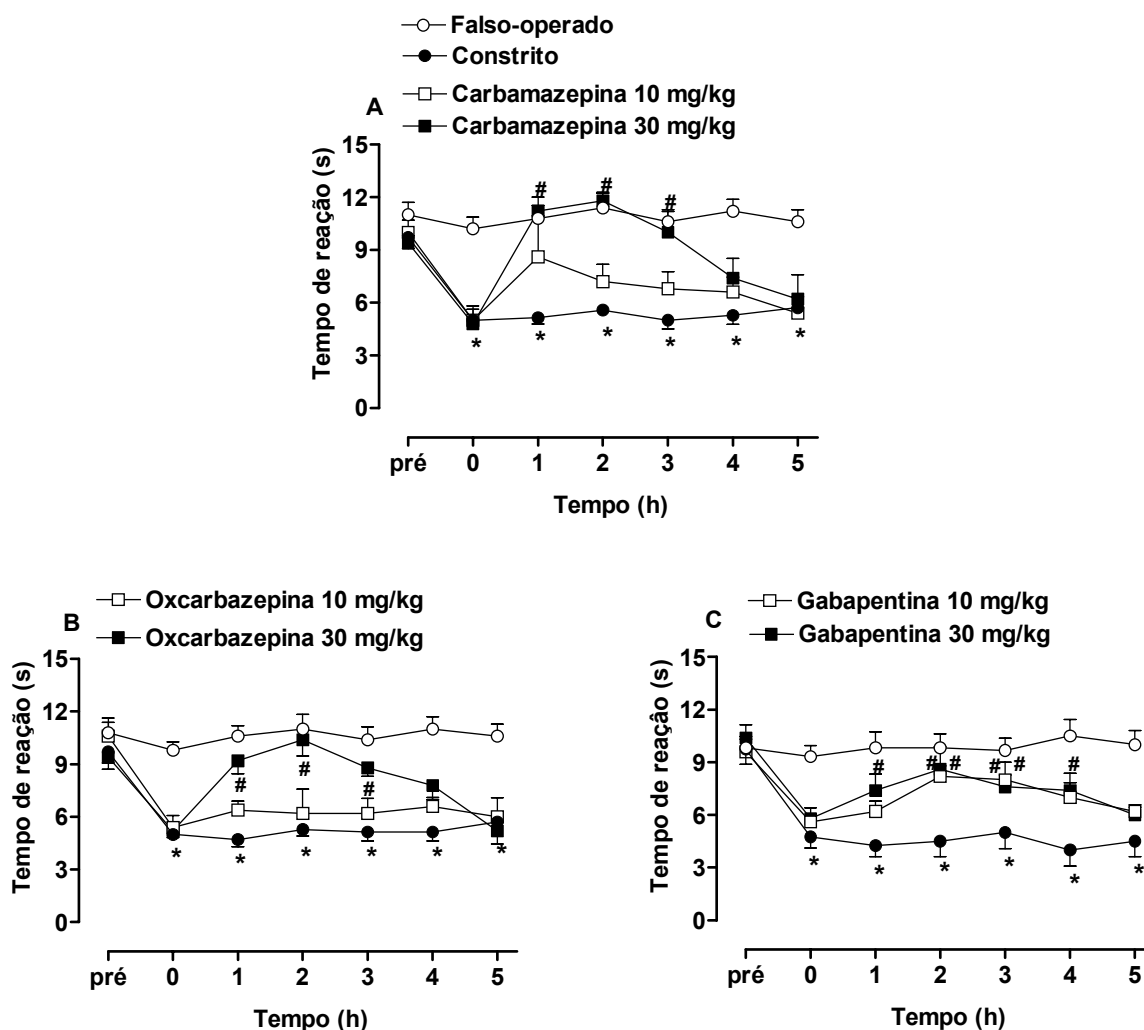
**Figura 11 – Influência do tratamento com indometacina, celecoxibe ou dexametasona na hipernocicepção ao frio induzida por carragenina.** No painel A, os animais receberam uma injeção de veículo ou carragenina (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l) no lábio superior e o estímulo frio foi aplicado em intervalos de 1 hora, nos lados ipsi- e contralateral à injeção. No painel B, os animais foram tratados com indometacina (4 mg/kg, i.p., 2 h após), celecoxibe (10 mg/kg, i.p., 2 h após), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., 1 h após) ou com os veículos correspondentes após a injeção de veículo ou carragenina (50  $\mu$ g/50  $\mu$ l) no lábio superior. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial durante 2 min após a aplicação do spray, antes (pré) e em diferentes intervalos de tempo após os tratamentos (painel A) ou 3 h após a injeção de carragenina (painel B; n= 5 a 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos que receberam veículo ou carragenina, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

Diferentemente dos AINEs, o pré-tratamento dos animais com os anticonvulsivantes carbamazepina (10 e 30 mg/kg), oxcarbazepina (3, 10 e 30 mg/kg) ou gabapentina (10 e 30 mg/kg) reduziu significativamente a hipernocicepção ao frio e ao calor em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital (Figuras 12 e 13, respectivamente). No entanto, nenhum destes tratamentos, nas doses que se mostraram mais efetivas na redução da hipernocicepção térmica, modificou de modo significativo o limiar de resposta à estimulação mecânica de animais do grupo constricto (Figura 14).

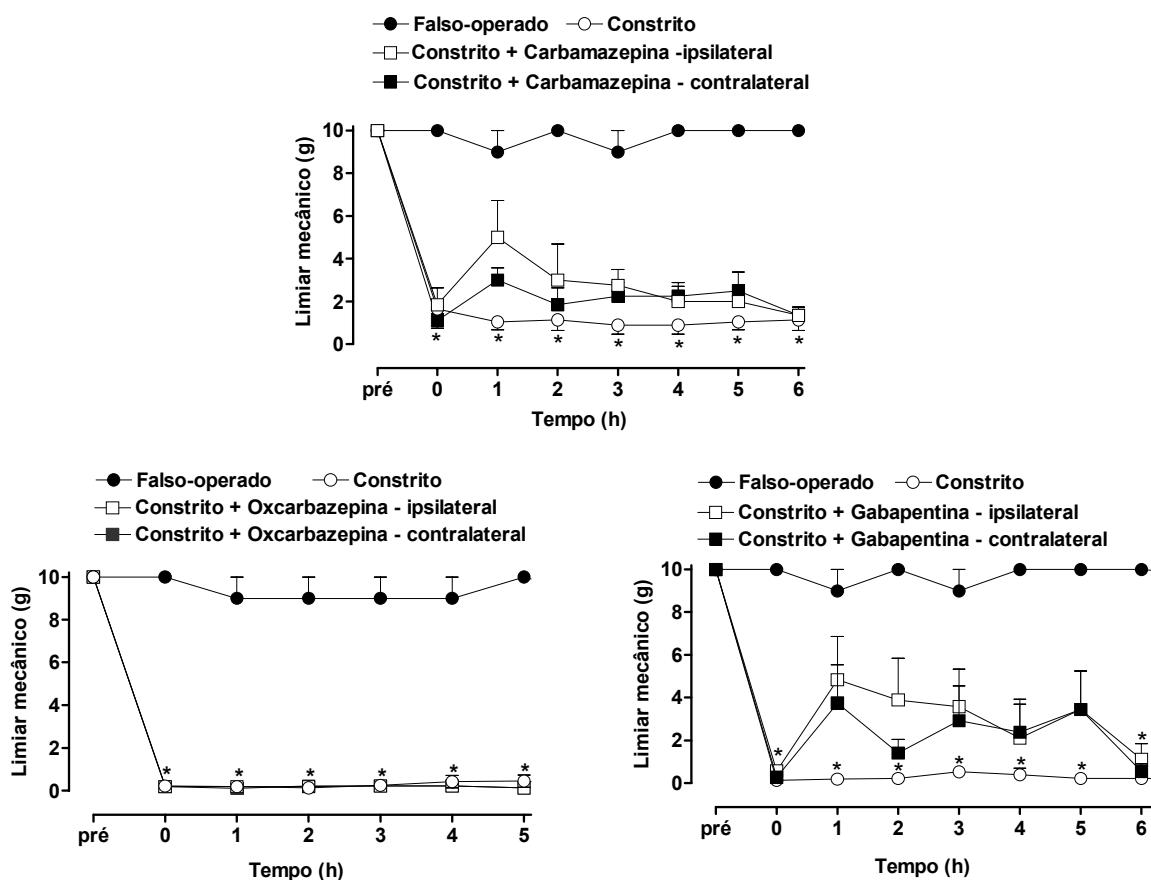
Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com cloridrato de morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou cloridrato de lidocaína (10 mg/kg, s.c.) foi capaz de reduzir significativamente, ou até mesmo bloquear totalmente, a hipernocicepção ao frio, ao calor e à estimulação mecânica, mesmo que por um breve intervalo de tempo (de 30 a 90 min). Estes resultados estão ilustrados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente.



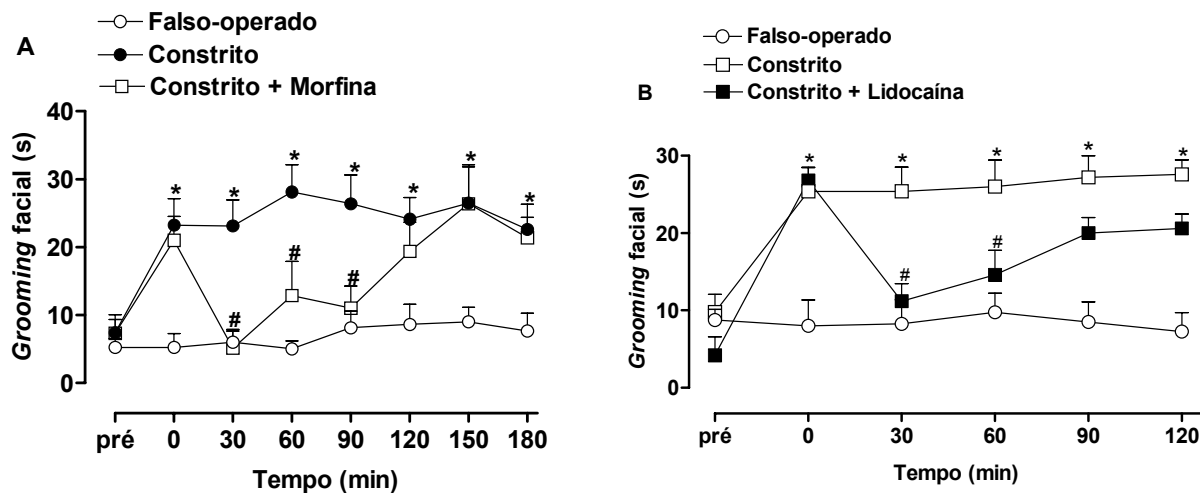
**Figura 12 – Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernociceção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais do grupo constricto foram tratados com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., painel A), oxcarbazepina (3, 10 e 30 mg/kg, s.c., painel B) ou gabapentina (10 e 30 mg/kg, i.p., painel C) e submetidos à estimulação térmica antes (pré) e em intervalos de 1 h, até no máximo 6 h, após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constricto e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial nos 2 min subseqüentes à aplicação do spray ( $n=5$  a 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P<0,05$  em relação ao grupo falso-operado e em relação ao grupo constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



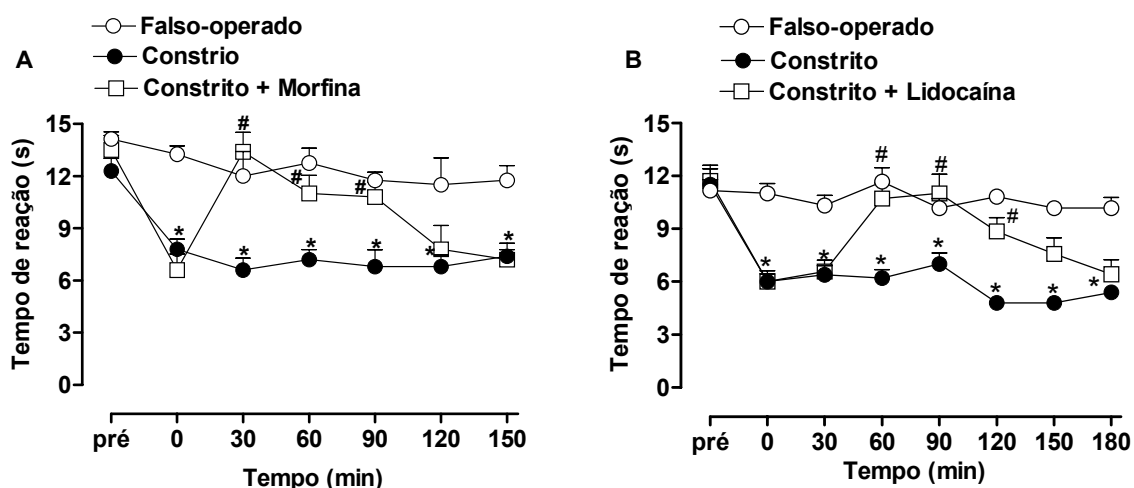
**Figura 13 – Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, animais do grupo constrito foram tratados com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., painel A), oxcarbazepina (3, 10 e 30 mg/kg, s.c., painel B) ou gabapentina (10 e 30 mg/kg, i.p., painel C) e submetidos à estimulação térmica antes (pré) e em intervalos de 1 h, até no máximo 5 h, após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor (n= 5 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado e em relação ao grupo constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



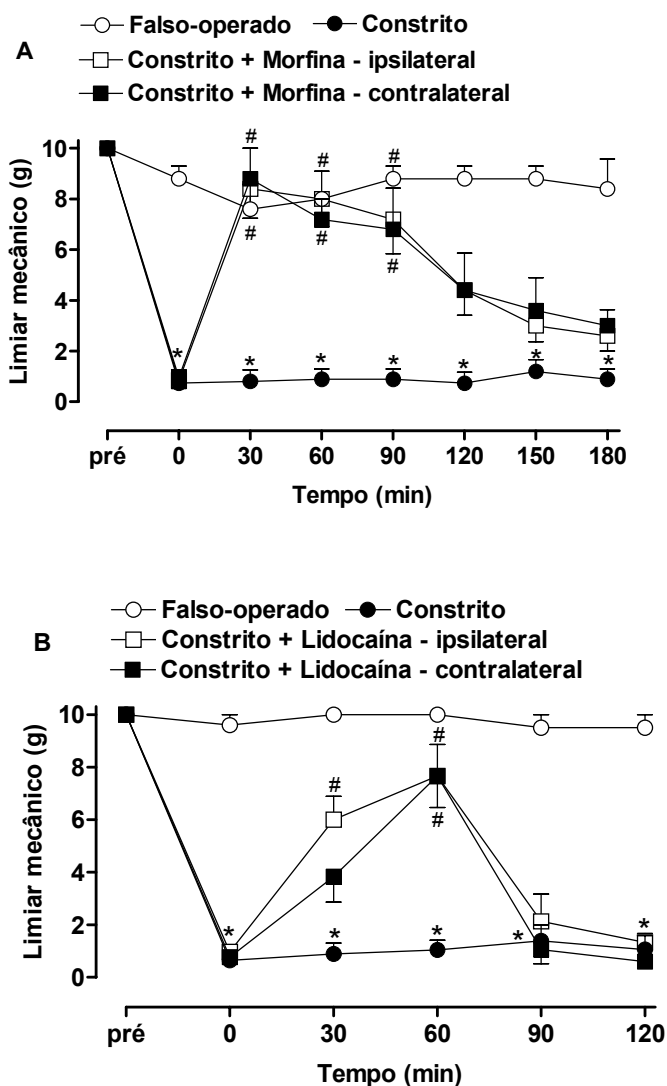
**Figura 14 – Influência do tratamento com diferentes anticonvulsivantes na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No período de 15 a 20 dias após a cirurgia, os animais foram tratados com carbamazepina (painel A), oxcarbazepina (painel B) ou gabapentina (painel C), (todos na dose de 30 mg/kg) e submetidos à estimulação mecânica antes (pré) e em intervalos de 1 h, após os tratamentos. Animais dos grupos constricto e falso-operado foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento nos lados ipsilateral ou contralateral à cirurgia (n= 6 a 8 animais por grupo). Nos grupos controle apenas os dados da estimulação ipsilateral estão apresentados. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado tratado com veículo (ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste de Mann-Whitney).



**Figura 15 – Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou de lidocaína na hipernociceção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com cloridrato de morfina (2,5 mg/kg, s.c., painel A) ou cloridrato de lidocaína (10 mg/kg, s.c., painel B) e submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min, após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial nos 2 min subseqüentes à aplicação do spray (n= 5 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 16 – Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou de lidocaína na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constrictão do nervo infraorbital.** No 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia, os animais foram tratados com cloridrato de morfina (2,5 mg/kg, s.c., painel A) ou cloridrato de lidocaína (10 mg/kg, s.c., painel B) e submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min, após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constricto e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor (n= 5 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 17 – Influência do tratamento com cloridrato de morfina ou lidocaína na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No período de 15 a 20 dias após a cirurgia, os animais foram tratados com cloridrato de morfina (2,5 mg/kg, s.c., painel A) ou cloridrato de lidocaína (10 mg/kg, s.c., painel B) e submetidos à estimulação mecânica antes (pré), e em intervalos de 30 min após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento nos lados ipsilateral ou contralateral à cirurgia ( $n=8$  animais por grupo). Nos grupos controle apenas os dados da estimulação ipsilateral estão apresentados. Asteriscos e cerquilhas denotam  $P<0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste de Mann-Whitney).



---

#### **4.4 Influência da ET-1 exógena na hipernocicepção térmica e mecânica da região orofacial**

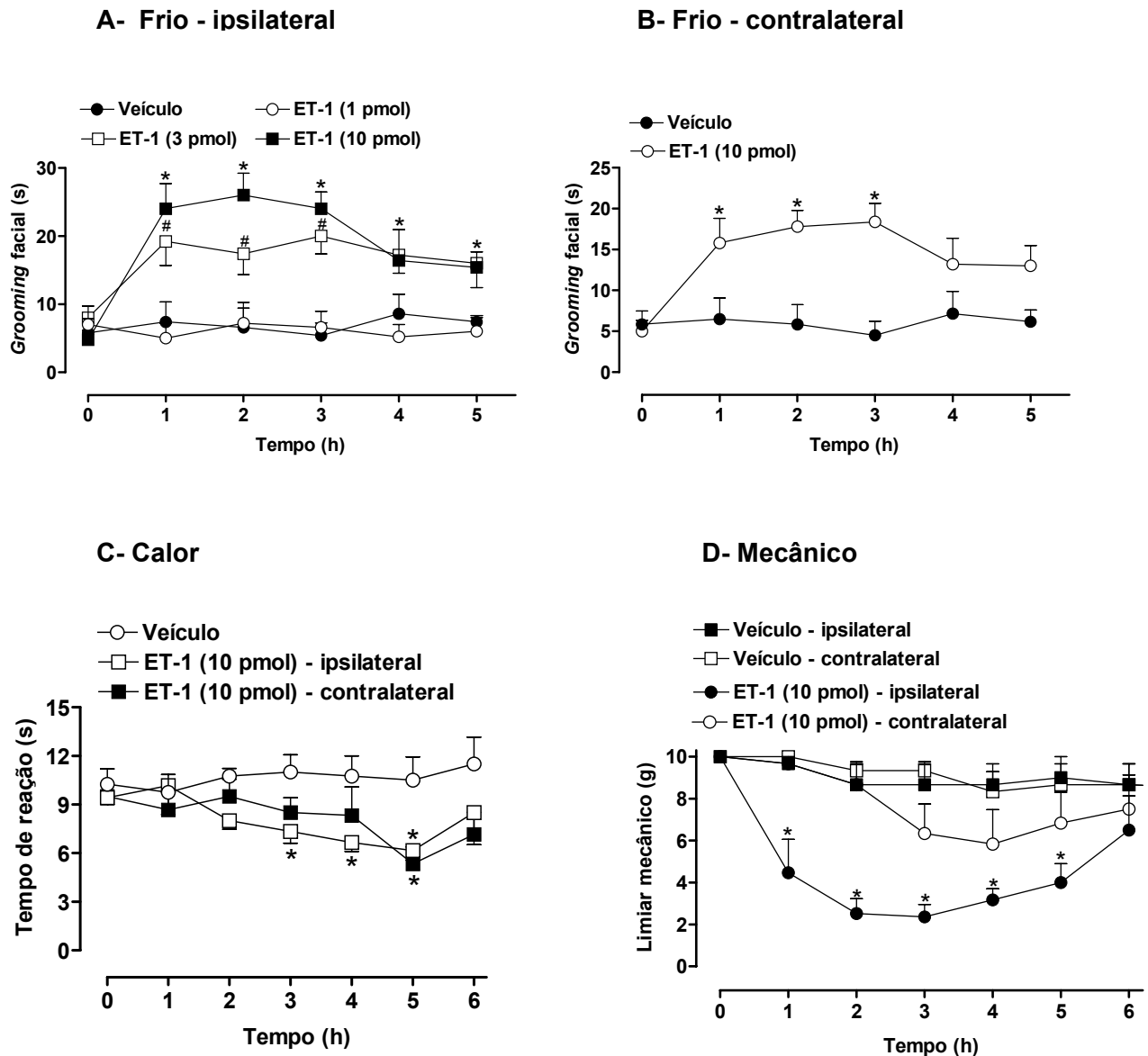
Uma vez caracterizada a resposta dos animais a estímulos mecânico, térmicos e químico aplicados na região orofacial após a constrição do nervo infraorbital, avaliou-se as possíveis alterações de responsividade de animais intactos a estes estímulos causadas por injeção local (lábio superior) de ET-1.

Neste estudo, a injeção de ET-1 (agonista dual de receptores  $ET_A/ET_B$ ; 3 e 10 pmol/50  $\mu$ l) no lábio superior de ratos não operados, induziu pronunciada hipernocicepção ao frio, a qual persistiu por pelo menos 5 h após a injeção. A ET-1 na dose de 10 pmol também foi capaz de induzir hipernocicepção ao estímulo frio aplicado no lado contralateral à injeção. Por outro lado, na dose de 1 pmol, a ET-1 não alterou significativamente o tempo de resposta dos animais (Figura 18A e 18B).

O tempo de resposta dos animais à aplicação do calor também foi alterada, em ambos os lados da face, pela injeção de ET-1 na dose de 10 pmol. No entanto o desenvolvimento da hipernocicepção ao calor foi mais tardio, sendo significativo apenas a partir da 3<sup>a</sup> h do lado ipsilateral e na 5<sup>a</sup> h no lado contralateral (Figura 18C).

Em contraste, a injeção de ET-1 na dose de 10 pmol reduziu o limiar de resposta à estimulação mecânica aplicada apenas no lado ipsilateral à injeção. Esta resposta, assim como a resposta ao frio, persistiu por aproximadamente 5 h (Figura 18D).

Resultados prévios demonstraram que a ET-1 (10 pmol) injetada no lábio superior de animais não operados foi capaz de potencializar ambas as fases da resposta à formalina orofacial (Chichorro et al., dados não publicados).

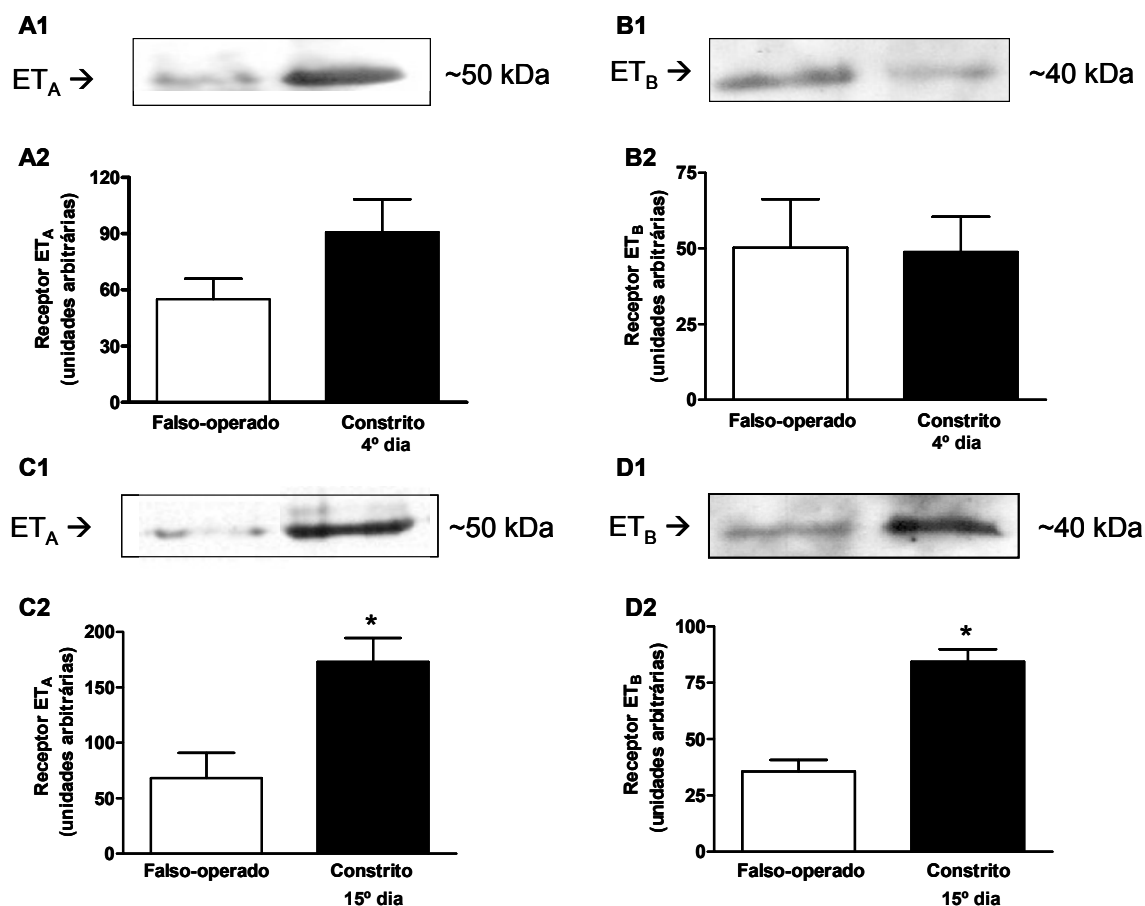


**Figura 18 - Influência da ET-1 exógena na hipernocicepção térmica e mecânica em ratos não operados.** Os animais receberam uma injeção de ET-1 (1 a 10 pmol/50  $\mu$ l) ou veículo no lábio superior e foram submetidos à estimulação térmica ou mecânica antes (tempo 0) e em intervalos de 1 h após os tratamentos. Nos painéis A e B, os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial em respostas à aplicação do frio no lado ipsilateral e contralateral à cirurgia, respectivamente. Nos painéis C e D, os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor ou, da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento, respectivamente (n= 5 a 8 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos animais tratados com veículo (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls, ou ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste de Mann-Whitney).

---

#### **4.5 Expressão dos receptores de endotelina ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos e alterações induzidas por constrição do nervo infraorbital.**

A análise por *Western Blot* revelou a presença de bandas referentes aos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em gânglios do trigêmeo coletados de tanto em animais falso-operados quanto nos constritos. Embora os ensaios realizados no 4º dia após a cirurgia sugiram um aumento na expressão de receptores ET<sub>A</sub> em animais constritos em relação aos falso-operados, a análise densitométrica das bandas falhou em revelar uma diferença significativa (Figura 19, painéis A1 e A2), a exemplo do que foi verificado para a expressão de receptores ET<sub>B</sub> (Figura 19, painéis B1 e B2). Por outro lado, em gânglios do trigêmeo removidos 15 dias após a cirurgia, a análise das bandas sugere aumento significativo na expressão de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> de animais constritos em relação aos falso-operados (Figura 19, painéis C1 e D1). A análise densitométrica das bandas demonstra claramente este aumento, o qual é estatisticamente significativo para ambos os receptores (Figura 19, painéis C2 e D2).



**Figura 19 – Influência da constrição do nervo infraorbital na expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> de endotelinas no gânglio do trigêmeo de ratos.** No 4º ou no 15º dia após a cirurgia, os animais foram sacrificados, os gânglios do trigêmeo do lado ipsilateral à cirurgia foram removidos e processados para *Western Blot*. Quantidades equivalentes de proteína (50 µg/poço) foram separadas por eletroforese e depois transferidas do gel de poliácridamida para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos policlonais para receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e depois incubadas por 1 h com o anticorpo secundário acoplado a peroxidase. As bandas específicas foram visualizadas pelo método de quimioluminescência. Os painéis A1-D1 são representativos da imunodeteção dos níveis dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em ratos falso-operados e constritos. Os painéis A2-D2 representam a quantificação das proteínas obtidas por densitometria. Cada barra representa a média ± e.p.m. de 4 a 5 experimentos. Asteriscos denotam P<0,05 em relação ao grupo falso-operado (Teste t de *Student*).

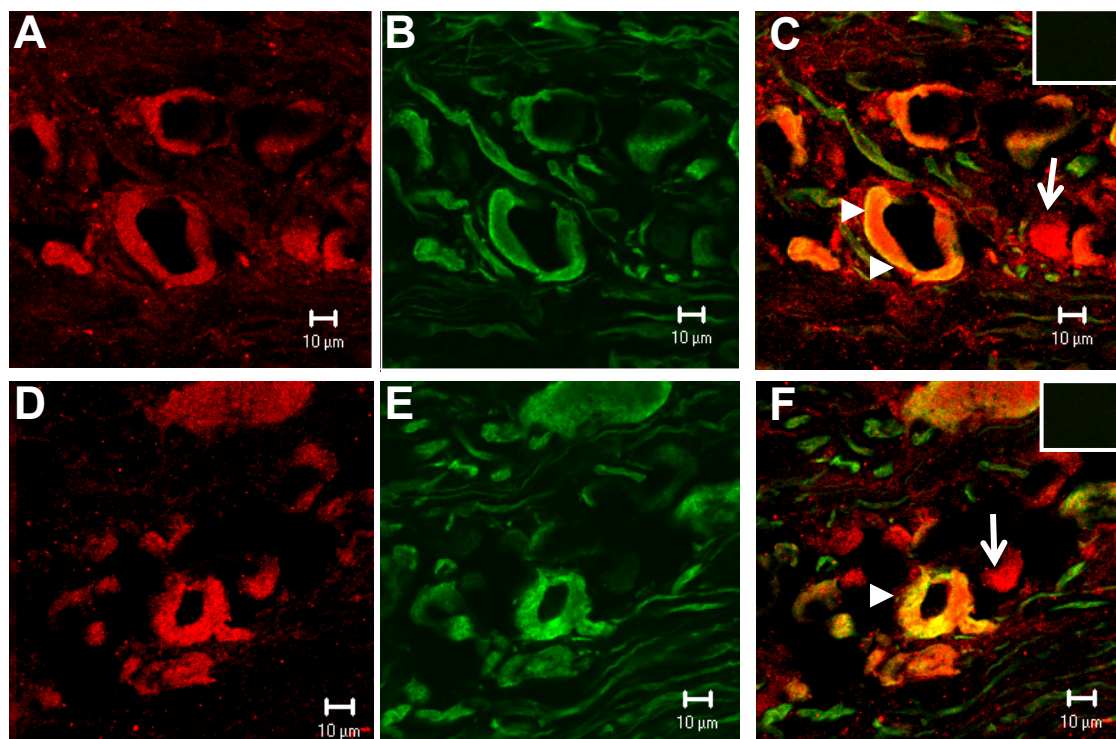
#### **4.6 Distribuição dos receptores de endotelina ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> no gânglio do trigêmeo de ratos.**

A fim de determinar a localização precisa dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> que estariam mediando tanto a hipernocicepção induzida pela ET-1 exógena, bem como possíveis ações das endotelinas endógenas na dor neuropática, os gânglios do trigêmeo de ratos controle (intactos ou falso-operados) e constrictos foram processados para análise imunohistoquímica destas proteínas, e visualizados por microscopia confocal.

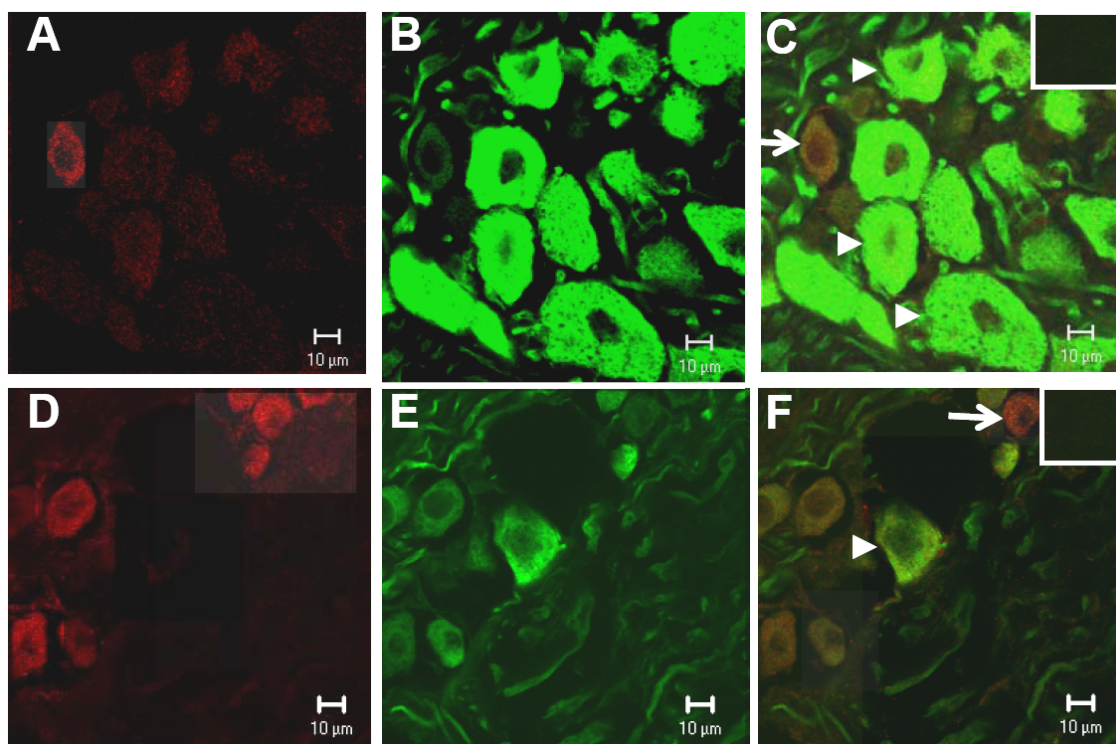
Como ilustrado na Figura 20, os receptores ET<sub>A</sub> são expressos por células imunoreativas para NF-200, um marcador de fibras mielinizadas, em gânglios de animais dos grupos controle e constricto. Em contraste, não foi observada co-localização entre receptores do tipo ET<sub>B</sub> e fibras mielinizadas no gânglio do trigêmeo em nenhum dos grupos de animais (Figura 21). Em adição, a análise das imagens dos painéis B e E da Figura 20, mas principalmente da Figura 21, mostra imunoreatividade muito menos intensa para NF200 nos gânglios dos animais constrictos em relação ao controle.

Em gânglios do trigêmeo de animais do grupo controle é observada intensa imunoreatividade tanto para receptores do tipo ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> quanto para IB4, um marcador de fibras C não peptidérgicas, e a co-localização entre estas duas marcações é nítida (Figuras 22 e 23, painéis A, B e C). No entanto, a imunoreatividade para IB4 e para ambos os receptores é substancialmente reduzida em animais dos grupos constrictos, e a co-localização entre estas duas marcações, se presente, parece restrita a apenas alguns pontos (Figuras 22 e 23, painéis D, E e F).

Não foi identificada imunoreatividade para receptores ET<sub>A</sub> em células imunoreativas para GFAP, um marcador de células satélites da glia, tanto em animais constrictos quanto em animais do grupo controle (Figura 24). Por outro lado, células imunoreativas para GFAP também apresentaram imunoreatividade para receptores ET<sub>B</sub>, e o perfil de marcação foi semelhante nos grupos controle e constricto (Figura 25).

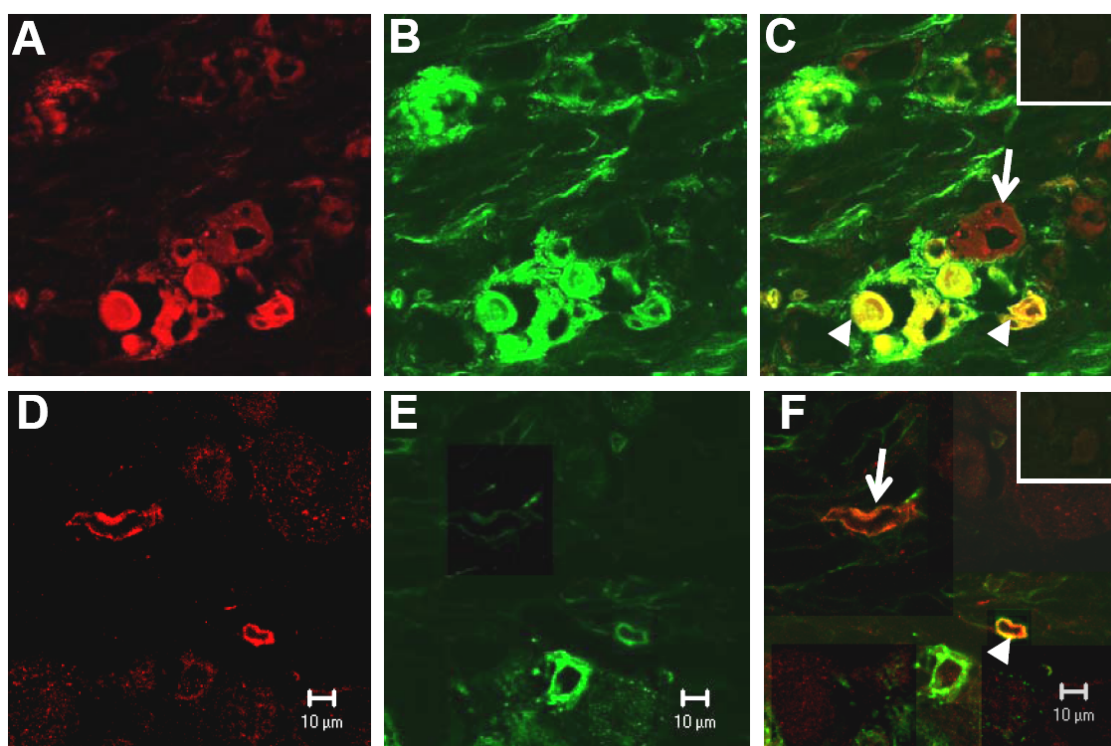


**Figura 20 – Receptores ET<sub>A</sub> são expressos por fibras mielinizadas do gânglio do trigêmeo de ratos.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>A</sub> (vermelho), para NF-200 (marcador de fibras mielinizadas, verde) e áreas de co-localização (amarelo), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos obtidos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>A</sub> pode ser observada em células imunoreativas (cabeças das setas) e não imunoreativas para NF200 (setas, painéis C e F). As inserções nos cantos superiores direitos dos painéis C e F mostram a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).

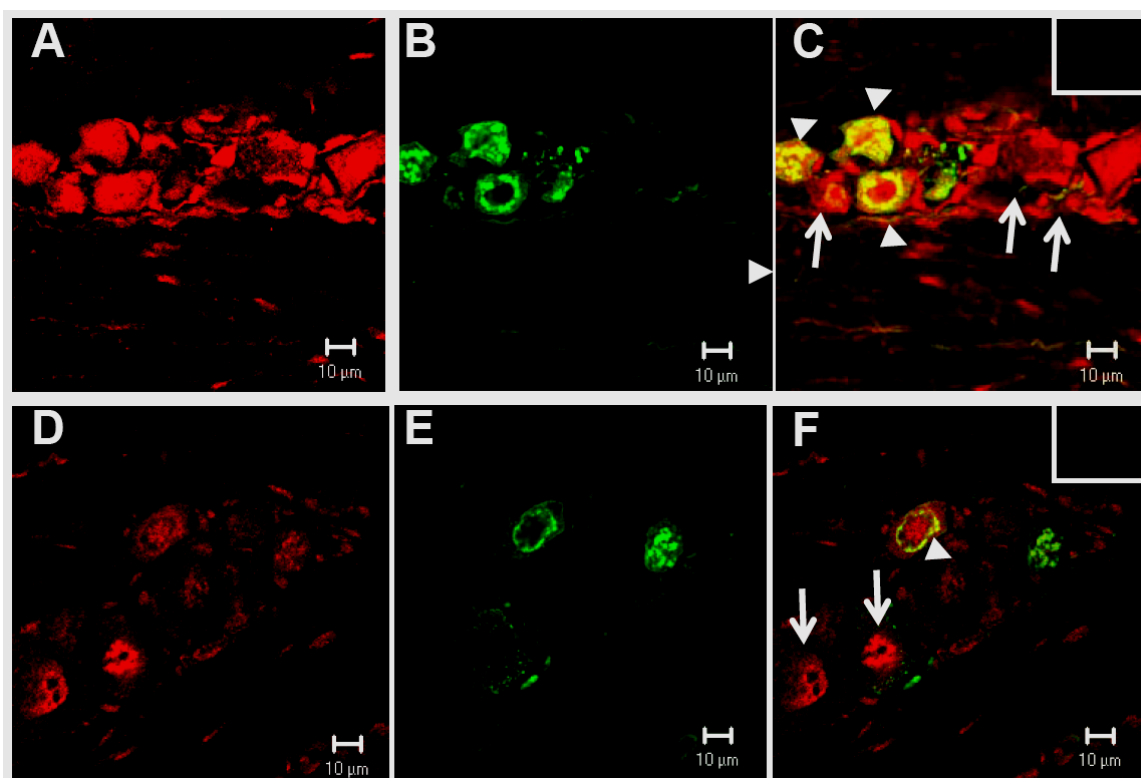


**Figura 21 – Fibras mielinizadas do gânglio do trigêmeo não expressam receptores do tipo ET<sub>B</sub>.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>B</sub> (vermelho) e para NF-200 (marcador de fibras mielinizadas, verde), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>B</sub> (setas) não é observada em células imunoreativas para NF200 (cabeças das setas, painéis C e F). As inserções nos cantos superiores direitos dos painéis C e F mostram a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).

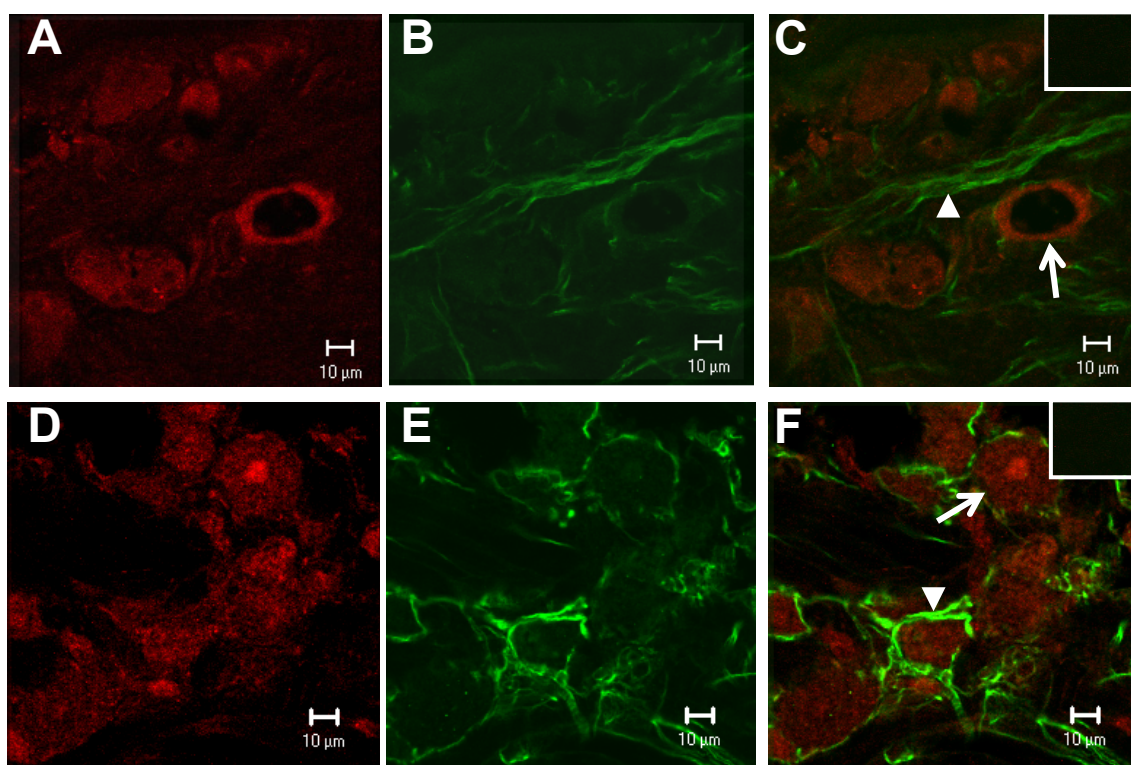




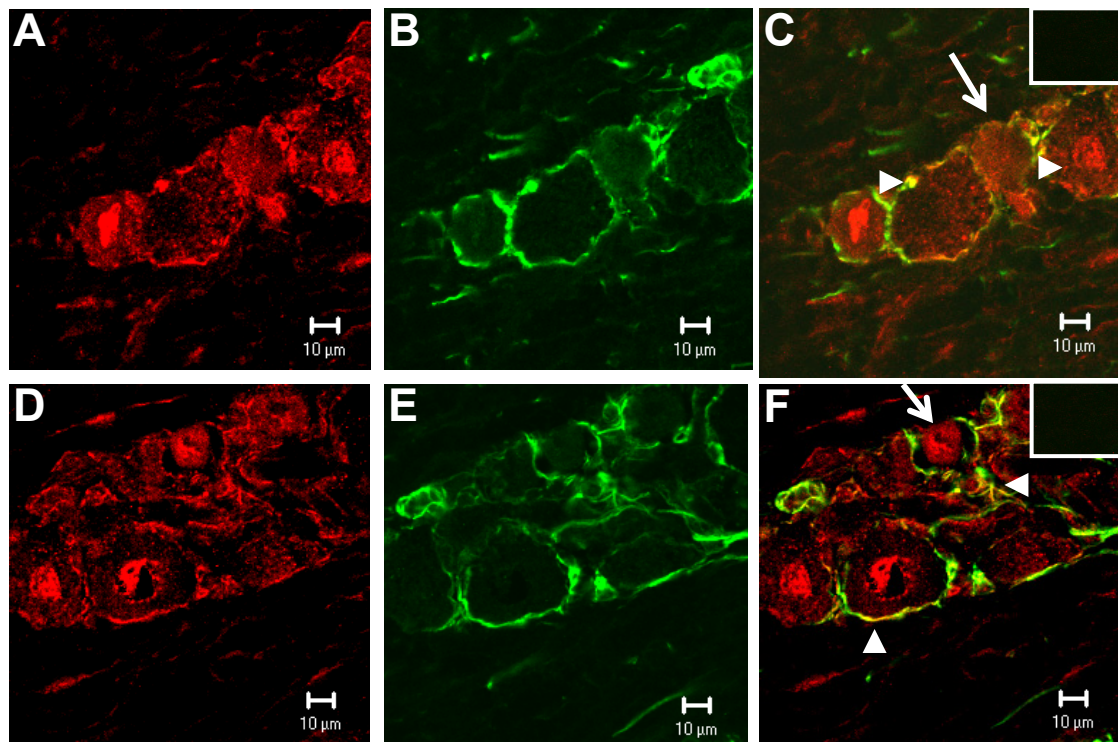
**Figura 22 – Receptores ET<sub>A</sub> são expressos por uma subpopulação de fibras de pequeno diâmetro do gânglio do trigêmeo de ratos.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>A</sub> (vermelho), para IB4 (verde, marcador de fibras C não peptidérgicas) e áreas de co-localização (amarelo), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>A</sub> pode ser observada em células imunoreativas (cabeças das setas) e não imunoreativas para IB4 (setas, painéis C e F). Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).



**Figura 23 – Receptores ET<sub>B</sub> são expressos por uma subpopulação de fibras de pequeno diâmetro do gânglio do trigêmeo de ratos.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>B</sub> (vermelho), para IB4 (marcador de fibras C não peptidérgicas, verde) e áreas de co-localização (amarelo), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>B</sub> pode ser observada em células imunoreativas (cabeças das setas) e não imunoreativas para IB4 (setas, painéis C e F). As inserções nos cantos superiores direitos dos painéis C e F mostram a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).



**Figura 24 – Células da glia do gânglio do trigêmeo não expressam receptores do tipo ET<sub>A</sub>.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>A</sub> (vermelho) e para GFAP (marcador de células satélites da glia, verde), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>A</sub> (setas) não é observada em células imunoreativas para GFAP (pontas das setas, painéis C e F). As inserções nos cantos superiores direitos dos painéis C e F mostram a imagem relativa à incubação de um gânglio apenas com anticorpos secundários, a fim de demonstrar a especificidade da marcação. Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).



**Figura 25 – Receptores ET<sub>B</sub> estão presentes em células da glia do gânglio do trigêmeo.** Os gânglios do trigêmeo de animais intactos, falso-operados e constrictos foram removidos, processados para imunohistoquímica, e as imagens visualizadas por microscopia confocal. Os painéis A, B e C mostram células imunoreativas para os receptores ET<sub>B</sub> (vermelho), para GFAP (marcador de células satélites da glia, verde) e áreas de co-localização (amarelo), respectivamente, em gânglios de animais controle. Os painéis D, E e F mostram a mesma seqüência de marcação em gânglios de animais constrictos no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Imunoreatividade para receptores ET<sub>B</sub> pode ser observada em áreas imunoreativas (setas) e não imunoreativas para GFAP (pontas das setas, painéis C e F). Imagens representativas da secção de um gânglio de animais do grupo controle ou constricto (aumento de 63 x, escala 10 μm).

---

#### **4.7 Influência do tratamento com antagonistas de receptores de endotelina ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na hipernociceção a estímulos térmicos, mecânicos e químicos causada por constrição do nervo infraorbital.**

A injeção s.c. local dos antagonistas peptídicos seletivos de receptores ET<sub>A</sub> (BQ-123; 3, 10 e 30 nmol/50 µl) ou ET<sub>B</sub> (BQ-788; 3, 10 e 30 nmol/50 µl) reduziu, de maneira dependente da dose, a hipernociceção ao frio, em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital (Figura 26A e 26B). Nenhum dos antagonistas foi efetivo quando injetado isoladamente na dose de 3 nmol. No entanto, quando co-administrados, nesta mesma dose, reduziram a hipernociceção aos 30 min, e na dose de 10 nmol, causaram efeito mais prolongado que os das suas administrações isoladas (de 60 para 90 min; Figura 26C).

A administração sistêmica dos antagonistas não peptídicos seletivos de receptores ET<sub>A</sub> (atrasentan, 3 e 10 mg/kg) ou ET<sub>B</sub> (A-192621, 5 e 20 mg/kg) também reduziu a hipernociceção ao frio (Figura 27A e 27B). A inibição obtida com a maior dose de atrasentan se estendeu de 30 até 150 min após sua administração, enquanto que o efeito inibitório do A-192621 só foi significativo entre 30 e 90 min. Por outro lado, a administração sistêmica do antagonista dual de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> (bosentan, 10 mg/kg), aboliu a hipernociceção ao frio, a partir da 1ª hora e até a 6ª hora após sua administração (Figura 27C).

O tratamento dos animais com BQ-123 ou BQ-788 (ambos na dose de 10 nmol/50 µl) também reduziu a hipernociceção ao calor, avaliada no 4º dia após a cirurgia. No entanto, esta redução só foi significativa decorridos 60 min dos tratamentos (Figura 28A e 28B). A co-administração destes antagonistas,

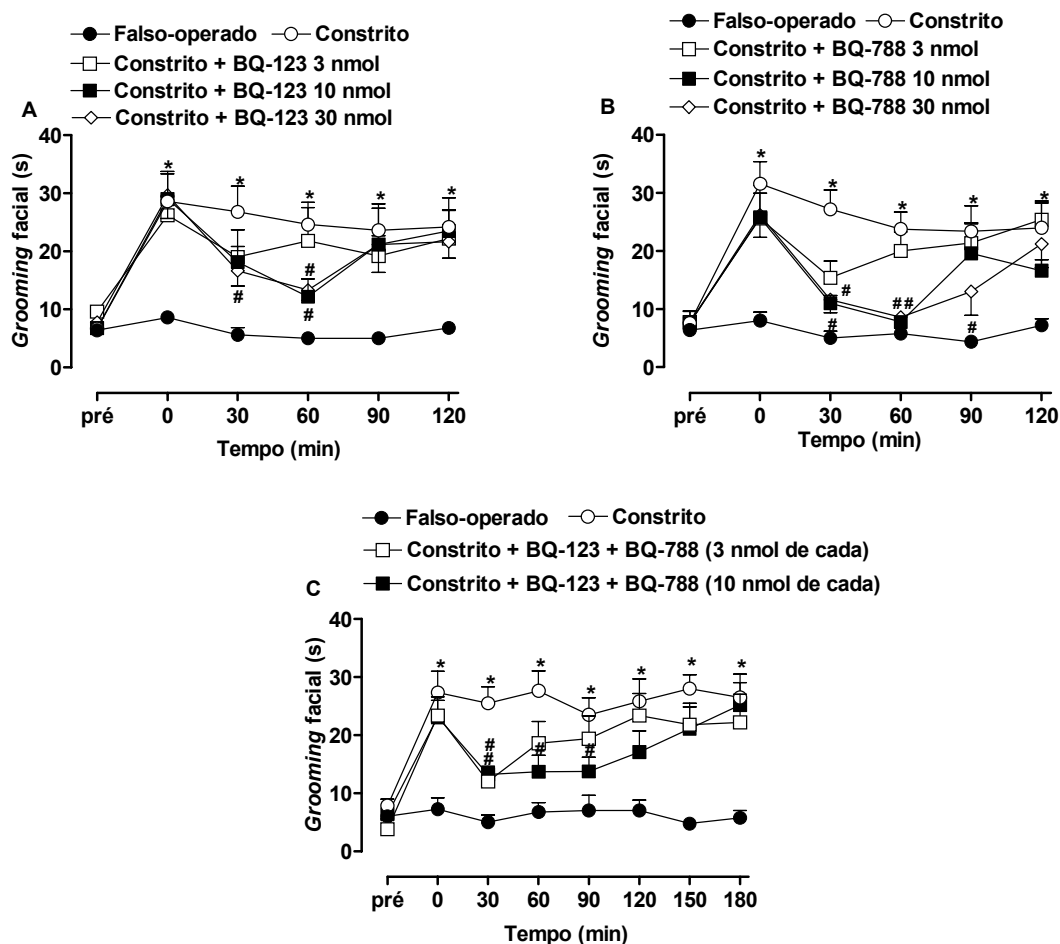
---

na dose de 10 nmol, causou um efeito mais prolongado que os verificados após suas administrações isoladas (de 30 para 90 min; Figura 28C).

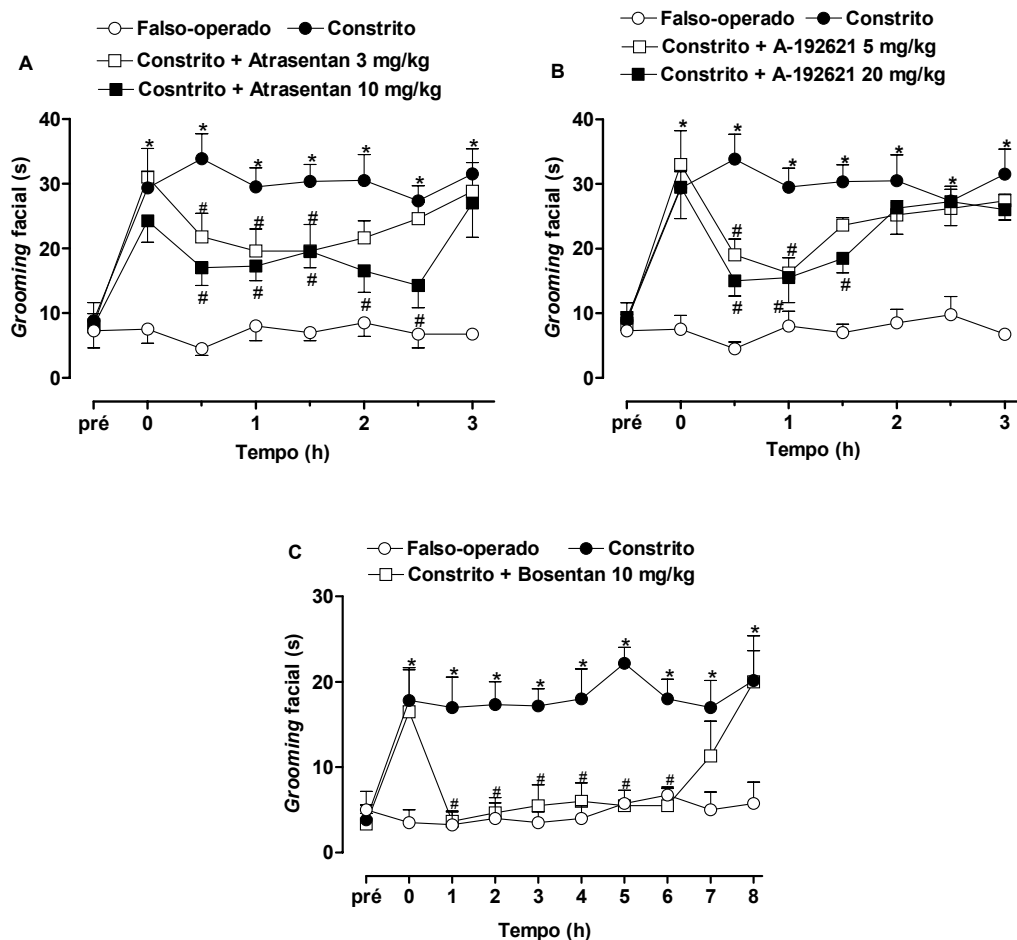
Os efeitos inibitórios do atrasentan (10 mg/kg) e do A-192621 (20 mg/kg) foram ainda mais pronunciados na hipernocicepção ao calor, tanto em termos de magnitude, quanto de duração (de 30 min até ~3 h, Figura 29A e 29B). No entanto, o tratamento com bosentan só resultou em redução significativa da hipernocicepção a partir de 2 h após sua administração, que se estendeu até a 4<sup>a</sup> hora (Figura 29C).

Na hipernocicepção mecânica, avaliada de 15 a 20 dias após a cirurgia, o tratamento com atrasentan (10 mg/kg) não causou alterações significativas do limiar de resposta dos animais, enquanto que o A-192621 (20 mg/kg) causou um aumento significativo do limiar na 2<sup>a</sup> e na 3<sup>a</sup> h após sua administração, tanto no lado ipsilateral quanto contralateral (Figura 30A e 30B, respectivamente). Surpreendentemente, o tratamento dos animais com bosentan (10 ou 20 mg/kg, apenas os dados com a maior dose são mostrados na Figura 30) ou a co-administração de atrasentan e A-192621 (10 e 20 mg/kg, respectivamente) não reduziu a hipernocicepção mecânica (Figura 30).

Em contraste, o tratamento dos animais com atrasentan (10 mg/kg), mas não com A-192621 (20 mg/kg), reduziu a fase II do teste de formalina, realizado 20 dias após a cirurgia para constrição do nervo infraorbital (Figura 31).

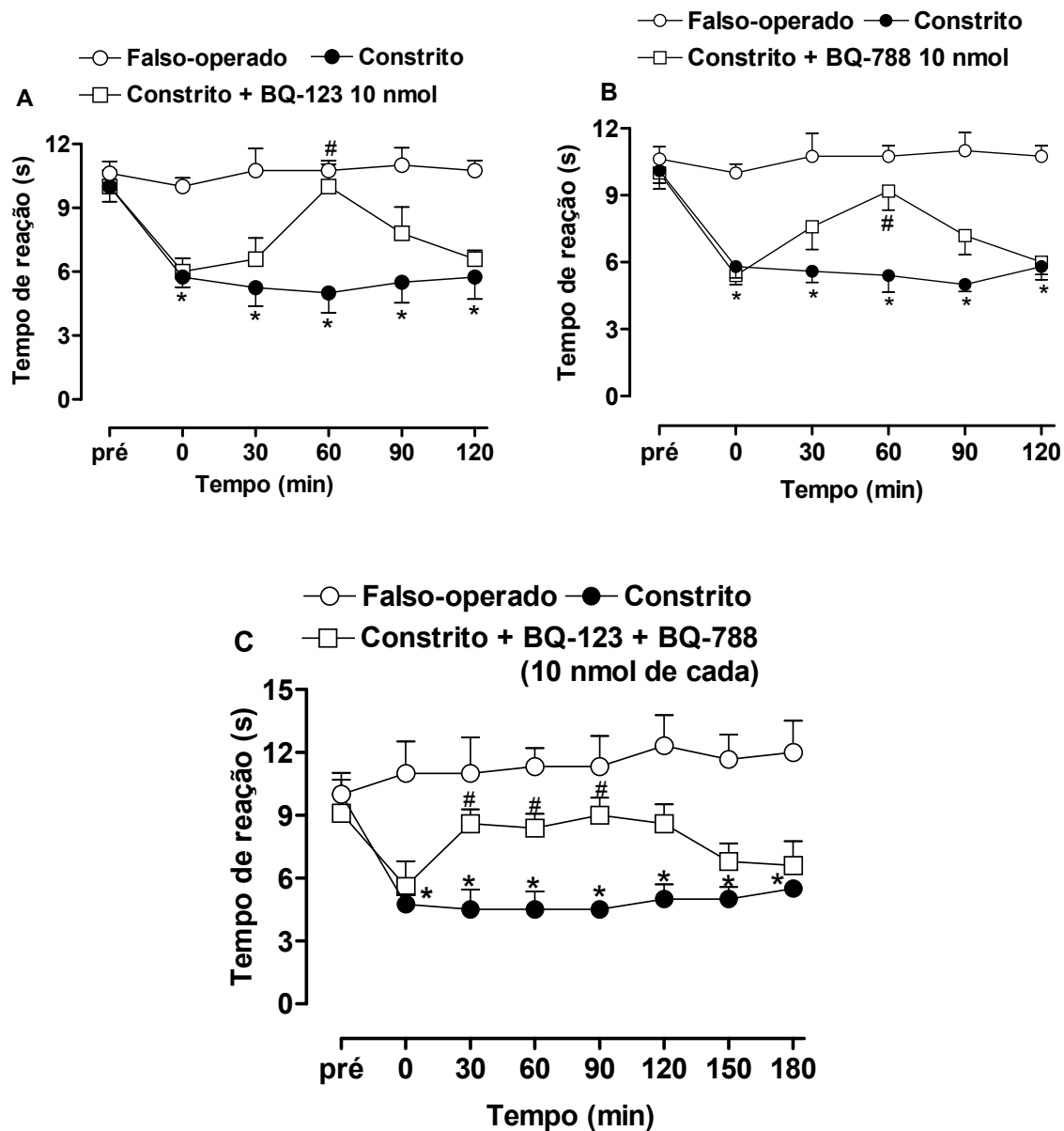


**Figura 26 – Efeito do tratamento local com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com BQ-123 (3, 10 e 30 nmol/50 µl, s.c., painel A), BQ-788 (3, 10 e 30 nmol/50 µl, s.c., painel B), ou BQ-123+BQ-788 (cada um na dose de 3 ou 10 nmol/50 µl, s.c., painel C) e foram submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial nos 2 min subseqüentes à aplicação do spray (n= 5 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

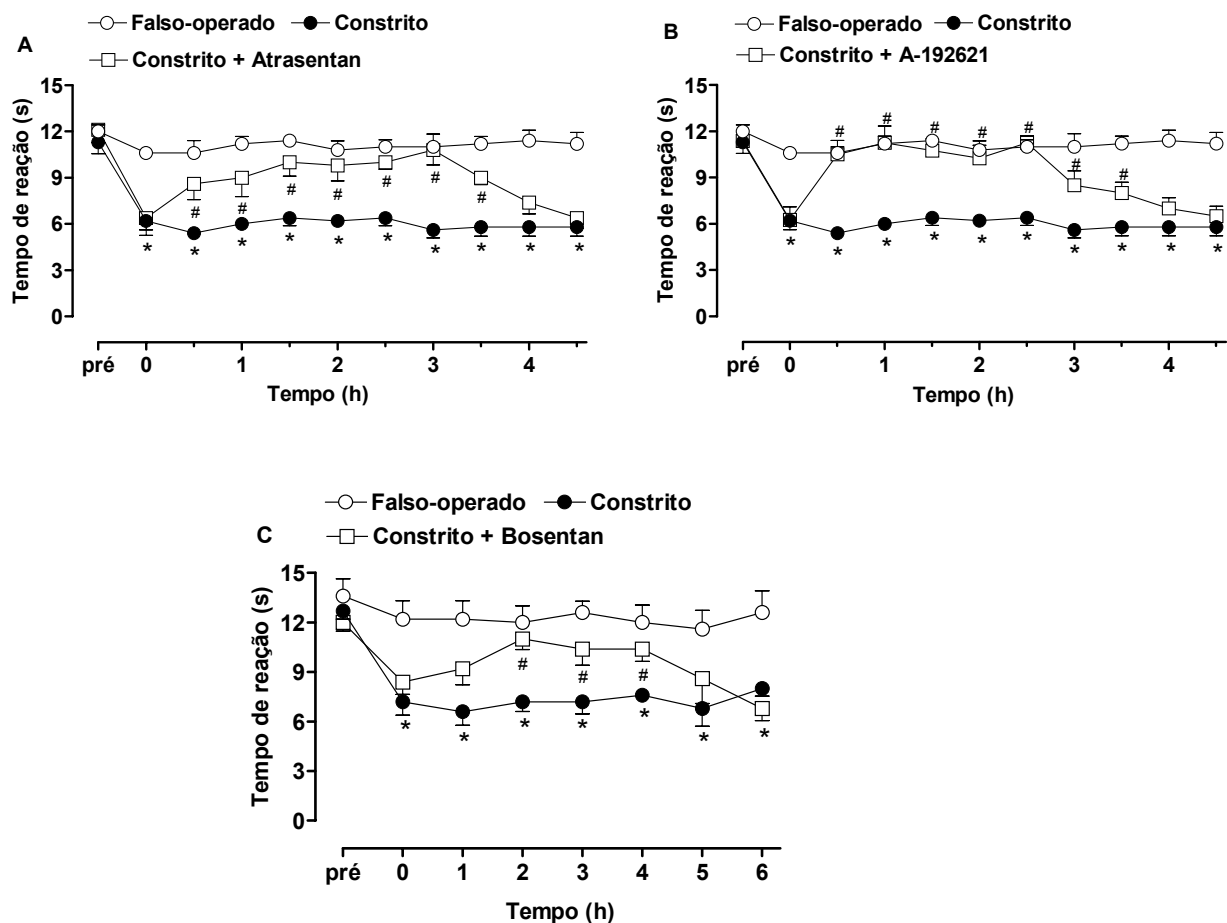


**Figura 27 – Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrictão do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com atrasentan (3 e 10 mg/kg, i.v., painel A), A-192621 (5 e 20 mg/kg, i.v., painel B) ou bosentan (10 mg/kg, i.v.) e foram submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min (painéis A e B) ou 60 min (painel B) após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constricto e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial nos 2 min subseqüentes à aplicação do spray (n= 5 a 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

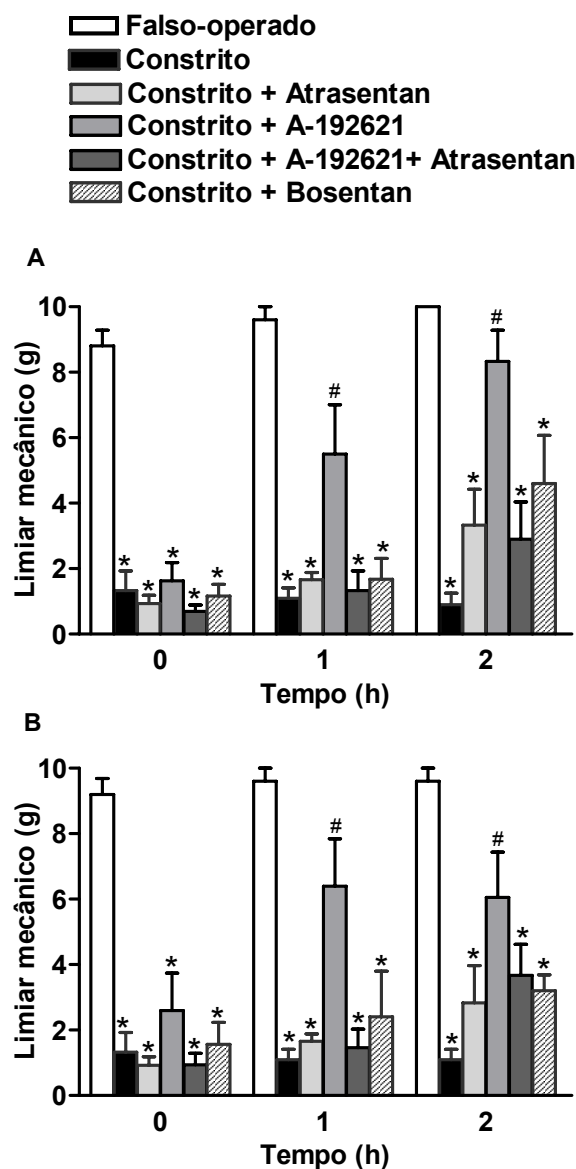




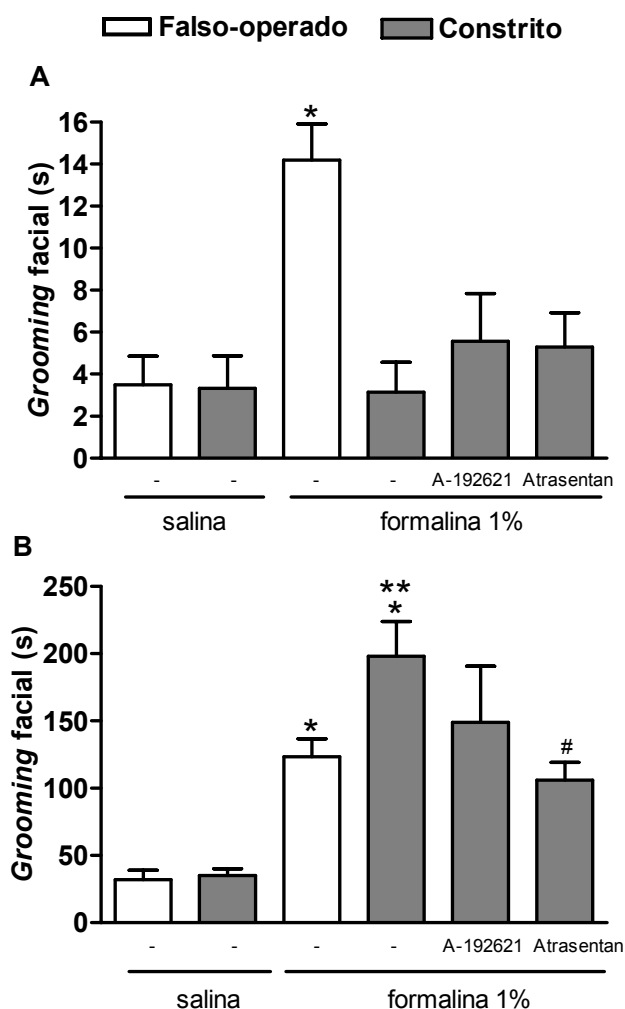
**Figura 28 – Efeito do tratamento local com antagonistas de receptores de endotelina na hipernociceção ao calor em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com BQ-123 (10 nmol/50 µl, s.c., painel A), BQ-788 (10 nmol/50 µl, s.c., painel B), ou BQ-123 + BQ-788 (cada um na dose de 10 nmol/50 µl, s.c., painel C) e foram submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média ± e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor (n=5 a 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 29 – Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção ao calor em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** No 4º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com atrasentan (10 mg/kg, i.v., painel A), A-192621 (20 mg/kg, i.v., painel B) ou bosentan (10 mg/kg, i.v.) e foram submetidos à estimulação térmica antes (pré), e em intervalos de 30 min (painéis A e B) ou 60 min (painel B) após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constricto e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de reação ante a aplicação do calor (n=5 a 6 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).



**Figura 30 – Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina na hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No período de 15 a 20 dias após a cirurgia, os animais foram tratados com atrasentan (10 mg/kg, i.v.), A-192621 (20 mg/kg, i.v.), atrasentan + A-192621 (nas mesmas doses) ou bosentan (20 mg/kg, i.v.) e foram submetidos à estimulação mecânica antes (tempo 0), e em intervalos de 60 min após os tratamentos. Animais dos grupos controle (constricto e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. da força (em g) necessária para induzir por duas vezes consecutivas os comportamentos de retirada da cabeça ou ataque/escape do filamento nos lados ipsilateral (painel A) ou contralateral (painel B) à cirurgia (n= 6 a 10 animais por grupo). Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constricto tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de teste de Mann-Whitney).



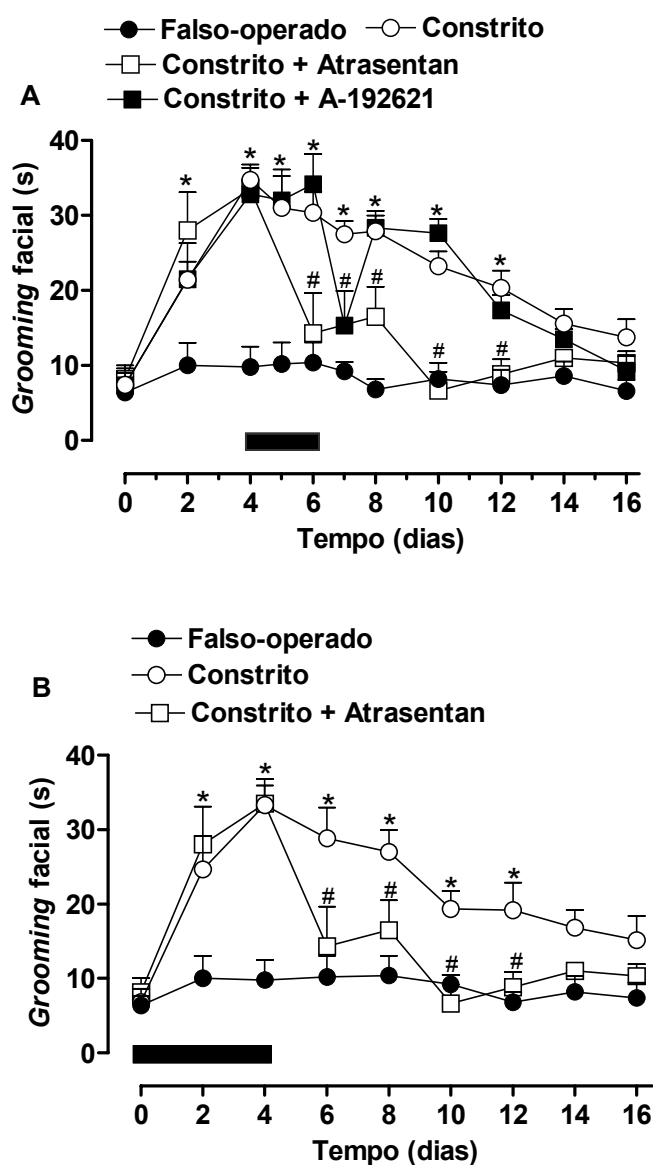
**Figura 31 – Efeito do tratamento sistêmico com antagonistas de receptores de endotelina no teste de formalina em animais submetidos à constricção do nervo infraorbital.** No 20º dia após a cirurgia, os animais foram tratados com atrasentan (10 mg/kg, i.v.) ou A-192621 (20 mg/kg, i.v.) 1 h antes da injeção de formalina (1%, 50 µl) no lábio superior. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média ± e.p.m. do tempo de *grooming* facial nas fase I (0-3 min, painel A) e II (12-30 min, painel B) do teste (n= 5 a 8 animais por grupo). Asteriscos (\* e \*\*) denotam  $P < 0,05$  em relação aos animais tratados com salina, e em relação aos animais do grupo falso-operado tratados com formalina, respectivamente. Cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo constrito tratado com formalina (ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls).

#### **4.8 Influência da administração oral de múltiplas doses de atrasentan ou A-192621 no desenvolvimento e na manutenção da hipernocicepção ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital.**

Previamente à investigação do efeito de administrações repetidas do atrasentan e do A-192621, avaliou-se a eficácia destes antagonistas quando administrados agudamente por via oral. Através desta via de administração, o tratamento dos animais com atrasentan (10 mg/kg) foi efetivo em inibir a hipernocicepção ao frio na 2<sup>a</sup> e na 3<sup>a</sup> h após sua administração, acarretando uma inibição máxima de 60%. O tratamento oral dos animais com A-192621 (20 mg/kg) também reduziu significativamente a hipernocicepção ao frio (80% de inibição na 4<sup>a</sup> h), porém seu efeito foi mais prolongado, entre a 2<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> h após sua administração (dados não mostrados).

Administrações repetidas de atrasentan (10 mg/kg, v.o.) ou A-192621 (20 mg/kg) no 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após a cirurgia reduziram significativamente a hipernocicepção ao frio, tanto nos dias em que os tratamentos foram realizados (dados não mostrados), como no dia subsequente ao término do tratamento, no caso do A-192621, ou por mais 6 dias após o término do tratamento, no caso do atrasentan (Figura 32A). A administração única de atrasentan ou A-192621, nestas mesmas doses e por via oral, não alterou a resposta dos animais, avaliada nos dias subsequentes ao tratamento (dados não mostrados).

Adicionalmente, administrações diárias repetidas de atrasentan (10 mg/kg, v.o.) durante 5 dias, com início antes da cirurgia e término no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia, induziram reduções significativas na resposta dos animais ao frio que persistiram por 8 dias após o término do tratamento (Figura 32B).



**Figura 32 – Influência de administrações repetidas de atrasentan ou A-192621 no desenvolvimento da hipernocicepção ao frio em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital.** No painel A, os animais foram tratados nos 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após a cirurgia com atrasentan (10 mg/kg, v.o.) ou A-192621 (20 mg/kg, v.o.) e foram submetidos à estimulação térmica antes (dia 0) e em diferentes períodos após a cirurgia. No painel B, os animais foram tratados diariamente com atrasentan (10 mg/kg, v.o.) antes (dia 0) e até o 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia. Animais dos grupos controle (constrito e falso-operado) foram tratados com os veículos correspondentes. Os valores representam média  $\pm$  e.p.m. do tempo de *grooming* facial nos 2 min subseqüentes à aplicação do spray (n=6 a 8 animais por grupo). Nos dias em que os animais receberam os diferentes tratamentos (indicados pelas barras) os valores apresentados se referem à estimulação prévia ao mesmo. Asteriscos e cerquilhas denotam  $P < 0,05$  em relação aos grupos falso-operado e constrito tratados com veículo, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de Newman-Keuls).

## 5. Discussão

---

### **5.1 Desenvolvimento da hipernocicepção a estímulos térmico, mecânico e químico após a constrição do nervo infraorbital.**

A constrição do nervo infraorbital foi proposta como um modelo para o estudo da dor neuropática trigeminal por Vos e Maciewicz (1991). Em 1994, Vos e colaboradores demonstraram que animais submetidos a este procedimento apresentavam aumento do tempo de *grooming* facial espontâneo do 1º ao 15º dia após a cirurgia, seguido de alodinia mecânica bilateral, a qual persistia por pelo menos 130 dias. De uma maneira geral, nossos resultados estão de acordo com este estudo. Os animais submetidos à constrição do nervo infraorbital apresentaram hipernocicepção mecânica bilateral de longa duração, e o surgimento desta resposta, assim como observado por Vos et al (1994), foi mais tardio (12 e 15 dias após a cirurgia, respectivamente).

A alodinia mecânica é um dos sintomas mais comuns em pacientes com neuralgia do trigêmeo. No entanto, apenas raramente ela acomete ambos os lados da face do paciente (para revisão ver Scrivani et al., 2005). Os resultados de Vos et al. (1994) mostram que, apesar de bilateral, a redução do limiar à estimulação mecânica é mais acentuada no lado operado, enquanto que nossos resultados mostram que a redução foi equivalente em ambos os lados da face. Apesar dessas diferenças, estes dados corroboram estudos eletrofisiológicos que demonstraram a ocorrência de alterações em núcleos do tálamo e regiões do córtex somatossensorial associados ao lado intacto da face, após a constrição unilateral do nervo infraorbital de ratos (Benoist et al., 1999; Vos et al., 2000). Em adição, um aumento de aproximadamente 50% no campo receptivo dos neurônios do lado intacto da face também foi observado após a constrição do nervo infraorbital (Vos et al., 2000). Além disso, tem sido



demonstrado que projeções do gânglio do trigêmeo dirigem-se para ambos os lados do bulbo e do núcleo do trato espinhal, e ainda, que a estimulação unilateral do gânglio do trigêmeo ativa neurônios tanto no subnúcleo caudal ipsilateral como contralateral (Pfaller e Arvidsson, 1988; Jacquin et al., 1990; Ingvarlsen et al., 1997; Samsam et al., 2001). Desta forma, a organização anatômica e funcional do complexo sensorial trigeminal pode explicar porque a lesão unilateral do nervo infraorbital produz alodinia mecânica em ambos os lados da face, ao menos em ratos.

Em 1997, Imamura e colaboradores demonstraram que a constrição do nervo infraorbital de ratos induzia hipernocicepção orofacial bilateral ao calor, embora muito menos proeminente no lado não operado, a qual persistia por até 12 dias após a cirurgia. Diferentemente dos resultados de Imamura e colaboradores (1997), nossos dados mostram o desenvolvimento de hipernocicepção ao calor apenas no lado operado. No entanto, o decurso temporal e a intensidade desta resposta são semelhantes nos dois estudos.

Nossos resultados mostram ainda que, após a constrição do nervo infraorbital, os animais desenvolvem hipernocicepção ao frio, paralelamente à hipernocicepção ao calor. O emprego de um estímulo térmico frio neste modelo é importante, primeiramente porque o frio pode desencadear episódios de dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo, e em segundo lugar, porque, embora não tão comum quanto a alodinia mecânica, a hiperalgesia ao frio também é observada nesta condição (Mathews e Scrivani, 2000; para revisão ver Scrivani et al., 2005).

Apesar de existirem inúmeros estudos a respeito do desenvolvimento da hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos em modelos de dor

neuropática, a influência de estímulos químicos e condições inflamatórias nestes modelos foi pouco estudada. Um dos estímulos mais utilizados para o estudo da dor neurogênica e inflamatória é a formalina. A injeção subcutânea de formalina na pata ou no lábio superior de ratos evoca uma resposta nociceptiva bifásica, na qual a primeira fase (i.e. fase neurogênica) reflete a ativação dos nociceptores, enquanto que a segunda fase envolve um processo inflamatório local e de sensibilização central (Dubuisson e Denis, 1977; Clavelou et al., 1995; Puig e Sorkin, 1996). Em 2003, Anderson e colaboradores demonstraram aumento das respostas nociceptivas à formalina no 21º dia após a constrição do nervo infraorbital, no entanto, estes autores empregaram uma dose elevada desta substância (3%), e através da avaliação do tempo de *grooming* facial, demonstraram redução da segunda fase da resposta dos animais constritos, sem diferença significativa na primeira fase entre animais constritos e falso-operados (Anderson et al., 2003). Considerando outros comportamentos nociceptivos, tais como trismo e vocalização, estes autores observaram aumento significativo da fase II da resposta dos animais constritos, mas a fase I permaneceu igual entre os dois grupos (constritos e falso-operados). O presente estudo mostra que a administração de uma dose de efetividade sub-máxima de formalina (1%) induz aumento significativo do tempo de *grooming* facial na fase II do teste, em diferentes períodos após a constrição. No entanto, apesar do aumento na segunda fase, animais constritos não apresentaram uma resposta de fase I significativa à formalina.

Variações, mesmo que sutis, na metodologia empregada em cada estudo podem contribuir para as discrepâncias que foram mencionadas. Neste

sentido, um aspecto que deve ser levado em consideração é o tipo de acesso cirúrgico utilizado para a realização da constrição. No modelo originalmente proposto (Vos e Macievicz, 1991), o acesso ao nervo infraorbital foi feito pela órbita, através do afastamento do globo ocular. Já Anderson et al. (2003) e Imamura et al. (1997) empregaram um acesso intra-oral, e o presente estudo fez uso de um acesso extra-oral. Estas duas últimas opções de acesso cirúrgico parecem ser menos invasivas, visto que na primeira delas só foi observada uma redução no ganho de peso dos animais constritos em relação aos falso-operados nos primeiros dias após a cirurgia, e na segunda não houve qualquer diferença significativa no ganho de peso dos animais, do 1º ao 120º dia após a cirurgia (Imamura et al, 1997; presente estudo, dados não mostrados). Por outro lado, no modelo proposto por Vos e Macievicz (1991), o ganho diário de peso dos animais constritos foi menor que os falso-operados, e passados 130 dias da cirurgia a média de peso corporal foi significativamente menor nos animais constritos (Vos et al., 1994).

No entanto, diferenças realmente expressivas são observadas quando se compara o desenvolvimento da hipernocicepção a diferentes estímulos entre modelos de lesão de nervos periféricos e do nervo infraorbital. Estudos demonstram que ratos começam a apresentar hipernocicepção mecânica ipsilateral 4 dias após constrição do nervo ciático, que persiste por 3 semanas (Tal e Bennett, 1994). O aparecimento da hipernocicepção ao calor também é precoce neste modelo, porém sua duração bem mais prolongada (até 2 meses após a lesão, Bennett e Xie, 1988), enquanto que aquela ao frio foi detectada apenas 30 dias após a lesão, persistindo por mais 30 dias (Jasmin et al., 1998). As respostas nociceptivas a doses sub-maximamente efetivas de formalina

também foram potencializadas na fase II do teste após a lesão de nervos espinhais, porém, ao contrário do que observamos, a fase I não foi alterada (Ceseña e Calcutt, 1999; LaBuda et al., 2001). Estas diferenças reforçam a idéia de que o processamento nociceptivo no sistema trigeminal, devido às suas peculiaridades, pode diferir em diversos aspectos, daquele decorrente da ativação de nervos espinhais.

## **5.2 Mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipernocicepção mecânica, térmica e química após a constrição do nervo infraorbital.**

Existem diversas evidências de que fibras do tipo C constituem as principais vias de transmissão de estímulos térmicos nocivos. Nossos resultados corroboram estudos anteriores, mostrando que a hipernocicepção térmica (ao frio e ao calor) induzida por lesão de nervos periféricos é mediada principalmente por fibras sensíveis a capsaicina (Shir et al., 1990; Hao et al., 1996).

Como mencionado anteriormente na introdução, existem dois tipos de receptores, presentes em fibras C, que parecem mediar as respostas ao calor e ao frio nocivos, TRPV1 e TRPA1, respectivamente. Embora seja amplamente aceito que o TRPV1 é o principal mediador da hipernocicepção ao calor, a contribuição do TRPA1 para a hiperalgesia ao frio ainda é controversa (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006). Nossos resultados mostram que a administração de capsaicina, agonista de receptores TRPV1, causa hipernocicepção ao calor em animais não operados, a qual é abolida tanto pela depleção de fibras C, quanto pela administração de capsazepina. Em adição, a

icilina, agonista não seletivo de receptores TRPA1, produziu hipernocicepção ao frio em animais não operados, a qual foi prevenida pela depleção de fibras C ou pelo tratamento com capsazepina, bem como potencializou a hipernocicepção ao frio em animais constrictos. Embora a icilina não discrimine entre receptores TRPA1 e TRPM8, dados recentes da literatura mostram que apenas os receptores TRPA1 são expressos por fibras sensíveis à capsaicina e contribuem para o desenvolvimento da hipernocicepção em condições de dor inflamatória e neuropática (Obata et al., 2005; Katsura et al., 2006). Além disso, a capsazepina reduziu significativamente a hipernocicepção ao frio e ao calor em animais constrictos. Embora a capsazepina tenha sido considerada, por muito tempo, um antagonista seletivo de receptores TRPV1 (Bevan et al., 1992), Liu e Simon (1996) demonstraram que concentrações de capsazepina normalmente utilizadas para inibir respostas fisiológicas evocadas pela capsaicina em neurônios do gânglio do trigêmeo de ratos, também reduziam a magnitude das correntes evocadas pela nicotina. Mais recentemente, Behrendt et al. (2004) mostraram que a capsazepina inibia receptores TRPM8 de camundongos e Weil et al. (2005) reproduziram estes achados em receptores TRPM8 humanos. Em conjunto, estes dados mostram que receptores da família TRP, possivelmente TRPV1 e TRPA1, presentes em fibras C, medeiam a hipernocicepção térmica no sistema sensorial trigeminal, e sugerem que antagonistas destes receptores apresentam potencial terapêutico no tratamento deste sintoma.

A despeito das evidências de que a capsaicina e a icilina ativam receptores distintos presentes em uma mesma sub-população de fibras, a injeção de icilina no lábio superior dos animais não induziu hipernocicepção ao

calor, assim como a injeção local de capsaicina não induziu hipernocicepção ao frio. De maneira análoga, a co-administração destas substâncias não resultou em potencialização da hipernocicepção ao frio (dados não mostrados). Uma das possibilidades para a ausência de interação entre a capsaicina e a icilina diz respeito às diferenças entre as temperaturas necessárias à sua ativação. Neste sentido, quando o TRPV1 é exposto à capsaicina, o rebaixamento da temperatura causada pelo estímulo frio, para valores abaixo do limiar de ativação, impede que o mesmo seja ativado. De modo análogo, quando o TRPA1 é exposto a icilina, o mesmo é inativado quando a temperatura local é elevada acima do limiar de ativação deste receptor por aplicação de calor radiante. Além disso, estudos “in vitro” demonstraram que a icilina não ativa células transfectadas com receptores TRPV1, enquanto que a capsaicina não ativa células que expressam heterologicamente receptores TRPA1 ou TRPM8 (Story et al., 2003). Adicionalmente, a icilina potencializa correntes evocadas pelo frio e causa dessensibilização de receptores TRPM8 (Chuang et al., 2004). Por outro lado, a dessensibilização dos receptores TRPA1 só foi demonstrada em resposta a exposições repetidas ao frio e ao óleo de mostarda (Story et al., 2003). Nossos dados “in vivo” mostram que administrações repetidas de icilina tornam os animais refratários ao frio, o que sugere uma possível dessensibilização do receptor.

Ao contrário da hipernocicepção térmica, a alodinia mecânica decorrente da lesão de nervos é considerada insensível à depleção de fibras C (Ossipov et al., 1999). Neste estudo, buscou-se estabelecer o papel destas fibras na hipernocicepção induzida por constrição do nervo infraorbital, mas a grande maioria dos animais (~90%) tratados no período neonatal com capsaicina

apresentou redução significativa no limiar de resposta à estimulação mecânica na vida adulta, quando comparados aos animais tratados no período neonatal com veículo (dados não mostrados). Estes achados nos impediram de avaliar a influência da depleção das fibras C na hipernocicepção mecânica neste modelo. No entanto, tem sido demonstrado que o tratamento sistêmico com resiniferotoxina, um análogo 200 vezes mais potente que a capsaicina, também causa aumento na sensibilidade à estimulação mecânica em ratos adultos. Este efeito da resiniferotoxina em produzir alodinia mecânica é atribuído, ao menos em parte, à depleção das fibras C e conseqüente brotamento das fibras A $\beta$  em direção a alvos “incorretos” no corno dorsal da medula espinhal (Pan et al., 2003). Em neurônios do trigêmeo, foi demonstrado que a depleção das fibras C com capsaicina aumenta tanto o campo receptivo como a intensidade das respostas à estimulação mecânica de mecanorreceptores de baixo limiar (Kwan et al., 1999). Portanto, pode-se aventar a possibilidade de que a depleção das fibras C resulte no rearranjo anatômico das vias sensoriais trigeminais (i.e. remodelamento sináptico), o qual seria responsável pela diminuição do limiar mecânico em animais tratados com capsaicina no período neonatal.

Desta forma, a demora para o aparecimento da hipernocicepção mecânica também pode ser conseqüência do remodelamento sináptico associado à lesão do nervo infraorbital, visto que esta dependeria do rearranjo do sistema. Por outro lado, a hipernocicepção a estímulos térmicos, que é mediada por fibras C, desenvolve-se mais rapidamente e sua redução coincide com o surgimento da hipernocicepção mecânica. Interessantemente, animais cujas fibras C foram depletadas por capsaicina apresentaram aumento

significativo na sensibilidade a estímulos térmicos pouco antes do desenvolvimento da hipernocicepção mecânica. Os mecanismos subjacentes a este fenômeno ainda precisam ser esclarecidos, contudo, pode-se sugerir que ele seja resultado do remodelamento do sistema sensorial, o qual pode envolver alterações fenotípicas dos neurônios, que passariam a expressar receptores de frio e calor, ou a estabelecer novas conexões sinápticas. É possível, ainda que pouco provável, que o desaparecimento da hipernocicepção térmica a partir do momento em que os animais constrictos passam a apresentar sensibilidade exacerbada ao estímulo mecânico, seja decorrente de um mecanismo de proteção no qual o animal evita responder à estimulação com frio ou calor com grooming facial, de modo a não estimular mecanicamente a área sensibilizada.

Outra possibilidade para o decurso temporal não coincidente da hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos também está relacionada aos tipos de fibras que transmitem estas informações sensoriais. No modelo de dor neuropática por ligação do nervo ciático, foi demonstrado que o número de fibras C é reduzido a um terço do normal 5 a 14 dias após a cirurgia (Sommer et al., 1993). Embora este dado ainda não tenha sido avaliado objetivamente após a constrição do nervo infraorbital, nossos resultados indicam que a lesão do nervo induz a perda de fibras do tipo C. Imagens obtidas por microscopia confocal do gânglio do trigêmeo no 4º dia após a constrição do nervo infraorbital mostram redução substancial da imunoreatividade para IB4, marcador de fibras C não peptidérgicas. A perda de fibras C poderia contribuir tanto para a redução da sensibilidade a estímulos térmicos como para a



---

ausência da resposta de fase I à formalina, a qual é mediada principalmente por este tipo de fibra (Pajot et al., 2000).

Ainda com relação à fase I do teste de formalina, pode-se aventar a possibilidade de que a ausência desta fase da resposta em animais constrictos seja resultado da estimulação exacerbada dos nociceptores, causada pela injeção de formalina em uma região onde as fibras encontram-se previamente sensibilizadas pela constrição do nervo infraorbital. Dentro deste contexto, tem sido demonstrado que altas doses de formalina estão relacionadas com redução ou ausência da fase I da resposta em ratos e camundongos (Rosland et al. 1990, Wheeler-Aceto e Cowan, 1993). Em adição, foi relatado que a amplitude máxima da resposta na fase I, no teste de formalina orofacial, foi atingida com a dose de 1,5% e que concentrações superiores estavam associadas à redução do tempo de *grooming* facial e aparecimento de outros comportamentos (i.e. *freezing*) raramente observados com concentrações mais baixas (Clavelou et al., 1995). Este efeito também ocorre na fase II, mas somente com concentrações iguais ou superiores a 5%, o que sugere que a fase I é mais susceptível ao aparecimento de comportamentos capazes de mascarar as respostas nociceptivas.

Por outro lado, a fase II da resposta à formalina é mediada por fibras C, A $\delta$  e por nociceptores “silenciosos”. Estes últimos são fibras C e A $\delta$  mecanicamente insensíveis, que são sensibilizadas por mediadores inflamatórios, tornando-se responsivas apenas na fase II (Puig e Sorkin, 1995). No presente estudo, a desnervação neonatal com capsaicina reduziu em 60% a fase II da resposta à formalina em animais constrictos e aboliu esta resposta em animais falso-operados (dados não mostrados). Portanto, mesmo que a

lesão do nervo infraorbital acarrete a perda de fibras C, elas ainda parecem contribuir significativamente para a fase II da resposta à formalina. Além disso, apesar de animais constrictos não apresentarem uma resposta significativa na fase I, a mesma foi abolida em animais falso-operados submetidos ao tratamento neonatal com capsaicina (dados não mostrados). Em conjunto, estes dados sugerem que as fibras do tipo C são essenciais na fase I do teste de formalina orofacial e contribuem significativamente para as respostas observadas na fase II.

### **5.3 Influência de diferentes tratamentos na hipernociceção a estímulos mecânicos e térmicos no modelo de constrição do nervo infraorbital.**

Dores de origem neuropática muitas vezes apresentam um componente inflamatório, o que explica a eficácia analgésica de AINEs em alguns modelos experimentais e em estudos clínicos (Cohen e Harris, 1987; Schäfers et al., 2004). Neste estudo, o tratamento dos animais com indometacina e celecoxibe, em doses efetivas em reduzir a hipernociceção térmica induzida por um estímulo inflamatório (carragenina), não reduziu a hipernociceção ao frio ou ao calor causada por constrição do nervo infraorbital. Estes resultados não só mostram a diferença na suscetibilidade da hipernociceção do modelo de constrição do nervo infraorbital e de um modelo de dor inflamatória ao tratamento com AINEs, como sugerem que PGs não sejam importantes na manutenção da dor neuropática neste modelo. Em contraste, a hipernociceção térmica induzida por constrição do nervo ciático é reduzida por inibidores de COX-1 ou COX-2, mesmo quando administrados uma única vez

(Padi e Kulkarni, 2004; de Vry et al., 2004). Por outro lado, o tratamento dos animais com dexametasona reduziu apenas discretamente e por um curto período a hipernocicepção a estímulos térmicos induzidos por constrição do nervo infraorbital, enquanto que aboliu a hipernocicepção ao frio induzida por carragenina. Antiinflamatórios esteroidais como a dexametasona atuam principalmente por supressão da atividade de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear  $\kappa$ B; levando à redução da expressão de diversas citocinas e proteínas pró-inflamatórias, inclusive a COX-2 (para revisão ver De Bosscher et al., 2000). Os resultados deste estudo indicam que, na hipernocicepção térmica induzida por constrição do nervo infraorbital, o efeito antinociceptivo da dexametasona não está relacionado com a inibição da síntese de PGs, no entanto este mecanismo pode estar contribuindo de modo importante ao efeito da dexametasona na hipernocicepção ao frio induzida por carragenina.

Como mencionado anteriormente, a carbamazepina, assim como outros anticonvulsivantes, são os fármacos de escolha no tratamento da neuralgia do trigêmeo. Os resultados deste estudo mostram que tanto a carbamazepina, bem como a oxcarbazepina e a gabapentina, são eficazes em reduzir a hipernocicepção a estímulos térmicos em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital. Embora, neste estudo, nenhum dos tratamentos tenha sido capaz de alterar significativamente a hipernocicepção mecânica, Christensen e colaboradores (2001) demonstraram que injeções repetidas de gabapentina causaram redução parcial deste comportamento, sem acarretar distúrbios motores nos animais. Em adição, foi demonstrado que doses de carbamazepina superiores a 10 mg/kg reduzem a alodinia mecânica no modelo de constrição do nervo infraorbital, mas também causam prejuízo motor aos

animais (Idänpään-Heikkilä e Guilbaud, 1999). Estes resultados corroboram as observações clínicas de que, na maioria dos pacientes com neuralgia do trigêmeo, quando são atingidas concentrações plasmáticas terapêuticas de carbamazepina, reações adversas tais como sedação, ataxia, vertigem e visão borrada, surgem concomitantemente (Tomson et al., 1980; Fields et al., 1997). Neste estudo optou-se por utilizar doses que não estavam relacionadas ao aparecimento de distúrbios motores, a fim de que os mesmos não interferissem na interpretação das repostas. Possivelmente, por esta razão, não foi demonstrada a redução da hipernocicepção mecânica com nenhum dos tratamentos, e a oxcarbazepina e a gabapentina foram mais efetivas do que a carbamazepina em reduzir a hipernocicepção térmica. Novamente, a eficácia destes tratamentos em reduzir a hipernocicepção térmica indica uma diferença importante entre os modelos de dor neuropática por constrição do nervo infraorbital ou por nervos espinhais, uma vez que a carbamazepina não afetou a hipernocicepção térmica induzida por ligação do nervo ciático e a gabapentina só foi efetiva em doses muito mais elevadas (Hunter et al., 1997, Fox et al., 2003).

Este conjunto de resultados nos levou a avaliar a influência de mais dois tratamentos nas alterações de responsividade dos animais constrictos, objetivando demonstrar que a hipernocicepção mecânica era passível de redução por fármacos eficazes em modelos de dor neuropática.

Anestésicos locais, como a lidocaína, têm se mostrado efetivos, especialmente contra a alodinia mecânica, tanto em modelos de dor neuropática quanto em pacientes (para revisão ver Mao e Chen, 2000). Uma das razões para esta seletividade reside no fato de que os disparos ectópicos

em fibras A $\beta$ , os quais são suprimidos pela lidocaína, exacerbam a sensibilidade a estímulos mecânicos. Como mencionado anteriormente, as fibras A $\beta$  expressam preferencialmente canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina (Quashoff et al., 1995; Akopian et al., 1996). Estes, por sua vez, têm a expressão aumentada após a lesão de nervos, mas são de 4 a 5 vezes mais sensíveis aos efeitos da lidocaína em relação aos canais resistentes à tetrodotoxina (Roy e Narahashi, 1992; Cummins e Waxman, 1997; Akopian et al., 1999). Corroborando resultados de estudos com outros modelos de dor neuropática (Chaplan et al., 1995; Chen et al., 2004), o tratamento sistêmico dos animais com lidocaína reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital. Embora, nos estudos mencionados, o efeito da lidocaína tenha sido observado por até 14 dias após sua administração, isto não é condizente com a meia-vida plasmática deste fármaco, que no rato não é superior a 30 minutos, de modo que o mecanismo de ação ainda precisa ser esclarecido (Keenaghan e Boyes, 1972).

Além de alterar o limiar à estimulação mecânica, a lidocaína também reduziu significativamente a hipernocicepção a estímulos térmicos induzida por constrição do nervo infraorbital, o que também já foi demonstrado em outros modelos de dor neuropática (Jasmin et al., 1998; Chen et al., 2004). O último estudo mostrou ainda que a redução da hipernocicepção mecânica pela lidocaína decorre da sua ação sobre o SNC, enquanto que a redução da hipernocicepção térmica envolve sua ação em sítios centrais e periféricos. Este resultado reforça a idéia de que a hipernocicepção a estímulos mecânicos e

térmicos seja mediada por diferentes mecanismos e, portanto apresentem sensibilidades distintas ao mesmo tratamento.

A despeito das controvérsias quanto à efetividade clínica dos opióides no tratamento das dores neuropáticas, em muitos modelos animais sua administração causa redução da hipernocicepção a estímulos mecânicos e térmicos (Bian et al., 1995; Lee et al., 1995; Chu et al., 2000, Tsai et al., 2000; Deseure et al., 2002). Corroborando estes estudos, demonstramos que o tratamento dos animais com morfina, agonista preferencial de receptores opióides do tipo  $\mu$ , aboliu a hipernocicepção térmica e mecânica, por até 90 minutos. A ineficácia dos opióides na dor neuropática, especialmente contra a alodinia mecânica, é atribuída ao fato de que mais de 75% dos receptores opióides pré-sinápticos são expressos por fibras do tipo C (para revisão ver Dickenson e Suzuki, 2005). Desta forma, o número de receptores opióides seria reduzido expressivamente após a lesão de nervos, visto que esta condição leva à perda de uma percentagem significativa de fibras C. No entanto, tem sido demonstrado que o sítio de ação dos opióides na dor neuropática é supra-espinhal, pois a administração sistêmica ou i.c.v., mas não local ou intratecal, de agonistas opióides reduz a alodinia mecânica após a lesão de nervos periféricos em ratos (Lee et al., 1995).

A resistência ao uso de opióides no tratamento de pacientes com dor neuropática não é resultado apenas da descrença na sua eficácia analgésica nesta condição, mas também da preocupação dos clínicos com o desenvolvimento de tolerância, dependência, bem como de reações adversas associadas a esta classe de fármacos, que incluem sedação, disforia e constipação (para revisão ver Martin e Eisenach, 2001). No entanto, tendo em

vista a multiplicidade de mecanismos envolvidos na dor neuropática e o efeito limitado das monoterapias (seja pela baixa eficácia ou pela necessidade de altas doses que causam reações adversas intoleráveis), o uso de opióides associados a outros fármacos, como anticonvulsivantes ou bloqueadores de receptores NMDA, deve ser considerada. Neste sentido, no modelo de constrição do nervo infraorbital, demonstrou-se que a associação de morfina com um antagonista de receptores NMDA, em doses que não alteravam o limiar à estimulação mecânica, reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica sem causar distúrbios motores nos animais (Christensen et al., 1999). Outras vantagens desta associação incluem a redução da tolerância e o aumento da eficácia analgésica dos opióides obtidos com o bloqueio de receptores NMDA, as quais já foram amplamente demonstradas (Mao et al., 1995; Inturrisi, 1997; Wiesenfeld-Hallin, 1998).

#### **5.4 Participação das endotelinas na dor neuropática induzida por constrição do nervo infraorbital em ratos.**

Corroborando as evidências à respeito das ações hiperalgésicas das endotelinas, no presente estudo a administração de ET-1 no lábio superior dos animais causou hipernocicepção bilateral ao frio e ao calor, que persistiu por até 5 horas após a injeção, bem como hipernocicepção mecânica, restrita ao lado ipsilateral, que persistiu por igual período. Apesar das diferentes características da hipernocicepção induzida por constrição do infraorbital e por administração de ET-1, estes dados, por si só, sugerem que estes peptídeos possam ser mediadores importantes da hipernocicepção na região orofacial causada por constrição do nervo infraorbital. Neste sentido, possíveis fontes de

endotelinas que medeiam a hipernocicepção aos diferentes estímulos são células inflamatórias, tais como macrófagos e mastócitos (Ehrenreich et al., 1990, 1992), e as próprias fibras aferentes primárias trigeminais (Milner et al., 2000). Este último estudo demonstrou que a destruição de fibras C pelo tratamento neonatal dos animais com capsaicina leva à redução significativa da imunoreatividade para endotelinas no gânglio do trigêmeo.

Com o objetivo de melhor investigar esta possibilidade, outro aspecto que foi avaliado, pela primeira vez, neste estudo foi a expressão e localização dos receptores de endotelina no gânglio do trigêmeo dos animais. Estudos anteriores já haviam demonstrado RNA mensageiro para receptores  $ET_B$  e imunoreatividade para endotelinas nesta estrutura (Kitano et al., 1998; Milner et al., 2000). No entanto, a presença de receptores  $ET_A$ , bem como a distribuição destes receptores nos diferentes tipos celulares do gânglio do trigêmeo, ainda não tinham sido avaliados. Neste estudo demonstrou-se que tanto receptores  $ET_B$  como  $ET_A$  são expressos por células do gânglio do trigêmeo. Quanto à localização, receptores  $ET_B$  foram detectados em fibras do tipo C não peptidérgicas e células satélites da glia, enquanto que receptores  $ET_A$  são expressos tanto por fibras C, quanto por fibras do tipo A do gânglio do trigêmeo.

A expressão e a localização dos receptores de endotelina também foram avaliadas em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital. No gânglio do trigêmeo destes animais, os níveis de expressão dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  não diferiram dos de animais do grupo controle 4 dias após a cirurgia, no entanto ambos estavam aumentados 15 dias após a constrição. Com relação à localização dos receptores de endotelina em gânglio do trigêmeo de animais



constritos, receptores  $ET_A$  ainda foram detectados em fibras do tipo A, bem como o perfil de expressão de receptores  $ET_B$  em células satélites não foi alterado. No entanto, a co-localização entre receptores  $ET_A$  ou  $ET_B$  e fibras C já não é tão nítida. Como mencionado anteriormente, a lesão de nervos leva à perda de fibras do tipo C, e a análise das imagens obtidas no presente estudo sugere que, 4 dias após a constrição, este fenômeno já esteja sendo observado. Deste modo, a dificuldade de se observar uma co-localização nítida entre os receptores de endotelina e esta sub-população de fibras pode ser resultado da diminuição expressiva da imunoreatividade para o marcador IB4 em gânglios de animais constritos. Além disso, no gânglio da raiz dorsal de ratos submetidos à constrição do nervo ciático, Pomonis e colaboradores (2001) identificaram receptores  $ET_A$  em aproximadamente 76% das fibras C peptidérgicas e em 23% das fibras de médio diâmetro ( $A\delta$ ). Por outro lado, receptores  $ET_B$  foram identificados na grande maioria das células satélites, mas não em outros tipos celulares. Portanto, se de maneira análoga ao gânglio da raiz dorsal, no gânglio do trigêmeo os receptores de endotelina forem expressos predominantemente por fibras C peptidérgicas, seria muito mais fácil evidenciar a co-localização se esta sub-população de fibras tivesse sido marcada.

Complementando os resultados obtidos “in vitro”, diversos resultados funcionais deste estudo demonstram que as endotelinas contribuem de maneira significativa para as alterações na responsividade dos animais à estimulação mecânica, química e principalmente térmica da região orofacial, em um modelo de dor neuropática trigeminal. Como em outros modelos,

observamos que os receptores que medeiam os efeitos hipernociceptivos das endotelinas diferem, de acordo com a natureza do estímulo aplicado.

Nesse sentido, o aumento do limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica orofacial só foi obtido com o bloqueio seletivo de receptores ET<sub>B</sub>, contrastando com os resultados de Jarvis et al. (2000) e Klass et al. (2005), nos quais a redução da alodinia mecânica da pata induzida por diabetes ou por constrição do nervo ciático, foi alcançada com o bloqueio de receptores ET<sub>A</sub>. Por outro lado, tanto no estudo de Jarvis et al. (2000) como no presente estudo, o efeito anti-alodínico decorrente do bloqueio seletivo de um receptor foi reduzido pelo bloqueio simultâneo de ambos (ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>). As evidências de que os receptores ET<sub>B</sub> funcionam como receptores de *clearance* para ET-1, e que sua ativação pode levar à liberação de opióides endógenos, apontam para a existência de uma interação modulatória entre os dois receptores (Fukuroda et al., 1994; Khodorova et al., 2003). No entanto, o efeito que observamos parece depender de um tipo diferente de interação, onde receptores ET<sub>A</sub> funcionais são necessários para o efeito anti-alodínico decorrente do bloqueio de receptores ET<sub>B</sub>.

Particularmente, no modelo de constrição do nervo infraorbital, a redução da hipernocicepção mecânica decorrente do bloqueio de receptores ET<sub>B</sub> foi totalmente suprimida pelo bloqueio concomitante de receptores ET<sub>A</sub>, tanto pela co-administração de atrasentan e A-192621, quanto pelo tratamento dos animais com bosentan. Uma possibilidade para este efeito é que o bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> estaria reduzindo a intensidade do bloqueio dos receptores ET<sub>B</sub> por aumentar a concentração de ET-1 disponível, a qual poderia competir com o antagonista ET<sub>B</sub> pelos mesmos sítios de ligação. Neste

caso, seria esperado que o bloqueio seletivo de receptores ET<sub>A</sub> resultasse no aumento da hipernocicepção à estimulação mecânica. Porém, a constrição do nervo infraorbital induz a redução máxima do limiar de resposta dos animais, o que impede a observação de uma redução adicional deste limiar de resposta.

Adicionalmente, a participação das endotelinas através da ativação de receptores ET<sub>B</sub> na hipernocicepção mecânica é condizente com o aumento da expressão de receptores ET<sub>B</sub> detectados no 15º dia após a cirurgia, período em que este comportamento foi avaliado. Em adição, receptores ET<sub>B</sub> foram identificados em células da glia do gânglio do trigêmeo de animais constrictos e existem diversas evidências que implicam estas células na transmissão de informações nociceptivas.

A lesão de nervos periféricos acarreta aumento sustentado da expressão de astrócitos no SNC, o qual se correlaciona com a participação destas células na manutenção da hipernocicepção mecânica (Tanga et al., 2004; Zhuang et al., 2005; Tanga et al., 2006). Além disso, um estudo recente demonstrou que a lesão dos nervos mentoniano e alveolar inferior, ramos da divisão mandibular do nervo trigêmeo, induz a ativação de astrócitos no subnúcleo caudal e que estes estariam envolvidos na hipernocicepção mecânica nestes modelos (Piao et al., 2006).

No gânglio do trigêmeo, a lesão de fibras sensoriais aumentou a expressão das células satélites, observada através do aumento da reatividade ao marcador GFAP, enquanto que após a axotomia do nervo infraorbital foi demonstrado aumento do acoplamento entre células satélites e neurônios, o qual foi seguido do aumento da excitabilidade de ambos os tipos celulares (Stephenson e Byers, 1995; Cherkas et al., 2004). Tem sido proposto que

células gliais periféricas contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática, principalmente de duas maneiras, pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e pela geração de disparos ectópicos. Especificamente, no modelo de constrição do nervo infraorbital, foi demonstrado aumento significativo no nível de IL-6 nos nervos lesionado e não lesionado, bem como, bilateralmente no complexo sensorial trigeminal, o qual se propõe estar relacionado com o desenvolvimento da hipernocicepção mecânica (Anderson e Rao, 2001).

Este conjunto de dados nos leva a sugerir que a participação das endotelinas na hipernocicepção mecânica possa ser decorrente da ativação de receptores  $ET_B$  presentes em células gliais periféricas, e possivelmente envolva a liberação de citocinas inflamatórias. Neste sentido, já foi demonstrado que a ET-1, atuando em receptores  $ET_B$ , é capaz de ativar células de Schwann, e que a ativação de receptores  $ET_B$  em astrócitos induz a liberação de IL-6 e  $TNF\alpha$  (Mayer et al., 1999; Morga et al., 2000).

Diferentemente da hipernocicepção mecânica, a fase II do teste de formalina foi reduzida significativamente pelo bloqueio de receptores  $ET_A$ , mas não de receptores  $ET_B$ . Este teste foi realizado 20 dias após a cirurgia, período no qual também foram realizados os experimentos envolvendo estimulação mecânica (15 a 20 dias após a constrição). Neste período, tanto a expressão de receptores  $ET_A$ , como de receptores  $ET_B$ , está aumentada no gânglio do trigêmeo, o que sugere que a mediação desta resposta somente por receptores  $ET_A$  não é resultado simplesmente de uma *down-regulation* de receptores  $ET_B$ . Por outro lado, considerando que a resposta bifásica induzida pela injeção de formalina 2,5%, no lábio superior de animais não operados, é reduzida apenas

---

por antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> (Chichorro et al., dados não publicados), o pressuposto de que o tipo de receptor que medeia cada resposta depende da modalidade de estímulo utilizado, parece ser mais plausível.

Corroborando esta hipótese, neste estudo a participação das endotelinas na hipernocicepção a estímulos térmicos (frio e calor) envolveu a ativação dos dois tipos de receptores, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, diferentemente do que havia sido observado com a estimulação mecânica e química. Estes dois tipos de receptores foram detectados no gânglio do trigêmeo no período em que as respostas ao frio e ao calor foram avaliadas. No entanto, seus níveis de expressão não são significativamente diferentes entre animais constrictos e falso-operados.

Na hipernocicepção ao frio, os antagonistas não peptídicos seletivos, atrasentan e A-192621, reduziram parcialmente as respostas por até 150 min após sua administração. Contudo, o bloqueio simultâneo dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> com bosentan aboliu a hipernocicepção por 6 horas. Este efeito adicional do bosentan pode estar relacionado à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, e conseqüentemente atuar em sítios do sistema nervoso central, característica exclusiva deste antagonista (Patel et al., 1994; McAuley et al., 1996). A possibilidade de sinergismo entre as vias ativadas por receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> para explicar o efeito do bosentan parece ser menos provável, já que a associação dos antagonistas peptídicos (BQ-123 e BQ-788) não reflete uma somação dos seus efeitos anti-hiperalgésicos isolados.

Por outro lado, a participação das endotelinas na hipernocicepção ao calor parece envolver apenas mecanismos periféricos, uma vez que o bloqueio simultâneo dos receptores pela co-administração local dos antagonistas

peptídicos (BQ-123 e BQ-788) aboliu esta resposta, além de causar efeito mais prolongado que quaisquer dos antagonistas administrados separadamente. Em adição, o tratamento dos animais com um antagonista não peptídico seletivo para receptores  $ET_B$  (A-192621) elevou a resposta dos animais constrictos aos níveis basais e este efeito persistiu por mais de 2 h. Redução significativa, e até mesmo reversão transitória, da hipernocicepção ao calor também foram observadas com o tratamento dos animais com o antagonista não peptídico seletivo para receptores  $ET_A$ , atrasentan. O tratamento dos animais com bosentan não resultou em um efeito antinociceptivo de maior magnitude ou de maior duração do que aquele causado pelos antagonistas não peptídicos administrados separadamente. Pelo fato do bosentan ser o único antagonista utilizado neste estudo capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, este dado reforça a hipótese de que a ativação de receptores periféricos de endotelinas é mais importante na hipernocicepção ao calor.

Considerando este conjunto de resultados, não é possível explicar de modo simples os diferentes efeitos induzidos pelos antagonistas de receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  nas respostas à estimulação térmica, mecânica ou à formalina. No entanto, sabe-se que diferentes tipos de receptores são ativados em resposta a cada um destes estímulos, mas apenas alguns deles já estão bem caracterizados (e.g. TRPV1). Portanto, se as endotelinas forem capazes de interagir e/ou modular diferentemente estas moléculas, através da ativação de receptores distintos ( $ET_A$  ou  $ET_B$ ), o efeito resultante do bloqueio de cada um dos seus receptores também poderia ser diferente. Dentro deste contexto, recentemente demonstrou-se que a ET-1 é capaz de potencializar a atividade de receptores TRPV1 através da ativação de receptores  $ET_A$  (Plant et al.,

2006), o que esclareceria o envolvimento destes receptores na mediação da hipernocicepção térmica em diversos modelos (Menéndez et al., 2002; Baamonde et al., 2004a). Por outro lado e também recentemente, foi demonstrado que a alodinia mecânica induzida por ET-1 envolve a ativação de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e é prolongada pela ativação de receptores TRPV1 (Balonov et al., 2006). Portanto, as maneiras pelas quais as endotelinas interagem com essas moléculas, bem como os resultados destas interações, ainda precisam ser mais bem avaliados.

Aspectos que devem ser considerados quando se avalia substâncias com potencial para o tratamento de dores crônicas incluem a duração do seu efeito analgésico, bem como a sua biodisponibilidade por uma via que seja mais apropriada para o paciente. Neste estudo, foi demonstrado que a magnitude de redução da hipernocicepção ao frio pelo atrasentan e A-192621 foi semelhante após administração por via oral ou endovenosa. Com a administração oral, o início do efeito analgésico foi retardado, o que era previsto, porém a duração do efeito foi semelhante àquele obtido com a administração endovenosa do atrasentan, e mais prolongado do que àquele observado com a administração endovenosa do A-192621. Em adição, a administração repetida destes antagonistas (3 vezes, em intervalos de 24 h), após o estabelecimento da hipernocicepção ao frio, prolongou o efeito do A-192621 por 24 h além do término deste tratamento, enquanto que o efeito do atrasentan, após duas administrações, persistiu por mais 7 dias. Considerando que a meia vida plasmática destes antagonistas, após administração oral em ratos, é de aproximadamente 6 h (Wessale et al., 2002), o bloqueio persistente de receptores ET<sub>B</sub>, mas principalmente de receptores ET<sub>A</sub>, pode estar

relacionado tanto com a indução de uma analgesia de longa duração, possivelmente por ativação de sistemas inibitórios endógenos, bem como estar bloqueando algum mecanismo necessário para a manutenção da hipernocicepção. Considerando que animais tratados diariamente com atrasentan (5 doses), começando antes e durante o estabelecimento da hipernocicepção ao frio, desenvolveram normalmente esta resposta, não parece provável que o bloqueio persistente dos receptores  $ET_A$  esteja interferindo com o desenvolvimento da hipernocicepção. Entretanto, independente do mecanismo envolvido neste efeito, este resultado é importante, principalmente, por se tratar de um modelo de dor neuropática.

Tendo em vista as diferenças na densidade da localização de receptores de endotelina entre animais constrictos e não operados, pode-se sugerir que a hipernocicepção causada por administração de ET-1 exógena, bem como as ações das endotelinas endógenas na hipernocicepção induzida por constrição do nervo infraorbital, não sejam mediadas por receptores presentes nas mesmas sub-populações de fibras. Enquanto que os receptores que medeiam as ações da ET-1 exógena ainda precisam ser caracterizados, a hipernocicepção induzida por constrição do nervo infraorbital envolve a ativação de ambos receptores de endotelina, somente  $ET_B$  e somente  $ET_A$  aos estímulos térmico, mecânico e químico, respectivamente. Apesar de uma única dose do antagonista de receptores  $ET_A/ET_B$  bosentan não ter sido efetiva em controlar ataques de enxaqueca em pacientes (May et al., 1996), a eficácia do bloqueio dos receptores de endotelina em reduzir a hipernocicepção a estímulos térmico, químico e principalmente mecânico induzida por constrição do nervo infraorbital sugere que estes receptores possam constituir alvos

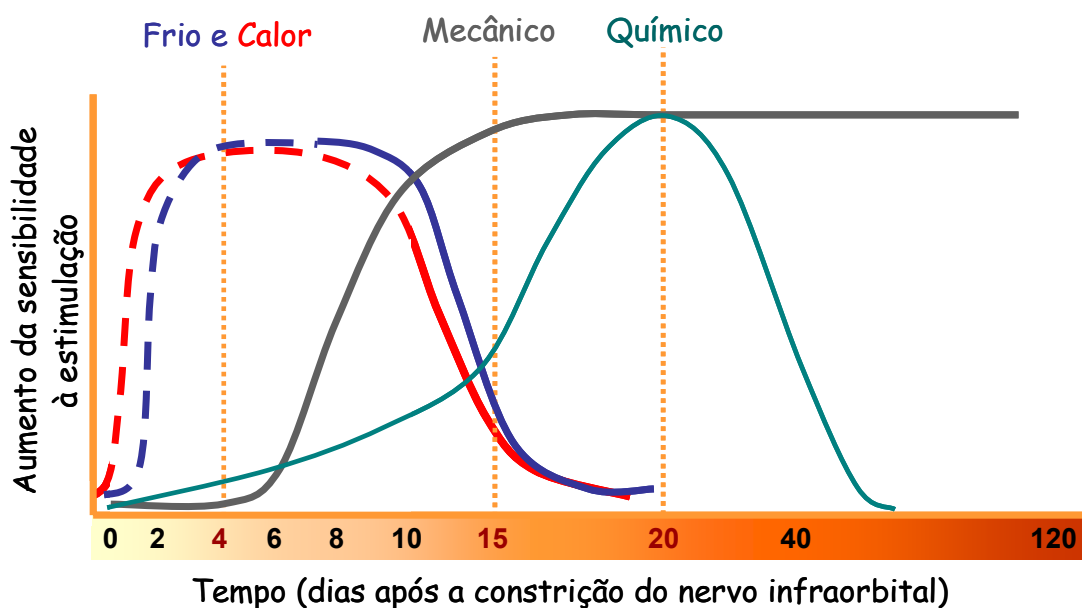


terapêuticos potencialmente relevantes para o controle da dor neuropática trigeminal.

## 6. Conclusão

---

✓ A constrição unilateral do nervo infraorbital de ratos induziu hipernocicepção à estimulação mecânica, térmica e química da região orofacial com decursos temporais distintos (Esquema 1).



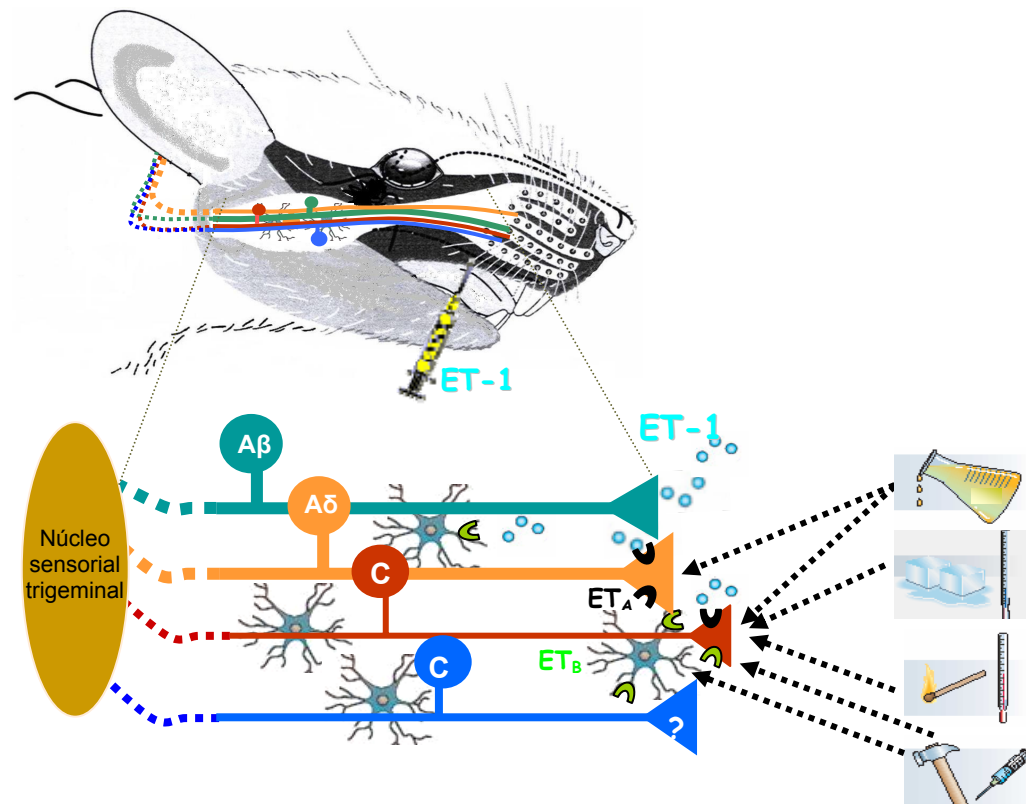
**Esquema 1 - Decurso temporal da hipernocicepção orofacial a estímulos mecânicos, térmicos e químicos induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos.** As linhas pontilhadas indicam o período em que os animais foram testados nos experimentos posteriores. A porção tracejada das curvas do frio e do calor indica o período em que estas respostas são mediadas por fibras sensíveis à capsaicina.

✓ A hipernocicepção térmica induzida por constrição do nervo infraorbital foi sensível ao tratamento com anticonvulsivantes, mas pouco sensível à dexametasona e resistente ao tratamento com AINEs. Tanto a hipernocicepção térmica quanto a mecânica foram reduzidas pelo tratamento com cloridrato de morfina e cloridrato de lidocaína. A suscetibilidade destas respostas a estes tratamentos denota o caráter neuropático deste modelo (Esquema 2).

TRATAMENTO	HIPERNOCICEPÇÃO		
	Frio	Calor	Mecânico
Indometacina	↔	↔	?
Celecoxibe	↔	↔	?
Dexametasona	↓	↓	?
Carbamazepina	↓	↓	↔
Oxcarbazepina	↓	↓	↔
Gabapentina	↓	↓	↔
Morfina	↓	↓	↓
Lidocaína	↓	↓	↓

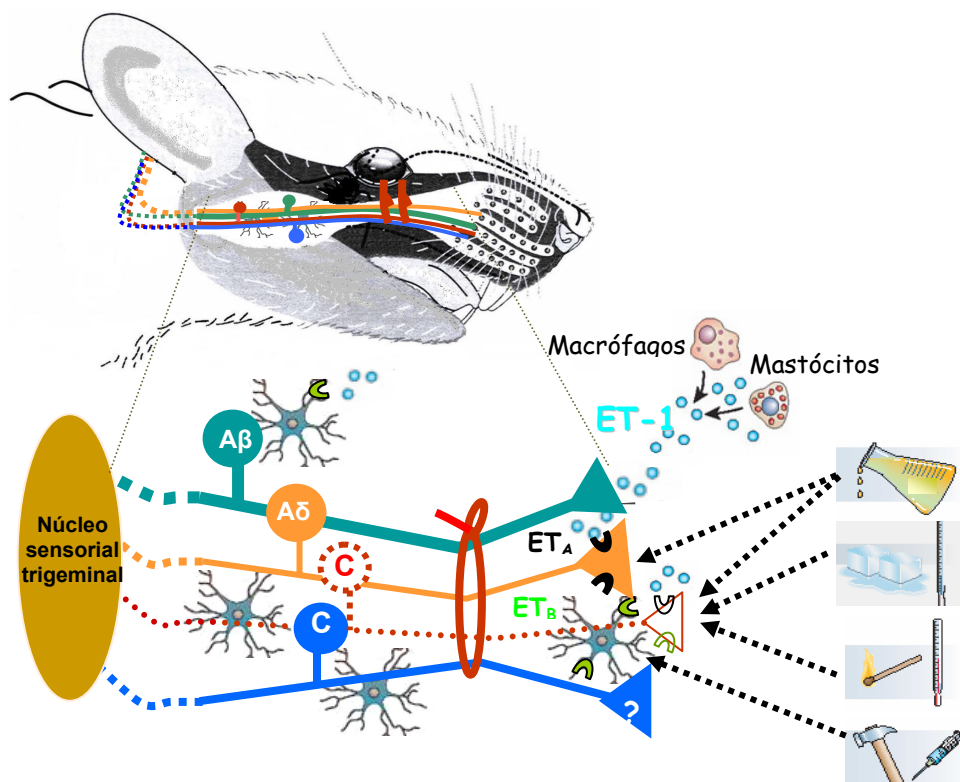
**Esquema 2 - Influência de diferentes tratamentos na hipernocicepção térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital.** Os símbolos ↓, ↔ e ? indicam redução, sem alteração ou não avaliado, respectivamente.

✓ A administração de ET-1 no lábio superior de animais não operados induziu hipernocicepção a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Os receptores que medeiam as ações da ET-1, com exceção da hipernocicepção ao estímulo químico, que é mediada apenas por ativação de receptores ET<sub>A</sub>, ainda precisam ser investigados (Esquema 3).



**Esquema 3 - Localização dos receptores envolvidos na hipernociceção a estímulos mecânicos, térmicos e químicos induzida por administração de ET-1 no lábio superior de ratos não operados.** A hipernociceção térmica (ao frio e ao calor) induzida por ET-1 pode ser mediada por receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, visto que ambos foram detectados em fibras C. A hipernociceção mecânica pode ser causada tanto por ativação direta de receptores ET<sub>A</sub> e/ou ET<sub>B</sub> presentes em nociceptores polimodais (fibras C e Aδ) quanto indiretamente, pela ativação de receptores ET<sub>B</sub> presentes em células da glia. A hipernociceção à formalina envolve somente ativação de receptores ET<sub>A</sub>, e estes estão presentes nos dois tipos de fibras que medeiam esta resposta (C e Aδ).

- ✓ A hipernocicepção a estímulos térmicos (frio e calor) induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos foi substancialmente reduzida pelo bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> e/ou ET<sub>B</sub>. Em contraste, a hipernocicepção a estímulos mecânicos só foi reduzida por antagonistas de receptores ET<sub>B</sub>, enquanto que a hipernocicepção a estímulos químicos envolveu somente a ativação de receptores ET<sub>A</sub>.
- ✓ A constrição do nervo infraorbital não alterou significativamente a expressão dos receptores de endotelina em gânglios do trigêmeo coletados 4 dias após a cirurgia, no entanto causou um aumento da expressão de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> 15 dias após a constrição.
- ✓ Com relação à localização dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em gânglios de animais constrictos há 4 dias, a presença de ambos já não é mais tão nítida em fibras do tipo C não peptidérgicas, que também são menos evidentes. Sua presença em fibras C peptidérgicas ainda precisa ser investigada. No entanto, a co-localização de receptores ET<sub>A</sub> e fibras A, bem como de receptores ET<sub>B</sub> e células da glia permanece bastante clara (Esquema 4).



**Esquema 4 - Participação das endotelinas através da ativação de receptores ET<sub>A</sub> e/ou ET<sub>B</sub> na hipernocicepção a estímulos mecânicos, térmicos e químicos induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos.** Receptores ET<sub>A</sub> presentes em fibras C não peptidérgicas e fibras A são possíveis mediadores da hipernocicepção a estímulos químicos. A hipernocicepção a estímulos térmicos pode ser mediada por ativação de receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> presentes em fibras C, tanto não peptidérgicas, onde ainda há indícios de co-localização após a constrição, quanto não peptidérgicas, onde não foi avaliada a presença destes receptores. Receptores ET<sub>B</sub> em células da glia podem estar mediando a hipernocicepção a estímulos mecânicos. Possíveis fontes de ET-1 endógena que induz tais respostas são macrófagos, mastócitos, células da glia e as próprias fibras aferentes primárias.

## 7. Referências Bibliográficas

---



Adams, C. B. T. Microvascular compression: an alternative view and hypothesis. **J. Neurosurg.**, 70:1-12, 1989.

Akopian, A. N.; Sivilotti, L.; Wood, J. N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. **Nature**, 379(6562):257-262, 1996.

Akopian, A. N.; Souslova, V.; England, S.; Okuse, K.; Ogata, N.; Ure, J.; Smith, A.; Kerr, B. J.; McMahon, S. B.; Boyce, S.; Hill, R.; Stanfa, L. C.; Dickenson, A. H.; Wood, J. N. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nat. Neurosci.**, 2(6):541-548, 1999.

Amaya, F.; Decosterd, I.; Samad, T. A.; Plumpton, C.; Tate, S.; Mannion, R. J.; Costigan, M.; Woolf, C. J. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. **Mol. Cell Neurosci.**, 15(4):331-42, 2000.

Ambrósio, A. F.; Soares-Da-Silva, P.; Carvalho, C. M.; Carvalho, A. P. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. **Neurochem. Res.**, 27(1-2):121-130, 2002.

Anderson, L. C.; Vakoula, A.; Veinote, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Arch. Oral Biol.**, 48:161-169, 2003.

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.

Baamonde, A.; Lastra, A.; Villazon, M.; Bordallo, J.; Hidalgo, A.; Menendez, 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.; Llamas, S.; Meana, A.; Hidalgo, A.; Menendez, L. Implantation of tumoral XC cells induces chronic, endothelin-dependent, thermal hyperalgesia in mice. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 24(2):269-281, 2004b.

Baba, H.; Ji, R. R.; Kohno, T.; Moore, K. A.; Ataka, T.; Wakai, A.; Okamoto, M.; Woolf, C. J. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. **Mol. Cell Neurosci.**, 24(3):818-830, 2003.

Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, 41: 849-857, 2004.

Bartlett, E. E.; Hutaserani, Q. Lidocaine (xylocaine) for the relief of postoperative pain. **J. Am. Med. Womens Assoc.**, 17:809-815, 1962.

Bautista, D. M.; Jordt, S. E.; Nikai, T.; Tsuruda, P. R.; Read, A. J.; Poblete, J.; Yamoah, E. N.; Basbaum, A. I.; Julius, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, 124(6):1269-1282, 2006.

Behrendt, H. J.; Germann, T.; Gillen, C.; Hatt, H.; Jostock, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay, **Br. J. Pharmacol.**, 141:737-745, 2004.

Bennett, G. J.; Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, 33:87-107, 1988.

Benoist, J. M.; Gautron, M.; Guilbaud, G. Experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve: changes in neuronal activities

---

in the somatosensory cortices corresponding to the infraorbital nerve. *Exp. Brain Res.*, 126(3):383-398, 1999.

Benoliel, R.; Eliav, E.; Tal, M. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 297:151-154, 2001.

Bergouignan, M. Anti-Epileptic Drugs in the Treatment of Essential Trigeminal Neuralgia. *Presse Med.*, 78(42):1832-1834, 1970.

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.*, epub ahead of print, 2006.

Bevan, S.; Hothi, S.; Hughes, G.; James, I. F.; Rang, H. P.; Shah, K.; Walpole, C. S.; Yeats, J. C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.*, 107(2):544-552, 1992.

Bian, D; Nichols, M.I.; Ossipov, M.; Lai, J.; Porreca, F. Characterization of the Antiallodynic Efficacy of Morphine in a Model of Neuropathic Pain In Rats. *Neuroreport*, 199:87-90, 1995.

Biggs, J. E.; Yates, J. M.; Loescher, A. R.; Clayton, N. M.; Boissonade, F. M.; Robinson, P. P. Changes in vanilloid receptor 1 (TRPV1) expression following lingual nerve injury. *Eur. J. Pain*, 2006, Epub ahead of print.

Blom S. Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). *Lancet*, 1:839-40, 1962.

Bongenhielm, U.; Boissonade, F. M.; Westermarck, A.; Robinson, P. P.; Fried, K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain*, 82:283-288, 1999.

---

Boucher, T. J.; Okuse, K.; Bennett, D. L.; Munson, J. B.; Wood, J. N.; McMahon, S. B. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. **Science**, 290(5489):124-127, 2000.

Brändli, P.; Loffler, B. M.; Brey, V.; Osterwalder, R.; Maire, J.P.; Clozel, M. Role Of Endothelin In Mediating Neurogenic Plasma Extravasation In Rat Dura Mater. **Pain**, 64:315-322, 1996.

Bremnes, T.; Paasche, J. D.; Mehlum, A.; Sandberg, C.; Bremnes, B.; Attramadal, H. Regulation And Intracellular Trafficking Pathways Of The Endothelin Receptors. **J. Biol. Chem.**, 275(23)17596-17604, 2000.

Breese, N. M.; George, A. C.; Pauers, L. E.; Stucky, C. L. Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. **Pain**, 115 (1-2): 37-49, 2005.

Brodal, A. Neurological anatomy in relation to clinical medicine, 3 ed., Oxford University Press, New York, 1981.

Burchiel, K. J. Carbamazepine inhibits spontaneous activity in experimental neuromas. **Exp. Neurol.**, 102(2):249-253, 1988.

Burgess, P. R.; Perl, E. R. Cutaneous Mechanoreceptors and Nociceptors. In Iggo, A Handbook of Sensory Physiology, Somatosensory System, v. 2, Springer, Berlin, 1973, pp. 271-314.

Calvin, W. H.; Loeser, J. D.; Howe, J.F. A neurophysiological theory for the pain mechanism of tic douloureux. **Pain**, 3(2):147-154, 1977.

Carasso, R. L.; Yehuda, S.; Streifler, M. Clomipramine and amitriptyline in the treatment of severe pain. *Int. J. Neurosci.*, 9(3):191-194, 1979.

---

Carrazana, E.; Mikoshiba, I. Rationale and evidence for the use of oxcarbazepine in neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage.** 25(5):S31-S35, 2003.

Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824, 1997.

Ceseña, R. M.; Calcutt, N. A. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. **Neurosci. Lett.**, 262(2):101-104, 1999.

Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Shafer, S. L.; Yaksh, T. L. Prolonged alleviation of tactile allodynia by intravenous lidocaine in neuropathic rats. **Anesthesiol.**, 83(4):775-785, 1995.

Chen, Y.; Devor, M. Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. **Eur. J. Pain**, 2(2):165-178, 1998.

Chen, Q.; King, T.; Vanderah, T. W.; Ossipov, M. H.; Malan, T. P. Jr.; Lai, J.; Porreca, F. Differential blockade of nerve injury-induced thermal and tactile hypersensitivity by systemically administered brain-penetrating and peripherally restricted local anesthetics. **J. Pain**, 5(5):281-289, 2004.

Cheng, J. K.; Chiou, L. C. Mechanisms of the Antinociceptive Action of Gabapentin. **J. Pharmacol. Sci.**, 2006, Epub ahead of print.

Cherkas, P. S.; Huang, T. Y.; Pannicke, T.; Tal, M.; Reichenbach, A.; Hanani, M. The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. **Pain**, 110(1-2):290-298, 2004.

Cheshire, W. P. Jr. Defining the role for gabapentin in the treatment of trigeminal neuralgia: a retrospective study. **J. Pain**, 3(2):137-142, 2002.

Chiang, C. Y.; Dostrovsky, J. O.; Sessle, B. J. Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. **Brain Res.**, 544(1):71-78, 1991.

Chizh, B. A.; Headley, P. M. NMDA antagonists and neuropathic pain--multiple drug targets and multiple uses. **Curr. Pharm. Des.**, 11(23):2977-94, 2005.

Christensen, D.; Gautron, M.; Guilbaud, G.; Kayser, V. Effect of gabapentin and lamotrigine on mechanical allodynia-like behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Pain**, 93:147-153, 2001.

Christensen, D.; Idanpaan-Heikkila, J. J.; Guilbaud, G.; Kayser, V. The antinociceptive effect of combined systemic administration of morphine and the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 in a rat model of peripheral neuropathy. **Br. J. Pharmacol.**, 125(8):1641-1650, 1998.

Christoph, T.; Schiene, K.; Englberger, W.; Parsons, C. G.; Chizh, B. A. The antiallodynic effect of NMDA antagonists in neuropathic pain outlasts the duration of the in vivo NMDA antagonism. **Neuropharmacol.**, 2006, Epub ahead of print.

Chuang, H. H.; Neuhausser, W. M.; Julius, D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. **Neuron**, 43(6):859-869, 2004.

Chuang, H. H.; Prescott, E. D.; Kong, H.; Shields, S.; Jordt, S. E.; Basbaum, A. L.; Chao, M. V.; Julius, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. **Nature**, 411 (6840): 957-962, 2001.

Clapham, D. E., Montell, C.; Schultz, G.; Julius, D. International Union of Pharmacology. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of

---

voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. **Pharmacol. Rev.**,55(4):591-596, 2003.

Clatworthy, A. L.; Illich, P. A., Castro, G. A.; Walters, E. T. Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, 184(1):5-8, 1995.

Clavelou, P.; Dallel, R.; Orliaguet, T.; Woda, A.; Raboisson, P. The Orofacial Formalin Test in Rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, 62(3):295-301, 1995.

Cohen, K. L.; Harris, S. Efficacy and safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the therapy of diabetic neuropathy. **Arch. Intern. Med.**, 147(8):1442-1444, 1987.

Colburn, R. W.; DeLeo, J. A. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Brain Res. Bull.**, 49(6):419-427, 1999.

Colburn, R. W.; Deleo, J. A.; Rickman, A. J.; Yeager, M. P.; Kwon, P.; Hickey, W. F. Dissociation of Microglial Activation and Neuropathic Pain Behaviors Following Peripheral Nerve Injury in the Rat. **J. Neuroimmunol.**, 79(2):163-75, 1997.

Coyle, D. E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia**, 23(1):75-83, 1998.

Cummins, T. R.; Waxman, S. G. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. **J. Neurosci.**, 17(10):3503-3514, 1997.

Cunha, F. Q.; Poole, S.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 107(3):660-664, 1992.

Cunha, T.M.; Verri, W. A. Jr, Vivancos, G. G.; Moreira, I. F.; Reis, S.; Parada, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(3):401-407, 2004.

Da Cunha, J. M.; Rae, G. A.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. de Q. Endothelins Induce ETB Receptor-Mediated Mechanical Hypernociception In Rat Hindpaw: Roles Of Camp And Protein Kinase C. **Eur. J. Pharmacol.**, 501(1-3):87-94, 2004.

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.

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.

Darian-Smith, I.; Isbister, J.; Mok, H. Somatic sensory cortical projection areas excited and tactile stimulation of the cat: a triple representation. **J. Physiol.**, 182(3):671-89, 1966.

Davar, G.; Hans, G.; Fareed, M.U.; Sinnott, C.; Strichartz, G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **Neuroreport**, 9:2279-2283, 1998.

Davis, K. D.; Pope, G. E. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. **Pain**, 98(1-2):179-185, 2002.



---

De Bosscher, K.; Vanden Berghe, W.; Haegeman, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **J. Neuroimmunol.**, 109:16-22, 2000.

DeLeo, J. A.; Colburn, R. W.; Rickman, A. J. Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. **Brain Res.**, 759(1):50-57, 1997.

Delzell, J. E. Jr, Grelle, A. R. Trigeminal neuralgia. New treatment options for a well-known cause of facial pain. **Arch. Fam. Med.**, 8(3):264-8, 1999.

De-Melo, J. D.; Tonussi, C. R.; D'Orléans-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, 1998a.

De-Melo, J. D.; Tonussi, C. R.; D'Orleans-Juste, P.; Rae, G. A. Effects of endothelin-1 on inflammatory incapacitation of the rat knee joint. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 31 (1) S518:520, 1998b.

Devor, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J. Pain**, 7(1):S3-S12, 2006.

De Vry, J.; Kuhl, E.; Franken-Kunkel, P.; Eckel, G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 491(2-3):137-148, 2004.

Dickenson, A. H.; Chapman, V.; Green, G. M. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **Gen. Pharmacol.**, 28(5):633-638, 1997.

Dickenson, A. H.; Matthews, E. A.; Suzuki, R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. **Eur. J. Pain.**, 6: 51-60, 2002.

Dickenson, A.H.; Suzuki, R. Opioids in neuropathic pain: clues from animal studies. **Eur. J. Pain**, 9(2):113-6, 2005.

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

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75(2):125-123, 1995.  
Dubner, R.; Bennet, G.J. Spinal and Trigeminal Mechanisms of Nociception. **Ann. Rev. Neurosci.**, 6: 381-418, 1983.

Dubovy, P.; Jancalok, R.; Klusakova, I.; Svizenska, I.; Pejchalova, K. Intra- And Extraneuronal Changes of Immunofluorescence Staining for TNF- And TNFR1 in the Dorsal Root Ganglia of Rat Peripheral Neuropathic Pain Models. **Cell Mol. Neurobiol.**, 2006, Epub Ahead of Print.

Dubuisson, D.; Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4(2):161-174, 1977.

Durrenberger, P. F.; Facer, P.; Casula, M. A., Yiangou, Y.; Gray, R. A.; et al. Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. **BMC Neurol.**, 6:1-11, 2006.

Ehrenreich, H.; Anderson R.W.; Fox, C. H.; Rieckmann, P.; Hoffman, G. S.; Travis, W. D.; Coligan, G. E.; Kehrl, J. H.; Fauci, A. S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **J. Exp. Med.**, 172:1741-1748, 1990.

Ehrenreich, H.; Burd, P. R.; Rottem, M.; Hültner, L.; Hylton, J. B.; Garfield, M. Coligan, J. E.; Metcalfe, D. D.; Fauci, A. S. Endothelins belong to the

assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. **New Biol.**, 4:147:156, 1992.

Epstein, J. B.; Marcoe, J. H. Topical application of capsaicin for treatment of oral neuropathic pain and trigeminal neuralgia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, 77(2):135-140, 1994.

Ferreira, S. H.; Romitelli, M.; De Nucci, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 13(3): S220-S222, 1989.

Fields, H. L. Treatment of trigeminal neuralgia. **N. Engl. J. Med.**, 334(17):1125-1126, 1996.

Fox, A.; Gentry, C.; Patel, S.; Kesingland, A.; Bevan, S. Comparative activity of the anti-convulsants oxcarbazepine, carbamazepine, lamotrigine and gabapentin in a model of neuropathic pain in the rat and guinea-pig. **Pain**, 105(1-2):355-362, 2003.

Fried, K.; Bongenhielm, U.; Boissonade, F. M.; Robinson, P. P. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist**, 7(2):155-165, 2001.

Fukuroda, T.; Kobayashi, M.; Ozaki, S.; Yano, M.; Miyauchi, T.; Onizuka, M.; Sugishita, Y.; Goto, K.; Nishikibe, M. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. **J. Appl. Physiol.**, 76(5):1976-82, 1994.

Fusco, B. M.; Alessandri, M. Analgesic effect of capsaicin in idiopathic trigeminal neuralgia. **Anesth. Analg.**, 74(3):375-377, 1992.

Gallai, V.; Sarchielli, P.; Firenze, C.; Trequattrini, A.; Paciaroni, M.; Usai, F.; Palumbo, R. Endothelin-1 in migraine and tension-type headache. **Acta Neurol. Scand.**, 89(1):47-55, 1994.

Gilron, I.; Booher, S. L.; Rowan, J.S.; Max, M. B. Topiramate in trigeminal neuralgia: a randomized, placebo-controlled multiple crossover pilot study. **Clin. Neuropharmacol.**, 24(2):109-112, 2001.

Gilron, I.; Booher, S. L.; Rowan, M. S.; Smoller, M. S.; Max, M. B. A randomized, controlled trial of high-dose dextromethorphan in facial neuralgias. **Neurol.**, 55(7):964-971, 2000.

Gobel, S.; Falls, W. M.; Humphrey, E. Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. **J. Neurosci.**, 1(10):1163-79, 1981.

Gokin, A.P.; Fareed, M.U.; Pan, H.L.; Hans, G.; Strichartz, G.R.; Davar, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. **J. Neurosci.**, 21: 5358-5366, 2001.

Goto, K. Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. **Biol. Pharm. Bull.**, 24(11):1219-30, 2001.

Goto, F.; Ishizaki, K.; Yoshikawa, D.; Obata, H.; Arii, H.; Terada, M. The long lasting effects of peripheral nerve blocks for trigeminal neuralgia using high concentration of tetracaine dissolved in bupivacaine. **Pain**, 79(1):101-103, 1999.

Greene, E. C. Anatomy of the rat. New York: Hafner, 1955.

Grelik, C.; Bennett, G. J.; Ribeiro-da-Silva, A. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. **Eur. J. Neurosci.**, 21(9):2475-8, 2005.

Griswold, D. E.; Douglas, S. A.; Martin, L. D.; Davis, T. G.; Davis, L.; 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.

Hammarberg, H.; Piehl, F.; Cullheim, S.; Fjell, J.; Hokfelt, T.; Fried, K.; GDNF mRNA in Schwann cells and DRG satellite cells after chronic sciatic nerve injury. **Neuroreport**, 7(4):857-60, 1996.

Hanani, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res.* **Brain Res. Rev.**, 48(3):457-476, 2005.

Hao, J.X.; Yu, W.; Xu, X. J.; Wiesenfeld-Hallin, Z. Capsaicin-sensitive afferents mediate chronic cold, but not mechanical, allodynia-like behavior in spinally injured rats, **Brain Res.**, 722: 177-180, 1996.

Hasue, F.; Kuwaki, T.; Kisanuki, Y.Y.; Yanagisawa, M.; Moriya, H.; Fukuda, Y.; Shimoyama, M. Increased sensitivity to acute and persistent pain in neuron-specific endothelin-1 knockout mice. **Neuroscience**, 130(2):349-58, 2005.

Hefferan, M. P.; Carter, P.; Haley, M.; Loomis, C. W. Spinal nerve injury activates prostaglandin synthesis in the spinal cord that contributes to early maintenance of tactile allodynia. **Pain**, 101(1-2):139-147, 2003.

Hiura A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons, **Arch. Histol. Cytol.**, 63 :199-215, 2000.

Hoffmann, K. D.; Matthews, M. A. Comparison of sympathetic neurons in orofacial and upper extremity nerves: implications for causalgia. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 48(7):720-726, 1990.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43:143-201, 1991.

Hong, S.; Wiley, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. **J. Biol. Chem.**, 280(1): 618-627, 2005.

Horigome, K.; Pryor, J. C.; Bullock, E. D.; Johnson, E. M. Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. **J. Biol. Chem.**, 268(20):14881-14887, 1993.

Hosoda, K.; Hammer, R. E.; Richardson, J. A.; Baynash, A. G.; Cheung, J. C.; Giaid, A.; Yanagisawa, M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. **Cell**, 79(7):1267-1276, 1994.

Houck, S. C.; Khodorova, a.; Reale, M. A.; Strichartzb R. G.; Davar, G. Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate nocifensive responses to local administration of endothelin-1 in rats. **Pain**, 110(3):719-726, 2004.

Hunley, T. E.; Kon, V. Update on endothelins - biology and clinical implications. **Pediatr. Nephrol.**, 16(9):752-62, 2001.

Hunter, J. C.; Gogas, K. R.; Hedley, L. R.; Jacobson, L. O.; Kassotakis, L.; Thompson, J.; Fontana, D. J. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 324(2-3):153-160, 1997.

Hwang, S. W.; Cho, H.; Kwak, J.; et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 97:6155-6160, 2000.

Idanpaan-Heikkila, J. J.; Guilbaud, G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or

---

tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. **Pain**, 79:281-290, 1999.

Imamura, Y.; Kawamoto, H.; Nakanishi, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Exp. Brain Res.**, 116:97-103, 1997.

Ingvarlsen, B. K.; Laursen, H.; Olsen, U. B.; Hansen, A. J. Possible mechanism of c-fos expression in trigeminal nucleus caudalis following cortical spreading depression. **Pain**, 72(3):407-415, 1997.

Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Mitsui, Y.; Kobayashi, M.; Masaki, T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. **J. Biol. Chem.**, 264(25):14954-14959, 1989.

Jacquin, M. F.; Chiaia, N. L.; Rhoades, R. W. Trigeminal projections to contralateral dorsal horn: central extent, peripheral origins, and plasticity. **Somatosens. Mot. Res.**, 7(2):153-183, 1990.

Jacquin, M. F.; Hess, A.; Yang, G.; Adamo, P.; Math, M. F.; Brown, A.; Rhoades, R. W. Organization of the infraorbital nerve in rat: a quantitative electron microscopic study. **Brain Res.**, 290:131-135, 1984.

Jannetta, P. J. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. **J. Neurosurg.**, 26(1):159-162, 1967.

Jannetta, P. J. Neurovascular compression in cranial nerve and systemic disease. **Ann. Surg.**, 192(4):518-25, 1980.

Jarvis, M. F.; Wessale, J. L.; Zhu, C. Z.; Lynch, J. J.; Dayton, B. D.; Calzadilla, S. V.; Padley, R. J.; Opgenorth, T. J.; Kowaluk, E. A. ABT-627, an endothelin ET(A) receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 388:29-35, 2000.

Jasmin, L.; Kohan, L.; Franssen, M.; Janni, G.; Goff, JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain**, 75:367-82, 1998.

Jensen, M. P. Introduction: chronic pain studies of the lidocaine patch 5% using the Neuropathic Pain Scale. **Curr. Med. Res. Opin.**, 20(2):S1-4, 2002.

Jhaveri, M. D.; Elmes, S. J.; Kendall, D. A.; Chapman, V. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naive, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. **Eur. J. Neurosci.**, 22(2):361-370, 2005.

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.

Karai, L.; Brown, D. C.; Mannes, A. J.; Connelly, S. T.; Brown, J.; Gandal, M.; Wellisch, O. M.; Neubert, J. K.; Olah, Z.; Iadarola, M. J. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. **J. Clin. Invest.**, 113 (9):1344-1352, 2004.

Katsura, H.; Obata, K.; Mizushima, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Sakagami, M.; Noguchi, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp. Neurol.**, 2006, Epub ahead of print.

Katusic, S.; Beard, C. M.; Bergstralh, E.; Kurland, L. T. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Ann. Neurol.**, 27(1):89-95, 1990.

Katusic, S.; Williams, D. B.; Beard, C. M.; Bergstralh, E. J.; Kurland, L. T. Epidemiology and clinical features of idiopathic trigeminal neuralgia and



glossopharyngeal neuralgia: similarities and differences, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Neuroepidemiol.**, 10(5-6):276-81, 1991.

Kaupila, T.; Xu, X. J.; Yu, W.; Wiesenfeld-Hallin, Z. Dextromethorphan potentiates the effect of morphine in rats with peripheral neuropathy. **Neuroreport**, 9(6):1071-1074, 1998.

Kayser, V.; Aubel, B.; Hamon, M.; Bourgoin, S. The antimigraine 5-HT 1B/1D receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Br. J. Pharmacol.**, 137(8):1287-1297, 2002.

Kedzierski, R.M.; Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu. Rev. Pharmacol., Toxicol.**, 41:851-876, 2001.

Keenaghan, J. B.; Boyes, R. N. The tissue distribution, metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dogs and man. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 180(2):454-463, 1972.

Kerr, F. W. Evidence for a peripheral etiology of trigeminal neuralgia. **J. Neurosurg.**, 26(1):168-74, 1967.

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.

---

Kitano, Y.; Kurihara, H.; Kurihara, Y.; Maemura, K.; Ryo, Y.; Yazaki, Y.; Harii, K. Gene expression of bone matrix proteins and endothelin receptors in endothelin-1-deficient mice revealed by in situ hybridization. **J. Bone Miner. Res.**, 13:237-244, 1998.

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.

Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Tokunaga, A., Noguchi, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors, **J. Comp. Neurol.**, 493: 596-606, 2005.

Kwan, K. Y.; Allchorne, A. J.; Vollrath, M. A.; Christensen, A. P.; Zhang, D. S.; Woolf, C. J.; Corey, D. P. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**, 50(2):277-289, 2006.

Kwan, C. L.; Demaro, J. A.; Hu, J. W.; Jacquin, M. F.; Sessle, B. J. C-fiber depletion alters response properties of neurons in trigeminal nucleus principalis. **J. Neurophysiol.**, 81(2):435-446, 1999.

LaBuda, C. J.; Donahue, R.; Fuchs, P. N. Enhanced formalin nociceptive responses following L5 nerve ligation in the rat reveals neuropathy-induced inflammatory hyperalgesia. **Pain**, 94:59-63, 2001.

Lao, L. J.; Song, B.; Marvizon, J. C. Neurokinin release produced by capsaicin acting on the central terminals and axons of primary afferents: relationship with N-methyl-D-aspartate and GABA(B) receptors. **Neuroscience**, 121(3):667-680, 2003.

Lawson, S. N.; Morphological and Biochemical cell types of sensory neurons. In: *Sensory Neurons. Diversity Development and Plasticity*, Ed. P. Scott Oxford University Press, New York, 27-59, 1992.

Lee, Y. W.; Chaplan, S. R.; Yaksh, T. L. Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model. **Neurosci. Lett.**, 199(2):111-114, 1995.

Lekan, H. A.; Carlton, S. M.; Coggeshall, R. E. Sprouting of A beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. **Neurosci. Lett.**, 208:147-150, 1996.

Lindstrom, P.; Lindblom, U. The analgesic effect of tocainide in trigeminal neuralgia. **Pain**, 28(1):45-50, 1987.

Lisak, R. P.; Skundric, D.; Bealmear B.; Ragheb, S. The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. **J. Infect. Dis.**, 176 (2):S173-S179, 1997.

Liu, C. N.; Michaelis, M.; Amir, R.; Devor, M. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. **J. Neurophysiol.**, 84(1):205-215, 2000.

Liu, L.; Simon, S. A. Capsaicin and nicotine both activate a subset of rat trigeminal ganglion neurons. **Am. J. Physiol.**, 270:C1807-1814, 1996.

Liu, Z.; Song, Y.; Zhang, X.; Liu, Z.; Zhang, W.; Mao, W.; Wang, W.; Cui, W.; Zhang, X.; Jia, X.; Li, N.; Han, C.; Liu, C. Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 32(12):1049-1054, 2005.

---

Lunardi, G.; Leandri, M.; Albano, C.; Cultrera, S.; Fracassi, M.; Rubino, V.; Favale, E. Clinical effectiveness of lamotrigine and plasma levels in essential and symptomatic trigeminal neuralgia. **Neurol.**, 48(6):1714-1717, 1997.

Luo, Z. D.; Calcutt, N. A.; Higuera, E. S.; Valder, C. R.; Song, Y. H.; Svensson, C. I.; Myers, R. R. Injury type-specific calcium channel alpha 2 delta-1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 303(3):1199-1205, 2002.

Ma, W.; Eisenach, J. C. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, 15(6):1037-1047, 2002.

Mao, J.; Chen, L. L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. **Pain**, 87(1):7-17, 2000.

Mao, J.; Price, D. D.; Mayer, D. J. Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. **Pain**, 61(3):353-364, 1995.

Marais, E.; Klugbauer, N.; Hofmann, F. Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. **Mol. Pharmacol.**, 59(5):1243-1248, 2001.

Marfurt, C. F. The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. **J. Comp. Neurol.**, 203(4):785-798, 1981.

Martin, T. J.; Eisenach, J. C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 299(3):811-817, 2001.

---

Masaki, T., Vane, J.R. E Vanhoutte, P.M. V International Union of Pharmacology nomenclature for endothelin receptors, **Pharmacol. Rev.**, 46: 137-142, 1994.

Mason, L.; Moore, R. A.; Derry, S.; Edwards, J. E.; McQuay. H. J. Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. **BMJ.**, 328(7446):991, 2004.

Mathews, E. S.; Scrivani, S. J. Percutaneous stereotactic radiofrequency thermal rhizotomy for the treatment of trigeminal neuralgia. **Mt. Sinai J. Med.**, 67(4):288-299, 2000.

Mathisen, L. C.; Skjelbred, P.; Skoglund, L. A.; Oye, I. Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain. **Pain.** 61(12):215-220, 1995.

Max, M. B.; Schafer, S. C.; Culnane, M.; Dubner, R.; Gracely, R. H. Association of pain relief with drug side effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, ibuprofen, and placebo. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 43:363-371, 1988.

May, A.; Gijssman, H. J.; Wallnofer, A.; Jones, R.; Diener, H. C.; Ferrari, M. D. Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation but is not effective in aborting migraine attacks. **Pain**, 67:375-378, 1996.

Mckemy, D. D.; Neuhausser, W. M.; Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416:52-58, 2002.

McMahon, S.B.; Cafferty, W. B.; Marchand, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, 192(2):444-462, 2005.

---

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, 2002.

Menéndez, L.; Lastra, A.; Hidalgo, A.; Baamonde, A. Nociceptive reaction and thermal hyperalgesia induced by local endothelin-1 in mice: a behavioral and Fos study. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 367:28-34, 2003.

Milner, P.; Loesch, A.; Burnstock, G. Endothelin immunoreactivity and mRNA expression in sensory and sympathetic neurones following selective denervation. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 18:727-734, 2000.

Moalem G, Tracey DJ Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2005, Epub ahead of print.

Myers, R. R.; Campana, W. M.; Shubayev, V. I. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. **Drug Discov. Today**, 11(1-2):8-20, 2006.

Nagaro, T.; Shimizu, C.; Inoue, H.; Fujitani, T.; Adachi, N.; Amakawa, K.; Kimura, S.; Arai, T.; Watanabe, T.; Oka, S. The efficacy of intravenous lidocaine on various types of neuropathic pain. **Masui**, 44(6):862-867, 1995.

Nakamura, M.; Arakawa, N.; Yoshida, H.; Funakoshi, T.; Chiba, M.; Abe, Y.; Makita, S.; Aoki, H.; Hiramori, K. Increased plasma endothelin concentrations in patients with acute heart failure after myocardial infarction. **Jpn. Circ. J.**, 57(5):371-378, 1993.

Narita, M.; Ozaki, S.; Narita, M.; Ise, Y.; Yajima, Y.; Suzuki, T. Change in the expression of c-fos in the rat brain following sciatic nerve ligation. **Neurosci. Lett.**, 352(3):231-233, 2003.

Nichols, M. L.; Lopez, Y.; Ossipov, M. H.; Bian, D.; Porreca, F. Enhancement of the antiallodynic and antinociceptive efficacy of spinal morphine by antisera to dynorphin A (1-13) or MK-801 in a nerve-ligation model of peripheral neuropathy. **Pain**, 69(3):317-322, 1997.

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(7):447-453, 1993.

Nussdorfer, G. G.; Rossi, G. P.; Malendowicz, L. K.; Mazzocchi, G. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. **Pharmacol. Rev.**, 51:403-438, 1999.

Obata, K.; Katsura, H.; Mizushima, T.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Dai, Y.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Tominaga, M.; Noguchi, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin. Invest.**, 115 (9):2393-2401, 2005.

Obata, K.; Yamanaka, H.; Kobayashi, K.; Dai, Y.; Mizushima, T.; Katsura, H.; Fukuoka, T.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. **J. Neurosci.**, 24(45):10211-10222, 2004.

Ohtori, S.; Takahashi, K.; Moriya, H.; Myers, R. R. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. **Spine**, 29(10):1082-1088, 2004.

Opgenorth, T. J.; Adler, A. L.; Calzadilla, S. V.; Chiou, W. J.; Dayton, B. D.; Dixon, D. B.; Gehrke, L. J.; Hernandez, L.; et al. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 276: 473-481, 1996.

---

Ossipov, M. H.; Bian, D.; Malan, T. P. Jr.; Lai, J.; Porreca, F. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. **Pain**, 79(2-3):127-133, 1999.

Ossipov, M. H.; Lopez, Y.; Nichols, M. L.; Bian, D.; Porreca, F. The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. **Neurosci Lett.**, 199(2):87-90, 1995.

Padi, S. S.; Kulkarni, S. K. Differential effects of naproxen and rofecoxib on the development of hypersensitivity following nerve injury in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 79(2):349-358, 2004.

Pajot, J.; Pelissier, T.; Sierralta, F.; Raboisson, P.; Dallel, R. Differential effects of trigeminal tractotomy on A $\delta$ - and C-fiber-mediated nociceptive responses, **Brain Res.**, 863:289-292, 2000.

Pan, H. L.; Khan, G. M.; Alloway, K. D.; Chen, S. R. Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. **J. Neurosci.**, 23(7):2911-2919, 2003.

Parsons, C. G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 429(1-3):71-78, 2001.

Patel, T.R.; McAuley, M.A.; McCulloch, J. Effects on feline pial arterioles in situ of bosentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 260:65-71, 1994.

Pauwels, P. J.; John, G. W. Present and future of 5-HT receptor agonists as antimigraine drugs. **Clin. Neuropharmacol.**, 22(3):123-136, 1999.



---

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, L., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, 108: 705-715, 2002.

Pelissier, T.; Pajot, J.; Dallel, R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. **Pain**, 96(1-2):81-87, 2002.

Perkins, N. M.; Tracey, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, 101(3):745-757, 2000.

Pertovaara, A.; Wei, H.; Hamalainen, M. M. Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats. **Neurosci. Lett.**, 218(2):127-130, 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 component of bone Cancer pain. **Neuroscience**, 126:1043-1052, 2004.

Pfaller, K.; Arvidsson, J. Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin. **J. Comp. Neurol.**, 268(1):91-108, 1988.

Piao, Z. G.; Cho, I. H.; Park, C. K.; Hong, J. P.; Choi, S. Y.; Lee, S. J.; Lee, S.; Park, K.; Kim, J. S.; Oh, S. B. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. **Pain**, 121(3):219-231, 2006.

Piehl, F.; Lidman, O. Neuroinflammation in the rat - CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. **Immunol. Rev.**, 184:212-225, 2001.

Piovezan, A. P.; D'Orleans-Juste, 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'orléans-Juste, P.; Tonussi, C.R.; Rae, G. A. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can. J. Pharmacol.**, 75:596-600, 1997.

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.

Pud, D.; Eisenberg, E.; Spitzer, A.; Adler, R.; Fried, G.; Yarnitsky, D. The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial. **Pain**, 75(2-3):349-354, 1998.

Puig, S., Sorkin, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, 64(2):345-355, 1996.

Quasthoff, S.; Grosskreutz, J.; Schroder, J. M.; Schneider, U.; Grafe, P. Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. **Neuroscience**, 69(3):955-65, 1995.

Raffa, R.B.; Jacoby, H. I. Endothelin-1, -2, -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. **Life Sci.**, 48:85-90, 1991.

Raffa, R.B.; Schupsky, J. J.; Jacoby, H. I. Characterization of endothelin-induced nociception in mice: evidence for a mechanistically distinct analgesic. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278: 1-7, 1996a.

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, 1996b.

Raghavendra, V.; Tanga, F.; DeLeo, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 306(2):624-630, 2003.

Raghavendra, V.; Tanga, F.; Rutkowski, M. D.; DeLeo, J. A. Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. **Pain**, 104(3):655-664, 2003.

Randic, M.; Hecimovic, H.; Ryu, P. D. Substance P modulates glutamate-induced currents in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurones. **Neurosci. Lett.**, 117(1-2):74-80, 1990.

Remuzzi, G.; Perico, N.; Benigni, A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 1(12):986-1001, 2002.

Rockliff, B. W.; Davis, E. H. Controlled sequential trials of carbamazepine in trigeminal neuralgia. **Arch. Neurol.**, 15(2):129-136, 1966.

Rogawski, M. A.; Loscher, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat. Rev. Neurosci.**, 5(7):553-564, 2004

Rosland, J. H.; Tjolsen, A.; Maehle, B.; Hole, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, 42(2):235-242, 1990.

Roy, M. L.; Narahashi, T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci.**, 12(6):2104-2111, 1992.

---

Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K.; Masaki, T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, 348(6303):732-735, 1990.

Samad, T. A.; Sapirstein, A.; Woolf, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol. Med.**, 8:390-396, 2002.

Schafers, M.; Marziniak, M.; Sorkin, L. S.; Yaksh, T. L.; Sommer, C. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp. Neurol.**, 185(1):160-168, 2004.

Scrivani, S. J.; Mathews, E. S.; Maciewicz, R. J. Trigeminal neuralgia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 100(5):527-538, 2005.

Sessle, B. J. Neurophysiology of orofacial pain. **Dent. Clin. North Am.**, 31(4):595-613, 1987.

Sessle, B. J. Mechanisms of trigeminal and occipital pain. **Pain**, 3:91-116, 1996.

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.

Sessle, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol.**, 71(4):117-36, 2005.

Shamash, S.; Reichert, F.; Rotshenker, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **J. Neurosci.**, 22(8):3052-3060, 2002.

---

Shir, Y.; Seltzer, Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. **Neurosci. Lett.**, 115: 62-67, 1990.

Sindrup, S. H.; Jensen, T. S. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. **Clin. J. Pain.**, 18(1):22-7, 2002.

Sindrup, S. H.; Otto, M.; Finnerup, N. B. Jensen, T. S. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 96(6):399-409, 2005.

Smart, D.; Gunthorpe, M. J.; Jerman, J. C.; et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). **Br. J. Pharmacol.**, 129:227-230, 2000.

Soderpalm, B. Anticonvulsants: aspects of their mechanisms of action. **Eur. J. Pain**, 6:3-9, 2002.

Sokolovsky, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmac. Ther.**, 68:435-471, 1995.

Sommer, C.; Galbraith, J. A.; Heckman, H. M.; Myers, R. R. Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 52:223-233, 1993.

Stajcic, Z.; Juniper, R. P.; Todorovic, L. Peripheral streptomycin/lidocaine injections versus lidocaine alone in the treatment of idiopathic trigeminal neuralgia. A double blind controlled trial. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, 18(6):243-246, 1990.

Stephenson, J. L.; Byers, M. R. GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after tooth injury in rats. **Exp. Neurol.**, 131(1):11-22, 1995.

---

Stewart, J. T.; Nisbet, J. A.; Davies, M. J. Plasma endothelin in coronary venous blood from patients with either stable or unstable angina. **Br. Heart J.**, 66(1):7-9, 1991.

Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D.A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegla, T.; Bevan, S.; Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112:819–829, 2003.

Sweet, W. H. The treatment of trigeminal neuralgia (tic douloureux). **N. Engl. J. Med.**, 315(3):174-177, 1986.

Syriatowicz, J. P.; Hu, D; Walker, J. S.; Tracey, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, 94(2):587-594, 1999.

Takahashi, M.; Kawaguchi, M.; Shimada, K.; Nakashima, T.; Furuya, H. Systemic meloxicam reduces tactile allodynia development after L5 single spinal nerve injury in rats. **Reg. Anesth. Pain Med.**, 30(4):351-355, 2005.

Tal, M.; Bennett, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**, 57(3):375-82, 1994.

Tal, M.; Devor, M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. **Brain Res.**, 579(1):148-151, 1992.

Tandrup, T.; Woolf, C. J.; Coggeshall, R. E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. **J. Comp. Neurol.**, 422(2):172-180, 2000.

Tanga, F. Y.; Raghavendra, V.; DeLeo, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem. Int.**, 45(2-3):397-407, 2004.

Tanga, F. Y.; Raghavendra, V.; Nutille-McMenemy, N.; Marks, A.; Deleo, J. A.; Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. **Neuroscience**, 140(3):1003-1010, 2006.

Taylor, C. P.; Gee, N. S.; Su, T. Z.; Kocsis, J. D.; Welty, D. F.; Brown, J. P.; Dooley, D. J.; Boden, P.; Singh, L. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. **Epilepsy Res.**, 29(3):233-249, 1998.

Tomson, T.; Tybring, G.; Bertilsson, L.; Ekbom, K.; Rane, A. Carbamazepine therapy in trigeminal neuralgia: clinical effects in relation to plasma concentration. **Arch Neurol.**, 37(11):699-703, 1980.

Truini, A.; Galeotti, F.; Cruccu, G. New insight into trigeminal neuralgia. **J. Headache Pain**, 6(4):237-239, 2005.

Tsai, Y. C.; Won, S. J.; Lin, M. T. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. **Pain**, 88(2):155-160, 2000.

Turp, J. C.; Gobetti, J. P. Trigeminal neuralgia versus atypical facial pain. A review of the literature and case report. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 81(4):424-32, 1996.

Usunoff, K. G.; Marani, E.; Schoen, J. H. R. The trigeminal system in man. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, 136:1-126, 1997.

Vanderah, T. W.; Gardell, L. R.; Burgess, S. E.; Ibrahim, M.; Dogrul, A.; Zhong, C. M.; Zhang, E. T.; Malan, T. P. Jr.; Ossipov, M. H.; Lai, J.; Porreca, F. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **J. Neurosci.**, 20(18):7074-7079, 2000.

---

Vanderah, T. W.; Suenaga, N. M.; Ossipov, M. H.; Malan, T. P. Jr. Lai, J.; Porreca, F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. **J. Neurosci.**, 21(1):279-286, 2001.

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 ETB receptors in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 315(2):609-615, 2005.

Verri, W. A. Jr, Schivo, I. R.; Cunha, T. M.; Liew, F. Y.; Ferreira, S. H. ; Cunha, F. Q. Interleukin-18 Induces Mechanical Hypernociception in Rats via Endothelin Acting on ETB Receptors in a Morphine-Sensitive Manner. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 310(2):710-717, 2004.

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, 1998, p. 1637-2098.

Vos, B. P.; Benoist, J. M.; Gautron, M.; Guilbaud, G. Changes in neuronal activities in the two ventral posterior medial thalamic nuclei in an experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve. **Somatosens. Mot. Res.**, 17(2):109-122, 2000.

Vos B. P.; Maciewicz R. J. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain, Amsterdam: Elsevier, 1991, pp. 147-158.

Vos, B. P.; Strassman, A. M.; Maciewicz, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **J. Neurosci.**, 14:2708-2723, 1994.



---

Wacnik, P. W.; Eikmeier, L. J.; Ruggles, T. R.; Ramnaraine, M. L.; Walcheck, B. K.; Beitz, A. J.; Wilcox, G. L. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. **J. Neurosci.**, 21:9355-9366, 2001.

Walker, K. M.; Urban, L.; Medhurst, S. J.; Patel, S.; Panesar, M.; Fox, A.J.; McIntyre, P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 304(1):56-62, 2003.

Watkins, L.R.; Maier, S.F. E Goehler, L.S. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, 63:289-302, 1995.

Waxman, S. G.; Cummins, T. R.; Dib-Hajj, S.; Fjell, J.; Black, J. A. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, 22(9):1177-1187, 1999.

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

Weber, H.; Holme, I.; Amlie, E. The natural course of acute sciatica with nerve root symptoms in a double-blind placebo-controlled trial evaluating the effect of piroxicam. **Spine**, 18:1433-1438, 1993.

Weil, A.; Moore, S. E.; Waite, N. J.; Randall, A.; Gunthorpe, M. J. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRVP1 and TRPM8. **Mol. Pharmacol.**, 68(2):518-527, 2005.

Wessale, J. L.; Adler, A. L.; Novosad, E. L.; Calzadilla, S. V.; Dayton, B. D.; et al. Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-

182086 and A-192621: ex vivo and in vivo studies. **Clin. Sci.**, 103:112S-117S, 2002.

Wheeler-Aceto, H.; Cowan, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, 236(2):193-199, 1993.

Wiesenfeld-Hallin, Z. Combined opioid-NMDA antagonist therapies. What advantages do they offer for the control of pain syndromes? **Drugs**, 55(1):1-4, 1998.

Wiesenfeld-Hallin, Z.; Xu, X. J. The role of cholecystinin in nociception, neuropathic pain and opiate tolerance. **Regul. Pept.**, 65(1):23-28, 1996.

Woda, A. Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. **Dent. Res.**, 82(10):764-8, 2003.

Wolf, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sci.**, 74(21):2605-2610, 2004.

Wolf, C. J.; Doubell, T.P. The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 4(4):525-34, 1994.

Wolf, C. J.; Shortland, P; Reynolds, M.; Ridings, J.; Doubell, T.; Coggeshall, 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.

Yamamoto, H.; Kawamata, T.; Ninomiya, T.; Omote, K.; Namiki, A. Endothelin-1 enhances capsaicin-evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> response via activation of endothelin a receptor in a protein kinase Cepsilon-dependent manner in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, 137(3):949-960, 2000.

Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, Y.; Goto, K. E. Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, 332:411-415, 1988.

Yoshimasu, F.; Kurland, L. T.; Elveback, L. R. Tic douloureux in Rochester, Minnesota, 1945-1969. **Neurol.**, 22(9):952-6, 1972.

Yuyama, H.; Koakutsu, A.; Fujiyasu, N.; Fujimori, A.; Sato, S.; Shibasaki, K.; Tanaka, S.; Sudoh, K.; Sasamata, M.; Miyata, K. Inhibitory effects of a selective endothelin-a receptor antagonist YM598 on endothelin-1-induced potentiation of nociception in formalin-induced and prostate cancer-induced pain models in mice. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 44(1):S479-S482, 2004.

Zhang, X.; Bao, L.; Shi, T. J.; Ju, G.; Elde, R.; Hokfelt, T. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, 82(1):223-240, 1998.

Zhao, Z.; Chen, S. R.; Eisenach, J. C.; Busija, D. W.; Pan, H. L. Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. **Neuroscience**, 97(4):743-748, 2000.

Zhou, Z.; Davar, G.; Strichartz, G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. **J. Neurosci.**, 22(15):6325-6330, 2002.

Zhou, Q. L.; Strichartz, G.; Davar, G. Endothelin-1 activates ET(A) receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons. **Neuroreport**, 12(17):3853-3857, 2001.

Zhu, X.; Eisenach, J. C. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. **Anesthesiol.**, 99(5):1175-1179, 2003.

---

Zhuang, Z. Y.; Gerner, P.; Woolf, C. J.; Ji, R. R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, 114(1-2):149-159, 2005.

Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.; Sorgard, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Hogestatt, E. D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, 400(6743):452-7, 1999.

## 8. ANEXO

---

---

Parte destes resultados integram dois trabalhos completos publicados nos periódicos:

### **Pain**

Chichorro, J.G.; Zampronio, A.R.; Souza G.E.P.; Rae, 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** 2006;123(1-2):64-74.

### **Experimental Biology and Medicine**

Chichorro, J.G.; Zampronio, A.R.; Rae, G.A. Endothelin ET<sub>B</sub> receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic. **Exp. Biol. Med.** 2006; 231(6):1136-40.



# Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs

Juliana Geremias Chichorro <sup>a</sup>, Aleksander Roberto Zamprônio <sup>b</sup>,  
Gloria Emilia Petto Souza <sup>c</sup>, Giles Alexander Rae <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 22 July 2005; received in revised form 3 January 2006; accepted 6 February 2006

## Abstract

The susceptibility of changes in responsiveness to noxious cold stimulation of rats submitted to chronic constriction of the infraorbital nerve (CION) or carrageenan to drug inhibition was compared. Nocifensive responses were measured as total time rats engaged in bilateral facial grooming with both forepaws over the first 2 min following tetrafluoroethane spray application to the snout. Carrageenan (50 µg, s.c. into upper lip) caused short-lived ipsilateral cold hyperalgesia (peak at 3 h: vehicle  $8.4 \pm 1.3$ , carrageenan  $21.2 \pm 3.0$  s) which was markedly suppressed by i.p. indomethacin (4 mg/kg), celecoxib (10 mg/kg) or s.c. dexamethasone (0.5 mg/kg), endothelin ET<sub>A</sub> or ET<sub>B</sub> receptor antagonists (BQ-123 and BQ-788, respectively; 10 nmol/lip). CION caused ipsilateral cold hyperalgesia between Days 2 and 12, which peaked on Days 4 (sham  $15.3 \pm 1.8$ , CION  $32.4 \pm 5.3$  s) to 6. Established peak CION-induced cold hyperalgesia was unaffected by indomethacin and celecoxib, whereas dexamethasone, BQ-123, BQ-788, and i.v. injections of selective antagonists of ET<sub>A</sub> (atrasentan, 3–10 mg/kg) or ET<sub>B</sub> (A-192621, 5–20 mg/kg) receptors caused significant inhibitions lasting 1–2.5 h (peaks ~65–90%). Bosentan (dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonist, 10 mg/kg, i.v.) abolished CION-induced cold hyperalgesia for up to 6 h. Thus, once established, CION-induced orofacial hyperalgesia to cold stimuli appears to lack an inflammatory component, but is alleviated by endothelin ET<sub>A</sub> and/or ET<sub>B</sub> receptor antagonists. If this CION injury model bears predictive value to trigeminal neuralgia (i.e., paroxysmal orofacial pain triggered by various stimuli), endothelin receptors might constitute new targets for treatment of this disorder.

© 2006 International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Trigeminal neuralgia; Endothelin; Rat; Cold

## 1. Introduction

Trigeminal neuralgia (TN) is a form of neuropathic pain characterized by severe lancinating pain in orofacial regions innervated by the trigeminal nerve. None of the medical or surgical procedures currently available

for TN provide reliable and permanent pain relief in all patients, so further knowledge into the mechanisms underlying this condition and new effective treatment strategies is clearly warranted.

As most cases of TN are caused by sensory nerve root compression (Gardner and Miklos, 1959; Jannetta, 1967), Vos and Maciewicz (1991) developed a rat model of trigeminal neuropathic pain produced by chronic constriction of the infraorbital nerve (CION), a branch of the trigeminal nerve. This model reproduces

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 33319491; fax: +55 48 33375479.

E-mail address: garae@farmaco.ufsc.br (G.A. Rae).

important aspects of TN, including signs of abnormal spontaneous pain-related behavior, mechanical allodynia (Vos and Maciewicz, 1991; Vos et al., 1994), heat hyperalgesia (Imamura et al., 1997), and inflammatory hypersensitivity (Anderson et al., 2003). These orofacial CION injury-induced sensory changes resemble those seen in neuropathic pain of the hind limb following injury to sciatic or L5/L6 spinal nerves, but it is unknown if this resemblance extends to hyperalgesia to cold stimuli seen in these models (Choi et al., 1994; Lee et al., 2000). This aspect seems particularly relevant as enhanced responsiveness to cold stimulation is frequently observed in patients with TN and other forms of chronic neuropathic pain (Hampf et al., 1990; Rappaport and Devor, 1994; Eide and Rabben, 1998).

On the other hand, the tactile allodynia of rats with diabetic neuropathy is temporarily attenuated by atrasentan, a highly selective antagonist of endothelin ET<sub>A</sub> receptors (Jarvis et al., 2000). These, as well as ET<sub>B</sub> receptors, are expressed by various cells including central and peripheral neurons (Kurokawa et al., 1997; Pomonis et al., 2001) and specifically targeted by peptides of the endothelin family, which includes endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3, to produce a multitude of effects (Yanagisawa et al., 1988; for review, see Masaki, 2004). Among such effects, endothelins (mainly endothelin-1) can trigger pain or overt nociception in humans and animals (Ferreira et al., 1989; Raffa et al., 1996; Davar et al., 1998; Piovezan et al., 2000), as well as hyperalgesia to noxious chemical, mechanical, and thermal stimuli (Piovezan et al., 1998, 2000; Menendez et al., 2003; da Cunha et al., 2004). Moreover, endogenous endothelins contribute significantly to pain and/or hyperalgesia of inflammatory, immune, neuropathic, and neoplastic origins (De-Melo et al., 1998; Griswold et al., 1999; Jarvis et al., 2000; Wacnik et al., 2001; Piovezan et al., 2004). Finally, endothelins can be produced by many cell types in the CNS (Giaid et al., 1991; Yamada and Kurokawa, 1998) and in peripheral sensory ganglia, including those of the trigeminal ganglion (Milner et al., 2000).

In light of these considerations, the present study aimed to evaluate changes in nocifensive responses elicited by cold stimuli applied to the snout of rats submitted to CION or to injection of the inflammatory stimulus carrageenan into the upper lip, as well as their susceptibility to reversal by treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), dexamethasone, and endothelin ET<sub>A</sub> and/or ET<sub>B</sub> receptor antagonists.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Experiments were conducted on male Wistar rats weighing 180–200 g, housed five to a cage at 22 ± 1 °C on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with free access to laboratory

chow and tap water. They were acclimatized to the laboratory for at least 48 h before use. All experiments were conducted under the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and the experimental procedures were previously approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the UFSC, where the study was conducted.

### 2.2. Surgical procedure for producing CION

The method for producing CION was slightly different from that originally proposed by Vos et al. (1994). Briefly, rats were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of ketamine and xylazine (50 and 10 mg/kg, respectively) and an incision was made in the skin of the snout, under the right eye, about 3 mm caudal to the mystacial pads. The superior lip elevator and anterior superficial masseter muscles were bluntly dissected to expose the rostral end of the ION, as it emerged from the infraorbital fissure. Special care was taken not to damage the facial nerves. Two silk 4-0 ligatures were then tied loosely and 2 mm apart around the ION and the wound was closed with additional silk sutures (4-0). Sham-operated rats were treated identically, but no ligatures were applied to the ION. After surgery, all rats were treated with oxytetracycline (60 mg/kg; intramuscular) and maintained in a warm room until they recovered from anesthesia.

### 2.3. Cold stimulation

Before each testing session animals were placed in individual plastic observation cages and left to adapt to the environment for at least 1 h. After this period, they usually displayed considerable sniffing, but very little locomotor activity. Cold stimulation was applied by the experimenter in the form of a brief 1-s spray of tetrafluoroethane to the center of one of the vibrissal pads, while gently restraining the animal in its cage by placing one hand around its trunk. The total duration of bilateral facial grooming behavior with both forepaws directed to the snout was recorded, using a stopwatch, over the first 2 min following application of the cold stimulus, as an index of the intensity of nocifensive responsiveness. Preliminary experiments in naïve rats revealed that the incidence of grooming behavior at time points beyond 2 min after cold stimulation was not different from that seen in non-stimulated animals. The intensity of the cold stimulus was assessed in a separate group of animals, by placing a commercially available contact thermode on the surface of the vibrissal pad and measuring the skin temperature, as previously described (Roytta et al., 1999), before, immediately after the tetrafluoroethane spray, and then again 2 min later.

### 2.4. Experimental procedures

#### 2.4.1. Effects of carrageenan

After assessing initial basal responsiveness to the cold stimulus as described above, the animals received a subcutaneous (s.c.) injection of carrageenan (50 µg) or saline 0.9% (50 µl) into the upper lip, and the cold stimulus was repeated to either vibrissal pad every hour for up to 5 h. Alternatively, when testing the susceptibility of carrageenan-induced sensory changes to inhibition by anti-inflammatory drugs or endothelin



receptor antagonists (see below), the cold stimulus was applied only to the pad ipsilateral to the lip injected with carrageenan or the corresponding vehicle.

#### 2.4.2. Effects of CION

To establish the time course of the CION-induced changes in nocifensive responsiveness to cold stimulation, the cold stimulus was applied to naïve rats or to the ipsilateral or contralateral side of sham-operated or nerve-injured rats one day before the surgery (to determine basal responsiveness) and then again at 2- or 4-day intervals up to 28 days post-surgery. In the experiments designed to investigate the effects of drug treatments on CION-induced changes in responsiveness, the cold stimulus was applied solely to the vibrissal pad ipsilateral to CION. Rats in these groups were tested once before surgery and then several times on Day 4, starting immediately prior to treatment and then at 1 h (or in some cases 30 min) intervals up to a maximum of 8 h after drug administration. In some groups, the procedure described above for Day 4 was repeated on Days 5 and 6.

#### 2.4.3. Effects of endothelin-1 and IRL-1620

To assess the possible effect of endothelin receptor agonists on nocifensive responsiveness to orofacial noxious cold stimulation, naïve rats received a s.c. injection of either endothelin-1 (a dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor agonist, 1–10 pmol), IRL-1620 (a selective endothelin ET<sub>B</sub> receptor agonist 3 or 30 pmol) or vehicle (50 µl PBS solution) into the upper lip. The cold stimulus was applied prior to treatment (basal responsiveness) and then repeatedly only to ipsilateral vibrissal pad every hour for up to 5 h.

#### 2.5. Drug treatments

Several experiments were performed to assess the susceptibility of carrageenan- or CION-induced changes in nocifensive responsiveness to inhibition by various drug treatments. In such experiments, the control rats were always treated identically with the corresponding vehicle. Anti-inflammatory drug treatments included two non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), the dual cyclooxygenase (COX) COX-1/COX-2 blocker indomethacin (4 mg/kg, i.p.) and the selective COX-2 blocker celecoxib (10 mg/kg, i.p.), as well as the glucocorticoid dexamethasone (0.5 mg/kg, s.c.), prepared in 0.2 M Tris (hydroxymethylaminomethane) buffer at, pH 8.2, 0.1% carboxymethylcellulose solution (w/v) or saline, respectively. Rats challenged with carrageenan were given only a single injection of these drugs, either 1 (dexamethasone) or 2 h after the flogogen. In animals submitted to CION, these treatments were repeated once a day over Days 4, 5 and 6. Peptidic endothelin receptor antagonists BQ-123 (selective ET<sub>A</sub>, 3–30 nmol) or BQ-788 (selective ET<sub>B</sub>; 3–30 nmol; both dissolved in PBS) were injected s.c. only once into the ipsilateral upper lip of either carrageenan-treated rats (2.5 h after the flogogen) or nerve-injured animals on Day 4 after CION. Some carrageenan-treated and CION rats received a combination of BQ-123 plus BQ-788 (both at either 3 or 10 pmol). Conversely and in CION rats only, three non-peptidic endothelin receptor antagonists were administered intravenously (i.v., into a tail vein), namely bosentan (dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>; 10 mg/kg), atrasentan (selective ET<sub>A</sub>; 3 or 10 mg/kg) or A-192621 (selective ET<sub>B</sub>; 5 or

20 mg/kg), which were prepared daily in heated (50 °C) water alone (bosentan) or warm water containing 3% ethanol and 100 µl of 0.1 N NaOH.

Doses of the various drug treatments used were selected on the basis of those shown to be effective in previous studies: indomethacin and celecoxib (Rodrigues-Filho et al., 2004), dexamethasone (Buritova et al., 1996), bosentan, BQ-123 and BQ-788 (De-Melo et al., 1998), endothelin-1 and IRL-1620 (Piovezan et al., 2000). Atrasentan (previously named ABT 627) is an endothelin receptor antagonist which displays a greater than 1800-fold selectivity for ET<sub>A</sub> over ET<sub>B</sub> receptors (Opgenorth et al., 1996; Wu-Wong et al., 2002), while A-192621 is a structurally related endothelin receptor antagonist which demonstrates a greater than 1400-fold selectivity for ET<sub>B</sub> over ET<sub>A</sub> receptors (Opgenorth et al., 1996; von Geldern et al., 1999; Wessale et al., 2002; Wu-Wong et al., 2002). Dose–response relationships for atrasentan and A-192621 have been previously described in mice (Rosano et al., 2003; Yin et al., 2003) and rats (Jarvis et al., 2000; Wessale et al., 2002). Specifically, the doses used in studies in rats range from 1 to 30 mg/kg/day, with maximal effects observed at 10 and 20 mg/kg/day for atrasentan and A-192621, respectively. Such doses resulted in therapeutically effective drug levels in plasma and caused no gross signs of adverse effects.

#### 2.6. Drugs

The following drugs were used: carrageenan and indomethacin (Sigma, St. Louis, MO, USA); celecoxib and oxytetracycline (Celebra<sup>®</sup> and Terramicina<sup>®</sup>, respectively, Pfizer, Guarulhos, Brazil); dexamethasone (Decadronal<sup>®</sup>, Prodome Laboratories, São Paulo, Brazil); BQ-123 (cyclo[D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu]) and BQ-788 (*N-cis*-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L-g-methylleucyl-D-1-methoxycarbonyl-norleucine) (both from Research Biochemicals International, Natick, MA, USA); endothelin-1 and IRL-1620 {Suc-[Glu<sup>9</sup>,Ala<sup>11</sup>,15]-endothelin-1(8–21)} (both from Tocris Bioscience, Missouri, USA); bosentan (kindly provided by Actelion A.G., Allschwil, Switzerland); atrasentan and A-192621 [[2*R*-(2a,3b,4a)]-4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-[2-(2,6-diethylphenyl)amino]-2oxoethyl]-2-(4-propoxyphenyl)-3 pyrrolidinecarboxylic acid] (both kindly provided by Abbott Laboratories, Abbot Park, IL, USA).

#### 2.7. Statistical analysis

These data are presented as means ± SE mean for each group at different time points after carrageenan, endothelin-1 or IRL-1620 injection or CION surgery. Results were analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. A one-way ANOVA followed by Bonferroni's test was conducted to analyze the influence of drug treatments on carrageenan-induced cold hyperalgesia just at one time point. In all statistical analyses, *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

### 3. Results

The use of a short-lasting (1 s duration) tetrafluoroethane spray seemed to be a particularly suitable method for orofacial cold stimulation, as this gas is odorless

(unlike acetone, which would stimulate olfaction) and elicited highly reproducible nocifensive responses (i.e., facial grooming behavior) when applied to the snout at no less than 30-min intervals for up to 8 h per day. Naïve rats usually responded promptly to the cold stimulus (i.e., within the first 30 s) with a single bout of facial grooming with both forepaws. However, once hyperalgesia to cold was established, animals frequently displayed a longer first bout accompanied by additional shorter bouts up to 2 min after stimulation. Moreover, the temperature at the surface of the vibrissal pad was lowered by the cold stimulus from 30 to ~12 °C within a few seconds, returning to basal levels within 2 min.

Injection of carrageenan (50 µg) into the upper lip promoted significant increases in duration of facial grooming behavior evoked by cold stimulation of the ipsilateral (but not contralateral) vibrissal pad, in comparison to values obtained in saline-injected animals. The hyperalgesic effect of carrageenan peaked at 3 and 4 h after injection, but subsided considerably at 5 h (Fig. 1A). Higher doses of carrageenan (100 or 300 µg) failed to enhance hyperalgesia further, yet induced extensive lip edema which might have interfered with the sensitivity to the cold stimulus (data not shown).

Systemic injections of indomethacin (4 mg/kg), celecoxib (10 mg/kg) or dexamethasone (0.5 mg/kg) markedly blocked the hyperalgesia to cold stimulation induced by local carrageenan (50 µg) injection. At 3 h after carrageenan, these drug treatments inhibited the hyperalgesic response by 84%, 85%, and 100%, respectively (Fig. 1B). Local administration of the peptidic endothelin receptor antagonists BQ-123 and BQ-788 (3 or 10 nmol/50 µl; selective for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors, respectively) alone or in combination (at 3 and 10 nmol/lip) caused maximal net reductions in carrageenan-induced cold hyperalgesia of 69%, 108%, and 101%, respectively (Fig. 1C).

CION also promoted substantial increases in facial grooming behavior evoked by cold tetrafluoroethane spray, when compared to responses of naïve or sham-operated rats, but the time course for this effect was very different from that promoted by carrageenan. The hyperalgesic effect of CION began as early as Day 2 after surgery, peaked on Days 4–6, lasted up to Day 12, and was entirely restricted to stimuli applied to the nerve-injured side (Fig. 2). CION also induced persistent mechanical allodynia, which was bilateral and lasted for more than 120 days (unpublished observations). Increased sensitivity to tactile stimuli is a robust symptom in patients suffering from trigeminal neuralgia.

Unlike the results obtained in carrageenan-treated rats, i.p. administration of either indomethacin or celecoxib (4 and 10 mg/kg, respectively) on Day 4 after surgery failed entirely to alleviate CION-induced hyperalgesia to cold during the 4-h test period. Furthermore, no changes in facial grooming were observed

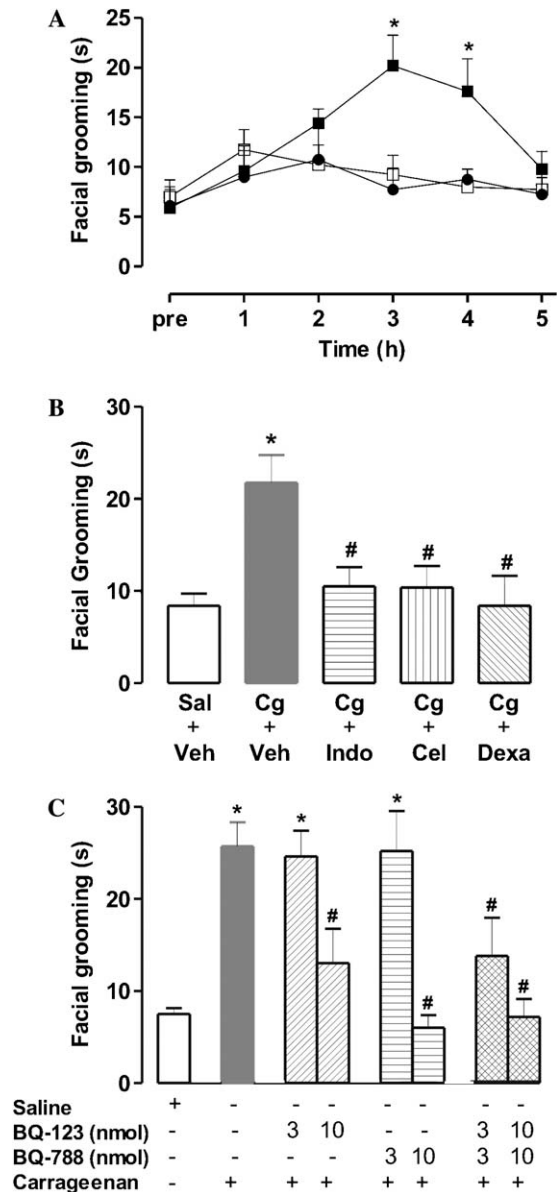


Fig. 1. Effects of carrageenan on nocifensive responsiveness to orofacial cold stimulation and susceptibility to anti-inflammatory drugs and endothelin receptor antagonists. (A) The cold stimulus was applied to the ipsilateral (■) or contralateral (□) vibrissal pad prior to (pre) and after s.c. injection of either carrageenan (50 µg) or saline (●; data from both sides pooled for clarity sake) into the right upper lip. After carrageenan (Cg) or saline (Sal) injection, rats in (B) were treated with either indomethacin (Indo, 4 mg/kg, i.p., 2 h later), celecoxib (Cel, 10 mg/kg, i.p., 2 h later) or dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg, s.c., 1 h later), whereas those in (C) received BQ-123 or BQ-788 (3 or 10 nmol, s.c., 2.5 h later) alone or in combination (both at either 3 or 10 nmol), or the corresponding vehicles (Veh). Data from the control groups receiving the different vehicles were similar and hence pooled. All values represent the duration of bilateral facial grooming displayed over the first 2 min after the cold spray (at the time indicated in A, or 3 h after Cg in B and C) and are means ± SE mean of 5 or 10 (pooled controls) rats per group. \*.#P < 0.05 when compared to value of corresponding group treated with saline or Cg, respectively (ANOVA followed by Newman–Keuls test in A or Bonferroni test in B and C).

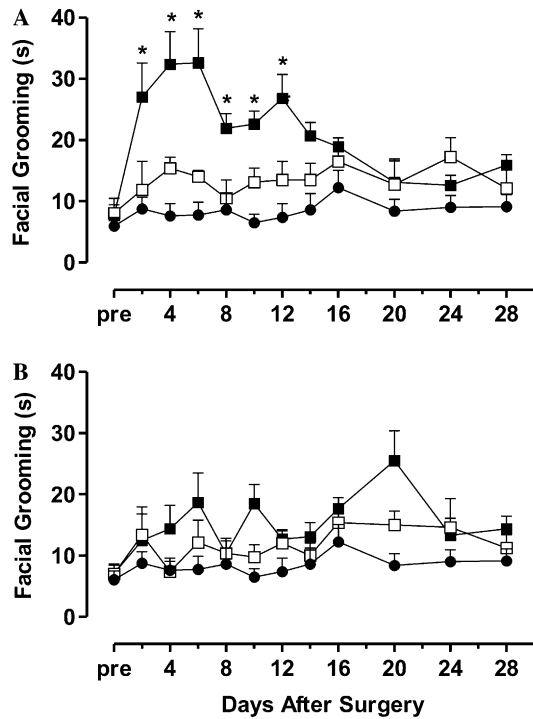


Fig. 2. Effects of CION on nocifensive responsiveness to orofacial cold stimulation. The cold stimulus was applied to the ipsilateral (A) or contralateral (B) vibrissal pad (relative to operated side) of nerve-injured (■), sham-operated (□) or naïve (●) rats, and the duration of facial grooming was recorded over the next 2 min. Values represent means  $\pm$  SE mean of 8–10 rats, and were obtained 1 day before (pre) and then once every 2 days up to 28 days after surgery. \* $P < 0.05$  when compared to corresponding value of sham-operated animals (ANOVA followed by Newman–Keuls test).

when these drug injections were repeated in the same rats on Days 5 and 6 (Figs. 3A and B). In contrast, systemic s.c. injections of dexamethasone (0.5 mg/kg) to CION-injured rats on Days 4 and 5 caused short-lived reductions of cold hyperalgesia which were significant only at 2 h after treatment. The reduction afforded by a third injection of the glucocorticoid on Day 6 was of similar magnitude, but just failed to achieve statistical significance (Fig. 3C).

Local injection of BQ-123 or BQ-788 on Day 4 after CION each induced dose-dependent reductions of the hyperalgesic responses to cold stimulation elicited 30 or 60 min after their administration at either 10 or 30 nmol/lip (Figs. 4A and B). Neither antagonist was effective alone at 3 nmol/lip, but co-administration of BQ-123 and BQ-788 at this dose (i.e., each at 3 nmol/lip) induced a significant analgesic effect at 30 min after treatment, whereas their co-administration at 10 nmol/lip prolonged the reduction in cold hyperalgesia from 60 to 90 min (Fig. 4C). Moreover, in absolute values, rats submitted to CION showed less grooming behavior at 60 min after treatment with 10 nmol/lip BQ-788 than those given a combination of BQ-123 plus BQ-788 (both at 10 nmol/lip). However, it is noteworthy that, at this

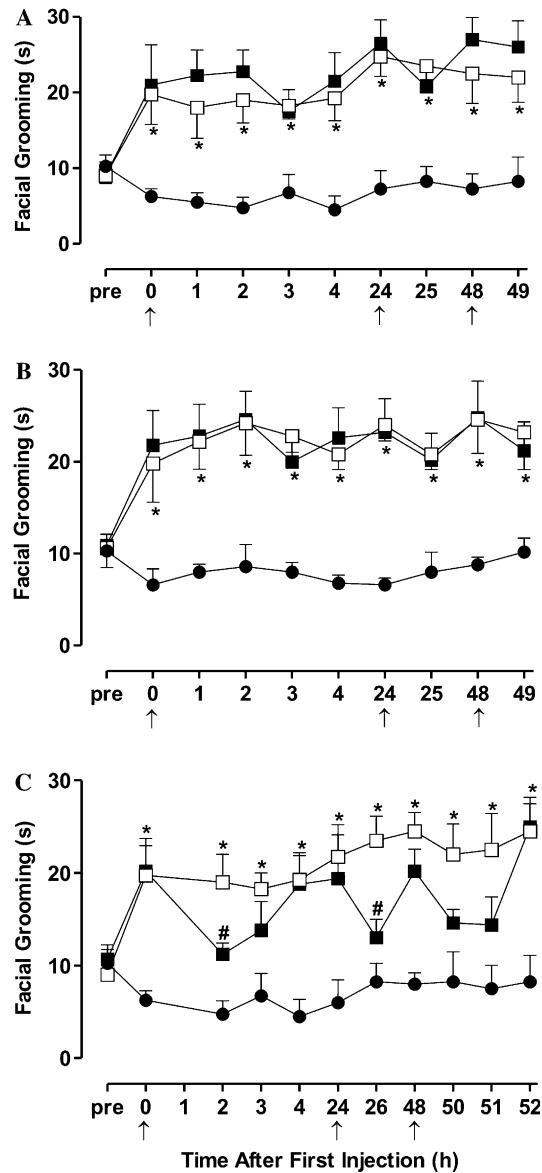


Fig. 3. Effects of anti-inflammatory drugs on CION-induced cold hyperalgesia. On Days 4, 5, and 6 after CION surgery, nerve-injured rats (■) received a daily injection of indomethacin (4 mg/kg, i.p.; A), celecoxib (10 mg/kg, i.p.; B) or dexmethasone (0.5 mg/kg, s.c.; C), whereas control (i.e., untreated) nerve-injured (□) or sham-operated (●) animals received the corresponding vehicles (at times indicated by the arrows). Values represent the duration of bilateral facial grooming induced over the first 2 min following cold spray application before (pre) and at different time points after treatment, and are means  $\pm$  SE mean of 5 rats per group. \* $P < 0.05$  when compared to corresponding value of sham-operated or control nerve-injured animals, respectively (ANOVA followed by Newman–Keuls test).

60-min time point, nocifensive responses to cold stimulation of both these groups were not significantly different from those of the corresponding (and distinct) vehicle-treated sham control groups ( $P > 0.05$ , Newman–Keuls test). Thus, the statistical analysis failed to confirm a significant limitation of the analgesic effect of BQ-788 by combined administration together with

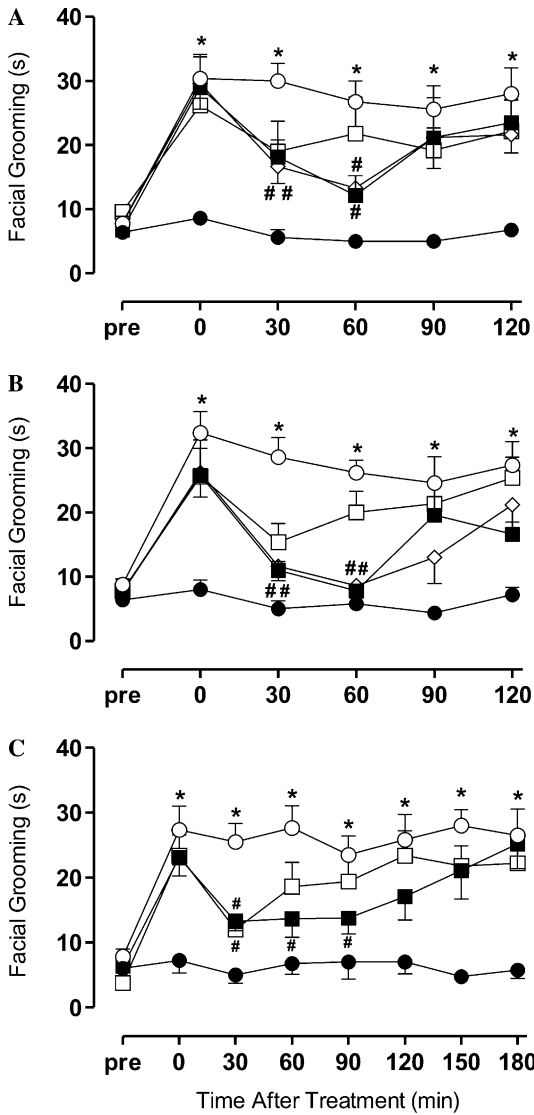


Fig. 4. Effects of peptidic endothelin receptor antagonists on CION-induced cold hyperalgesia. On Day 4 after surgery, nerve-injured rats received s.c. injection into the upper lip of BQ-123 (selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist, A) or BQ-788 (selective ET<sub>B</sub> receptor antagonist, B) alone (at 3 □, 10 ■ or 30 nmol ◇) or in combination (each at 3 □ or 10 nmol ■, panel C). Control nerve-injured (○) or sham-operated (●) animals received the respective vehicles. Values represent the duration of bilateral facial grooming induced over the first 2 min following cold spray application immediately before (pre) and at different time points after treatment, and are means ± SE mean of 5–9 rats per group. \**P* < 0.05 when compared to corresponding value of sham-operated or control nerve-injured animals, respectively (ANOVA followed by Newman–Keuls test).

BQ-123 and corroborate the significant synergism in analgesic action observed when both antagonists were administered together at 3 nmol/lip.

Systemic administration of the selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist atrasentan (3 or 10 mg/kg, i.v.) also attenuated the cold hyperalgesia present on Day 4 after CION surgery in graded fashion (Fig. 5A). The inhibition afforded by the highest dose of atrasentan was statisti-

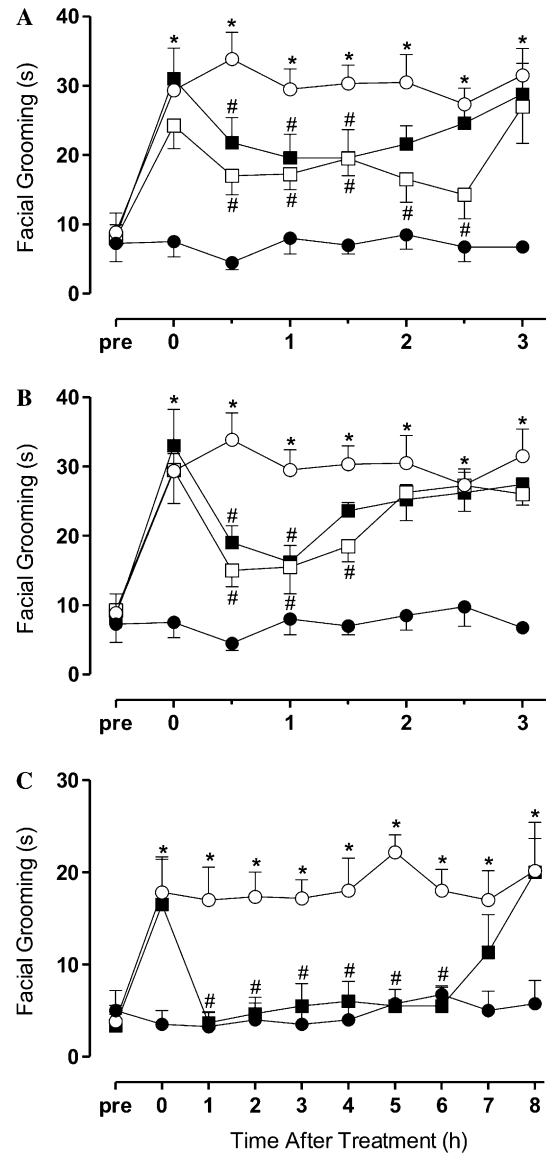


Fig. 5. Effects of non-peptidic endothelin receptor antagonists on CION-induced cold hyperalgesia. On Day 4 after surgery, nerve-injured rats received i.v. injection of either atrasentan (selective ET<sub>A</sub> receptor antagonist; at 3 ■ or 10 mg/kg □; A), A-192621 (selective ET<sub>B</sub> receptor antagonist; at 5 ■ or 20 mg/kg □; B) or bosentan (dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonist, at 10 mg/kg ■; C). Control nerve-injured (○) or sham-operated (●) animals were treated i.v. with the respective vehicles. Values represent the duration of bilateral facial grooming induced over the first 2 min following cold spray application immediately before (pre) and at different time points after treatment, and are means ± SE mean of 5–6 rats per group. \**P* < 0.05 when compared to corresponding value of sham-operated or control nerve-injured animals, respectively (ANOVA followed by Newman–Keuls test).

cally significant from 30 to 150 min after injection. Similar, but shorter-lasting, inhibitory effects were observed between 30 and 90 min after injection of the selective ET<sub>B</sub> receptor antagonist A-192621 (5 or 20 mg/kg, i.v.; Fig. 5B). On the other hand, systemic treatment with the dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonist bosentan (10 mg/kg, i.v.) abolished the hyperalgesic response



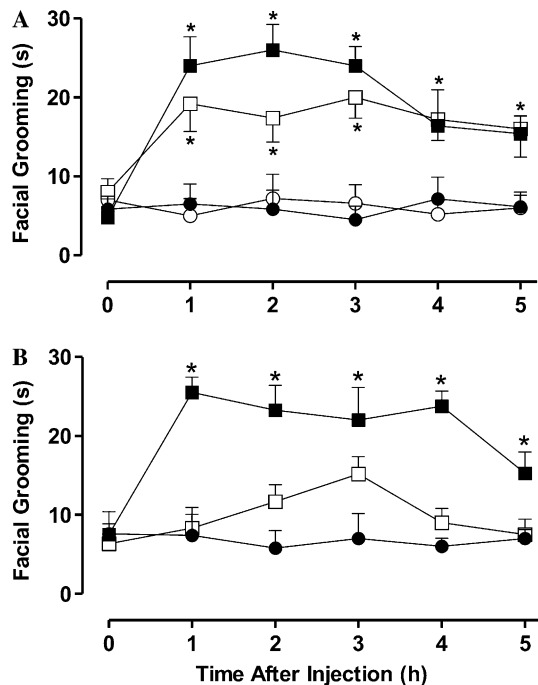


Fig. 6. Effects of endothelin receptor agonists on nocifensive responses of naïve rats to noxious cold stimulation. Rats received a single s.c. injection into the right upper lip of either endothelin-1 (at 1 ○, 3 □ or 10 pmol ■; A) or IRL-1620 (at 3 □ or 30 pmol ■; B). Control animals received the respective vehicles (●, 50  $\mu$ l, s.c.). Values represent the duration of facial grooming induced over the first 2 min following cold spray application immediately before and at different time points after treatment, and are means  $\pm$  SE mean of 5–6 per group. \* $P$  < 0.05 when compared to corresponding value of vehicle-treated naïve rats (ANOVA followed by Newman–Keuls test).

from 1 to 6 h after its injection (Fig. 5C), without affecting the duration of grooming behavior elicited by cold stimulation of sham-operated rats (data not shown).

Local injection of the dual  $ET_A/ET_B$  receptor agonist endothelin-1 (3 or 10 pmol/lip) or the selective  $ET_B$  receptor agonist IRL-1620 (3 or 30 pmol/lip) in naïve rats caused graded and long-lasting ipsilateral hyperalgesia to the cold stimulus (Figs. 6A and B). The effects produced by the highest dose of either compound began to subside 4–5 h after administration, but were still significantly different from that of PBS-treated controls.

#### 4. Discussion

The current study shows, apparently for the first time and using a new simple method for evoking nocifensive responses to noxious cold stimulation, that carrageenan and CION promote orofacial cold hyperalgesia, which differs considerably in time course and underlying maintenance mechanisms. Yet, the endothelin system appears to be implicated in the sensory changes in both cases.

The orofacial hyperalgesia to cold stimuli caused by carrageenan injection into the upper lip complements

the recent demonstration that this flogogen induces hyperalgesia to heat in the cheek of rats (Neubert et al., 2005). Moreover, like the cold hyperalgesia detected in the hind paw inflamed with complete Freund's adjuvant (Takahashi et al., 2003), carrageenan-induced orofacial cold hyperalgesia clearly results from inflammation, as it was markedly suppressed by either non-steroidal (indomethacin and celecoxib) or steroidal (dexamethasone) anti-inflammatory drugs. In sharp contrast, the cold hyperalgesia induced by CION displayed a greatly expanded time course (from Days 2 to 12, peak on Days 4 to 6) relative to that caused by carrageenan (at 3–4 h after injection only), but was similar to that seen to radiant heat (Imamura et al., 1997; and unpublished observations). Prostaglandins can contribute to pathogenesis of pain following spinal nerve injury (Tracey and Walker, 1995; Syriatowicz et al., 1999; Broom et al., 2004), but suppressing their synthesis with COX-blocking NSAIDs is generally considered ineffective against established neuropathic pain (Max et al., 1988; Weber et al., 1993). The refractoriness of established CION-induced cold hyperalgesia to indomethacin or celecoxib clearly indicates it lacks an inflammatory component, in line with the proposal that CION promotes a state of neuropathic pain (Vos et al., 1994). On the other hand, repeated dexamethasone treatment provided partial and transient inhibition of CION-induced cold hyperalgesia. Glucocorticoids act mainly by suppressing the activity of transcription factors like activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor  $\kappa$ B, thus downregulating expression of several pro-inflammatory cytokines and proteins, including COX-2 (for review, see De Bosscher et al., 2000). The precise cellular mechanisms underlying the inhibitory influence of dexamethasone remain to be identified, but most likely are unrelated to down-regulation of COX-2.

Injected into the upper lip, endothelin-1 and the selective  $ET_B$  receptor agonist IRL-1620 each elicited prolonged orofacial cold hyperalgesia. Endothelins evoke nociception and/or hyperalgesia in various animal models, but the receptors involved can vary widely. Acting through  $ET_A$  receptors, endothelin-1 causes nociception in hind paw of rats and mice, and hyperalgesia to capsaicin or heat in mice, but most of these effects can be modulated by antinociceptive and/or antihyperalgesic  $ET_B$  receptors (Piovezan et al., 2000; Khodorova et al., 2003; Menendez et al., 2003). Likewise, in rats  $ET_B$  receptors limit endothelin-1-induced  $ET_A$  receptor-mediated articular incapacitation in the naïve knee-joint, but both receptors are pronociceptive in a carrageenan-primed joint (De-Melo et al., 1998; Daher et al., 2004). Both receptor types also mediate abdominal writhes induced by endothelin-3 (Raffa et al., 1996) and hind paw mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in mice (Baamonde et al., 2004a), but only  $ET_B$  receptors mediate the later effect in rats (da Cunha et al., 2004).

Local administration of peptidic antagonists of endothelin  $ET_A$  (BQ-123) and/or  $ET_B$  (BQ-788) receptors dose-dependently reversed the sensory changes induced by both carrageenan and CION. Indeed,  $ET_A$  receptor antagonists also reduce both phases of the nocifensive responses to formalin injection into the upper lip (unpublished observations). Thus, the endothelin system actively exacerbates nocifensive responses to noxious cold (and chemical) stimulation of an area innervated by the trigeminal nerve. Likewise, the system also modulates nociceptive responsiveness in other pathophysiological models. Antagonists of  $ET_A$  receptors attenuate hind paw mechanical allodynia in rats with diabetic neuropathy (Jarvis et al., 2000) or mice with calcaneus bone implants of fibrosarcoma cells (Wacnik et al., 2001). Heat hyperalgesia induced in mice by intraplantar injection of fibrosarcoma cells (at 5 weeks; Baamonde et al., 2004b), carrageenan or complete Freund's adjuvant is also sensitive to inhibition by  $ET_A$  receptor blockade, but the mechanical hyperalgesia caused by these agents is reduced by both  $ET_A$  and  $ET_B$  receptor antagonists (Baamonde et al., 2004a), as are antigen-induced spontaneous nociception and hyperalgesia to capsaicin in previously sensitized animals (Piovezan et al., 2004). Conversely, only  $ET_B$  receptor antagonists inhibit articular incapacitation caused by LPS in carrageenan-primed knee joint (De-Melo et al., 1998) or hind paw mechanical hyperalgesia caused by interleukin-12 or interleukin-18 in rats (Verri et al., 2004, 2005), and phenylbenzoquinone-induced writhes in mice (Griswold et al., 1999).

The usefulness of peptidic antagonists of endothelin receptors against the long-lasting cold hyperalgesia induced by CION appears to be limited by their short duration of analgesic action (~1 h) and need for local administration. Indeed, intravenously administered non-peptidic antagonists of endothelin receptors displayed a more favorable profile. Selective blockade of  $ET_A$  receptors with atrasentan or of  $ET_B$  receptors with A-192621, at doses pharmacologically effective in rats (Wessale et al., 2002), each reduced established cold hyperalgesia significantly for 2.5 and 1.5 h, respectively. More remarkably, i.v. injection of the dual  $ET_A/ET_B$  antagonist bosentan abolished hyperalgesia for 6 h, without modifying responsiveness of sham-operated rats. Therefore, systemically active antagonists of  $ET_A$  and/or  $ET_B$  receptors clearly provide substantial relief of CION-induced orofacial cold hyperalgesia. The fact that endothelins activate  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors to maintain the long-lasting non-inflammatory cold hyperalgesia induced by CION, but only  $ET_A$  receptors to promote hind paw tactile allodynia in diabetic neuropathy (Jarvis et al., 2000), might derive from differences in the cellular mechanisms underlying the sensory changes produced by these conditions, nature of the noxious stimulus applied, and/or in area submitted to noxious stimulation.

The more intense and prolonged effect of bosentan against established CION-induced hyperalgesia, relative to that of atrasentan or A-192621, could reflect substantial synergism between the hyperalgesic mechanisms triggered via  $ET_A$  and  $ET_B$  receptors or differences in their pharmacokinetic profiles. All three drugs are highly stable non-peptide antagonists displaying good oral availability and similar plasma half-lives of 5–6 h (Clozel et al., 1994; Wessale et al., 2002). Bosentan crosses the blood-spinal cord barrier (Patel et al., 1994; McAuley et al., 1996), but atrasentan and the structurally related A-192621 do not (Peters et al., 2004). Therefore, the cold hyperalgesia following CION depends substantially on peripheral/local endothelin-dependent mechanisms, but could also depend partially on central endothelin system activation.

In dorsal root ganglia  $ET_A$  receptors are found mainly in a subset of small-sized peptidergic and non-peptidergic sensory neurons and their axons (in sciatic nerve), whereas  $ET_B$  receptors are located on ganglionic satellite cells and non-myelinating ensheathing Schwann cells (Pomonis et al., 2001). Trigeminal nerve trunks display  $ET_B$  mRNA (Kitano et al., 1998), whereas trigeminal ganglia express both  $ET_B$  receptors (Brändli et al., 1996) and endothelin, but levels of the peptide are drastically reduced by selective sensory neuron degeneration with capsaicin (Milner et al., 2000). Interestingly, electrostimulation of the trigeminal ganglion or capsaicin administration causes neurogenic inflammation in the dura mater of rats which is prevented by dual  $ET_A/ET_B$  or selective  $ET_B$  (but not  $ET_A$ ) receptor blockade (Brändli et al., 1996). Capsaicin also elevated plasma endothelin-3 (but not endothelin-1) levels in the superior sagittal sinus, suggesting that the former peptide is the main isoform released from trigeminal nerves. It remains to be seen if the same occurs following CION.

Two cold receptors have been identified and characterized in rat dorsal root and trigeminal ganglia neurons: transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) and transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1/ANKTM1), which are activated by threshold temperatures of ~25 and ~15 °C, respectively (McKemy et al., 2002; Story et al., 2003; Bandell et al., 2004). Although the temperature at the surface of the vibrissal pad immediately after spray application would be sufficient for TRPA1 activation, tissue blood flow may have attenuated the temperature drop occurring at the level of the nociceptors. Thus, the relative contributions of TRPM8 and TRPA1 to the cold nociception in this orofacial model and to the hyperalgesic response seen following carrageenan or CION remain unknown. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1), which is responsive to heat, capsaicin or acid and expressed in small-diameter primary sensory neurons, can be markedly sensitized by hyperalgesic mediators (e.g., bradykinin) acting on GPCRs coupled to phospholipase C

activation (Chuang et al., 2001). In fact, bradykinin activates TRPA1 via a phospholipase C-dependent mechanism, but the role of this pathway in the modulation of TRPM8 activity is controversial (Bandell et al., 2004; Rohacs et al., 2005). Both ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are GPCRs capable of activating phospholipase C (for review, see Masaki, 2004), but further studies are needed to elucidate the specific mechanisms underlying endothelin-induced cold hyperalgesia.

In conclusion, this study shows that CION causes prolonged orofacial hyperalgesia to cold stimulation in rats, which differs from the short-lasting changes seen following s.c. carrageenan in being fully resistant to inhibition by NSAIDs. Notably, established cold hyperalgesia induced either by CION or carrageenan are both reduced substantially following blockade of endothelin ET<sub>A</sub> and/or ET<sub>B</sub> receptors. Although single dosing with the dual ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonist bosentan fails to abort migraine attacks in patients (May et al., 1996), our results suggest endothelin receptor antagonists might provide effective treatment for pain of trigeminal origin.

### Acknowledgements

The kind donations of bosentan by Dr. Martine Clozel (Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Switzerland), and atrasentan and A-192621 by Dr. Terry Opgenorth (Abbott Laboratories, Abbott Park, USA) are gratefully acknowledged. The study was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nivel Superior (Capes), Fundacao de Amparo a Ciencia e Tecnologia do Estado de Santa Catarina (Funcitec), and the Pronex program of the Brazilian Ministry of Science and Technology and Funcitec. J.G.C. is the recipient of a CNPq doctoral scholarship.

### References

- Anderson LC, Vakoula A, Veinote R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Arch Oral Biol* 2003;48:161–9.
- Baamonde A, Lastra A, Villazon M, Bordallo J, Hidalgo A, Menendez L. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004a;369:245–51.
- Baamonde A, Lastra A, Fresno MF, Llamas S, Meana A, Hidalgo A, et al. Implantation of tumoral XC cells induces chronic, endothelin-dependent, thermal hyperalgesia in mice. *Cell Mol Neurobiol* 2004b;24:269–81.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 2004;41:849–57.
- Brändli P, Löffler BM, Breu V, Osterwalder R, Maire JP, Clozel M. Role of endothelin in mediating neurogenic plasma extravasation in rat dura mater. *Pain* 1996;64:315–22.
- Broom DC, Samad TA, Kohno T, Tegeder I, Geisslinger G, Woolf CJ. Cyclooxygenase 2 expression in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2004;124:891–900.
- Buritova J, Honore P, Chapman V, Besson JM. Enhanced effects of co-administered dexamethasone and diclofenac on inflammatory pain processing and associated spinal c-Fos expression in the rat. *Pain* 1996;64:559–68.
- Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 1994;59:369–76.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957–62.
- Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Löffler BM, Burri K, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:228–35.
- da Cunha JM, Rae GA, Ferreira SH, Cunha F de Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 2004;501:87–94.
- Daher JB, Souza GE, D'Orleans-Juste P, Rae GA. Endothelin ETB receptors inhibit articular nociception and priming induced by carrageenan in the rat knee-joint. *Eur J Pharmacol* 2004;496:77–85.
- Davar G, Hans G, Fareed MU, Sinnott C, Strichartz G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. *Neuroreport* 1998;9:2279–83.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* 2000;109:16–22.
- De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, Rae GA. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain* 1998;77:261–9.
- Eide PK, Rabben T. Trigeminal neuropathic pain: pathophysiological mechanisms examined by quantitative assessment of abnormal pain and sensory perception. *Neurosurgery* 1998;43:1103–9.
- Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:S220–2.
- Gardner WJ, Miklos MV. Response of trigeminal neuralgia to decompression of sensory root; discussion of cause of trigeminal neuralgia. *J Am Med Assoc* 1959;170:1773–6.
- Giaid A, Gibson SJ, Herrero MT, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, et al. Topographical localization of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurons of the human brain. *Histochemistry* 1991;95:303–14.
- Griswold DE, Douglas SA, Martin LD, Davis TG, Davis L, Ao Z, et al. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. *Mol Pharmacol* 1999;56:807–12.
- Hampf G, Bowsher D, Wells C, Miles J. Sensory and autonomic measurements in idiopathic trigeminal neuralgia before and after radiofrequency thermocoagulation: differentiation from some other causes of facial pain. *Pain* 1990;40:241–8.
- Imamura Y, Kawamoto H, Nakanishi O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res* 1997;116:97–103.
- Jannetta PJ. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. *J Neurosurg* 1967;26:159–62.
- Jarvis MF, Wessale JL, Zhu CZ, Lynch JJ, Dayton BD, Calzadilla SV, et al. ABT-627, an endothelin ET(A) receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2000;388:29–35.
- Kitano Y, Kurihara H, Kurihara Y, Maemura K, Ryo Y, Yazaki Y, et al. Gene expression of bone matrix proteins and endothelin

- receptors in endothelin-1-deficient mice revealed by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 1998;13:237–44.
- Khodorova A, Navarro B, Jouaville LS, Murphy JE, Rice FL, Mazurkiewicz JE, et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nat Med* 2003;9:1055–61.
- Kurokawa K, Yamada H, Ochi J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol* 1997;389:348–60.
- Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuroreport* 2000;11:657–61.
- Masaki T. Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:219–24.
- Max MB, Schafer SC, Culnane M, Dubner R, Gracely RH. Association of pain relief with drug side effects in postherpetic neuralgia: a single-dose study of clonidine, codeine, ibuprofen, and placebo. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43:363–71.
- May A, Gijsman HJ, Wallnofer A, Jones R, Diener HC, Ferrari MD. Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine attacks. *Pain* 1996;67:375–8.
- McAuley MA, Breu V, Graham DI, McCulloch J. The effects of bosentan on cerebral blood flow and histopathology following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;307:171–81.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416:52–8.
- Menendez 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 Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2003;367:28–34.
- Milner P, Loesch A, Burnstock G. Endothelin immunoreactivity and mRNA expression in sensory and sympathetic neurones following selective denervation. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:727–34.
- Neubert JK, Widmer CG, Malphurs W, Rossi HL, Vierck Jr CJ, Caudle RM. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain* 2005;116:386–95.
- Opgenorth TJ, Adler AL, Calzadilla SV, Chiou WJ, Dayton BD, Dixon DB, et al. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:473–81.
- Patel TR, McAuley MA, McCulloch J. Effects on feline pial arterioles in situ of bosentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1994;260:65–71.
- Peters CM, Lindsay TH, Pomonis JD, Luger NM, Ghilardi JR, Sevcik MA, et al. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. *Neuroscience* 2004;126:1043–52.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Frighetto M, Souza GE, Henriques MG, Rae GA. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin sensitised mice. *Br J Pharmacol* 2004;141:755–63.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Souza GE, Rae GA. 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* 2000;129:961–8.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Tonussi CR, Rae GA. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;351:15–22.
- Pomonis JD, Rogers SD, Peters CM, Ghilardi JR, Mantyh PW. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. *J Neurosci* 2001;21:999–1006.
- Raffa RB, Schupsky JJ, Jacoby HI. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ETA and ETB receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:647–51.
- Rappaport ZH, Devor M. Trigeminal neuralgia: the role of self sustaining discharge in the trigeminal ganglion. *Pain* 1994;56:127–38.
- Rodrigues-Filho R, Campos MM, Ferreira J, Santos AR, Bertelli JA, Calixto JB. Pharmacological characterisation of the rat brachial plexus avulsion model of neuropathic pain. *Brain Res* 2004;1018:159–70.
- Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 2005;8:626–34.
- Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Albini A, Natali PG, et al. Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol* 2003;163(2):753–62.
- Roytta M, Wei H, Pertovaara A. Spinal nerve ligation-induced neuropathy in the rat: sensory disorders and correlation between histology of the peripheral nerves. *Pain* 1999;81:221–3.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 2003;112:819–29.
- Syriatowicz JP, Hu D, Walker JS, Tracey DJ. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience* 1999;94:587–94.
- Takahashi K, Sato J, Mizumura K. Responses of C-fiber low threshold mechanoreceptors and nociceptors to cold were facilitated in rats persistently inflamed and hypersensitive to cold. *Neurosci Res* 2003;47:409–19.
- Tracey DJ, Walker JS. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res* 1995;44:407–11.
- Verri Jr WA, Schivo IR, Cunha TM, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:710–7.
- Verri Jr WA, Molina RO, Schivo IR, Cunha TM, Parada CA, Poole S, et al. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin acting on ETB receptors in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005. [Epub ahead of print].
- von Geldern TW, Tasker AS, Sorensen BK, Winn M, Szczepankiewicz BG, Dixon DB, et al. Pyrrolidine-3-carboxylic acids as endothelin antagonists. 4. Side chain conformational restriction leads to ET(B) selectivity. *J Med Chem* 1999;42(18):3668–78.
- Vos BP, Maciewicz RJ. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain. Amsterdam: Elsevier; 1991. p. 147–58.
- Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 1994;14:2708–23.
- Wacnik PW, Eikmeier LJ, Ruggles TR, Ramnaraine ML, Walcheck BK, Beitz AJ, et al. Functional interactions between tumor and peripheral nerve: morphology, algogen identification, and behavioral characterization of a new murine model of cancer pain. *J Neurosci* 2001;21:9355–66.
- Weber H, Holme I, Amlie E. The natural course of acute sciatica with nerve root symptoms in a double-blind placebo-controlled trial evaluating the effect of piroxicam. *Spine* 1993;18:1433–8.
- Wessale JL, Adler AL, Novosad EI, Calzadilla SV, Dayton BD, Marsh KC, et al. Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621: ex vivo and in vivo studies. *Clin Sci* 2002;103:1125–7S.
- Wu-Wong JR, Dixon DB, Chiou WJ, Sorensen BK, Liu G, Jae HS, et al. Pharmacology of endothelin receptor antagonists ABT-627, ABT-546, A-182086 and A-192621: in vitro studies. *Clin Sci* 2002;48:107S–11S.



- Yamada H, Kurokawa K. Histochemical studies on endothelin and the endothelin-A receptor in the hypothalamus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S215–8.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411–5.
- Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19):10954–9.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.