

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

Ana Paula Luiz

**UMA NOVA VISÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
B₁ E B₂ PARA CININAS NA DOR NEUROPÁTICA OROFACIAL**

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L953n Luiz, Ana Paula

Uma nova visão da participação dos receptores B1 e B2 para
cininas na dor neuropática orofacial [tese] / Ana Paula Luiz ;
orientador, Giles Alexander Rae. - Florianópolis, SC, 2011.
97 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Bradicinina. 3. Neuralgia. 4. Nervo
trigêmeo. I. Rae, Giles Alexander. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

CDU 615

Ana Paula Luiz

**UMA NOVA VISÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
B₁ E B₂ PARA CININAS NA DOR NEUROPÁTICA OROFACIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro

Florianópolis

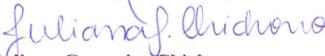
2011

"Uma nova visão da participação dos receptores B₁ e B₂ para
cininas na dor neuropática orofacial".

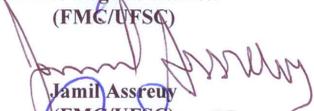
ANA PAULA LUIZ

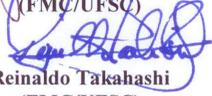
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos
membros da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:

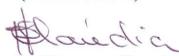

Giles Alexander Rae
Presidente (FMC/UFSC)

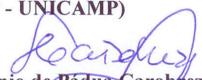

Juliana Geremias Chichorro
Co-Orientadora (FMC/UFPR)


Carlos Rogério Tonussi
(FMC/UFSC)


Jamil Assreuy
(FMC/UFSC)


Reinaldo Takahashi
(FMC/UFSC)


Claudia Herrera Tambeli
(FOP - UNICAMP)


Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 14 de abril de 2011.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre colocar em meu caminho pessoas que contribuem para o meu crescimento e me auxiliam a superar os momentos difíceis. Senhor, os seus anjos estão sempre ao meu lado. Obrigada.

Ao professor Dr. Giles Alexander Rae, meu orientador, meu especial agradecimento pelo meu crescimento científico, pelos conselhos profissionais e pelo convívio diário. Obrigada pela confiança em mim depositada ao longo do doutorado. Tenho orgulho de ter sido uma das suas discípulas, ou se preferir, uma das “suas filhotas”.

A minha co-orientadora, Dra. Juliana Geremias Chichorro, agradeço por ter me acolhido tão bem como orientanda. Saiba que a admiro muito como profissional e também a maneira serena como enfrenta seus desafios. Muito obrigada, por contribuir para o meu crescimento científico.

A aluna de iniciação científica Samilla Driessen Schroeder, pela parceria inestimável no desenvolvimento deste projeto. Apesar do início tumultuado, quando você só cuidava dos animais diabéticos por falta de camundongos, seguida pela fase do “aumentar o n”, você persistiu bravamente. Pelas incontáveis horas fazendo experimentos, gráficos, discutindo sobre algum artigo ou até mesmo fofocando, Muito Obrigada.

As amigas Alessandra e Stefânia, obrigada pelas horas de descontração no laboratório, seja falando de livros, filmes, viagens ou até mesmo sobre comidas e receitas que estão longe de ser o meu forte. Obrigada pelo apoio e conselhos nas fases decisivas do meu doutorado. Adoro vocês.

Aos colegas de laboratório: Amélia, Cibelle, Emerson, Giselle, Janice, Laurien, Leandro, Lenyta, Maria Fernanda, Rafaela. Obrigada pela convivência. “Ci” muito obrigada pelo período que trabalhamos juntas, pelos momentos que você me auxiliou nos experimentos com os ratos diabéticos.

Aos colegas do LAFEX, incluindo as técnicas Juliana e Aline, obrigada por toda a atenção e apoio nas muitas vezes em que fui ao laboratório de vocês, seja pra fazer experimento ou para pedir alguma coisa. Meu carinho e respeito por toda a ajuda disponibilizada.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Prof. Dr. João Batista Calixto, por ter aceitado participar deste trabalho, contribuindo com idéias, disponibilizando animais e o seu laboratório. Mestres, obrigado por todo o conhecimento transmitido.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Diana, Murilo, Pedro e Rita pela atenção e suporte.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, por viabilizar a realização deste doutorado.

Aos meus familiares por acreditarem nos meus sonhos ou mesmo duvidando, por me apoiarem, Muito Obrigada. Vocês são e sempre serão a minha base. Amo todos vocês.

Aos amigos: Aline, André (Bob), Felipe, Fernanda, Gisele Dalazen, Irving, Ivan (Nave), Marcelo (Dom) e Rafael. Pelas inestimáveis horas de descontração que passamos juntos e pelos infindáveis churrascos no FCC. Adoro todos vocês. Foi muito bom conhecê-los.

As amigas do coração: Bibiana, Cristina Setim e Gisele Conteçotto. Agradeço toda a paciência e carinho com que ouviram minhas reclamações tanto pessoais quanto profissionais. Vocês são pessoas muito importantes na minha vida. Amo vocês.

*“O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade”.*

Victor Hugo

RESUMO

Embora pouco prevalente entre a população, a neuralgia do trigêmeo é uma das condições mais dolorosas. Ela é caracterizada por ataques paroxísticos e recorrentes de dor lancinante e súbita, do tipo choque, limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo. Atualmente, a droga de primeira escolha para o tratamento da neuralgia trigeminal é a carbamazepina, seguida pela oxcarbazepina e gabapentina. Neste trabalho, padronizamos com sucesso o modelo de neuralgia do trigêmeo induzida pela constrição do nervo infraorbital (CNIO) em camundongos Swiss e C57Bl/6. A participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas foi avaliada frente à hiperalgesia orofacial térmica e mecânica desenvolvida em ambas as linhagens. O tratamento pela via intraperitoneal (i.p.) dos animais no 5º dia com os antagonistas para os receptores B₁ (DALBK, 0,1-3 µmol/kg) ou B₂ HOE-140 (0,01-1 µmol/kg), foi eficaz em reduzir significativamente a hiperalgesia térmica e mecânica. Quando testados na fase tardia da hiperalgesia térmica ao frio (25º dia), DALBK (1 µmol/kg, i.p.) ou HOE-140 (0,1-1 µmol/kg, i.p.) mostraram-se novamente efetivos em reduzir de maneira significativa a resposta hiperalgéscica. Os mesmos tratamentos não foram eficazes na fase tardia da hiperalgesia térmica ao calor (17º dia). Já na fase tardia da hiperalgesia mecânica (36º dia), somente a DALBK (0,1-1 µmol/kg, i.p.) mostrou-se efetiva em reduzir significativamente a resposta. Animais C57Bl/6 que possuem deleção gênica para um dos ou ambos os receptores B₁ e B₂ para cininas não desenvolveram hiperalgesia térmica ou mecânica em resposta à CNIO. Neste trabalho demonstramos também que a hiperalgesia orofacial ao calor induzida pela dinorfina A administrada pela via subaracnóide (1-17, 15 nmol/sítio) foi reduzida pelo pós tratamento com DALBK (1 e 3 µmol/kg, i.p.), mas não com HOE-140. Corroborando esses resultados, o tratamento dos animais com o antissor anti-dinorfina A reduziu significativamente a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela CNIO por até 2 horas após a sua administração. Em conjunto, estes resultados demonstram a participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas nas alterações da reatividade nociceptiva ocorridas após a CNIO, e sugerem que a dinorfina A possa atuar preferencialmente via receptor B₁ para cininas, contribuindo dessa forma para a manutenção da neuralgia do trigêmeo.

Palavras-chave: Bradicinina, Dinorfina A, Neuralgia Trigeminal.

ABSTRACT

Despite its low prevalence among the population, trigeminal neuralgia constitutes one of the most painful conditions known. It is characterized by recurrent paroxysmal attacks of sudden, excruciating shock-like pain, usually limited to one or more branches of the trigeminal nerve. Currently, the drug of first choice for treatment of trigeminal neuralgia is carbamazepine, followed by oxcarbazepine and gabapentin. The current study standardizes the model of trigeminal neuralgia induced by constriction of the infraorbital nerve (CION) in Swiss and C57Bl/6 mice. The possible participation of mechanisms operated by kinin B₁ and B₂ receptors in the maintenance of thermal and mechanical hyperalgesia induced by CION in both species was also assessed. Treatment of the animals on the fifth day after CION surgery with (Des-Arg⁹,Leu⁸)-Bradykinin (DALBK, B₁ receptor antagonist, 0.1-3 μmol/kg, i.p.) or HOE-140 (B₂ receptor antagonist, 0.01-1 μmol/kg, i.p.) effectively reduced thermal (heat and cold) and mechanical hyperalgesia. When the antagonists were tested against late phase hyperalgesia to orofacial stimulation with cold (25th day), DALBK (1 μmol/kg, i.p.) and HOE-140 (0.1-1 μmol/kg, i.p.) were also effective in reducing these hyperalgesic responses, but late-phase mechanical hyperalgesia (36th day) was transiently reduced by DALBK (0.1-1 μmol/kg, i.p.), but unaffected by HOE-140. The same treatment was not effective in the end phase heat (17^o day). Knockout mice for kinin B₁, B₂ or both receptors did not develop heat or mechanical hyperalgesia in response to CION. The study also demonstrated that subarachnoid dynorphin A (1-17) administration (15 nmol) induces orofacial heat hyperalgesia which is sensitive to attenuation by post-treatment with DALBK (1 and 3 μmol/kg, i.p.). Corroborating these results, treatment of the animals with antiserum anti-dynorphin A reduced CION-induced heat hyperalgesia for up to two hours. Taken together, these results demonstrate the participation of B₁ and B₂ receptors for kinin in orofacial sensory nociceptive changes induced by CION and that the dynorphin A, overexpressed in neuronal injury, can stimulate kinin receptors for the maintenance of trigeminal neuralgia.

Key Words: Bradykinin, Dynorphin A, Trigeminal Neuralgia.

LISTA DE FIGURAS

pág.

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Vista dorsal do tronco encefálico com desenho esquemático do complexo sensorial do trigêmeo | 4 |
| Figura 2 - Compressão do Nervo do Trigêmeo por uma artéria em posição anormal no tronco encefálico..... | 11 |
| Figura 3 - Sistema Cininérgico..... | 16 |
| Figura 4 - Possíveis mecanismos pelos quais a dinorfina participa na manutenção da dor neuropática..... | 20 |
| Figura 5 - Avaliação da estimulação mecânica em camundongos Swiss submetidos à CNIO..... | 32 |
| Figura 6 - Avaliação da estimulação térmica por calor em camundongos Swiss submetidos à CNIO..... | 34 |
| Figura 7 - Avaliação da estimulação térmica por frio em camundongos Swiss submetidos à CNIO..... | 35 |
| Figura 8 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 5º dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 37 |
| Figura 9 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 36º dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 38 |
| Figura 10 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor no 5º dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 39 |
| Figura 11 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor no 17º dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio no 5° dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 41 |
| Figura 13 - Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio no 25° dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 42 |
| Figura 14 - Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 5° e 36° dia após a CNIO em camundongos Swiss..... | 43 |
| Figura 15 - Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor em camundongos Swiss no 5° e 17° dia após a CNIO..... | 45 |
| Figura 16 - Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor em camundongos Swiss no 5° e 17° dia após a CNIO..... | 46 |
| Figura 17 - Efeito do tratamento local com os antagonistas dos receptores B ₁ (DALBK) e B ₂ (HOE-140) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor (A) e frio (B) em camundongos Swiss submetidos à CNIO..... | 48 |
| Figura 18 - Avaliação da estimulação mecânica em camundongos C57Bl/6 submetidos à CNIO..... | 50 |
| Figura 19 - Avaliação da estimulação térmica por calor em camundongos C57Bl/6 submetidos à CNIO..... | 51 |
| Figura 20 - Efeito do tratamento prévio com antagonistas de receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss..... | 53 |
| Figura 21 - Efeito do tratamento prévio com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss..... | 54 |
| Figura 22 - Efeito do tratamento diário com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss..... | 56 |
| Figura 23 - Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor no 3° dia após a administração de dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Figura 24 - Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ sobre a hiperalgesia térmica ao calor no 3º dia após a administração de dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss..... | 58 |
| Figura 25 - Efeito do tratamento com o antissoro anti-dinorfina A (1-13) sobre a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de dinorfina A (1-17, 15 nmol, s.a, A) ou CNIO (B) em camundongos Swiss..... | 60 |
| Figura 26 - Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia orofacial induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

pág.

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Influência dos diferentes tratamentos em diferentes períodos da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos Swiss..... | 77 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA - Análise de variância
ATC - Antidepressivos tricíclicos
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BK - Bradicina
CFA - Complexo adjuvante de Freund
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CNIO - Constricção do nervo infraorbital
DABK - des-Arg⁹-bradicina
DAG - Diacilglicerol
DAKD - des-Arg¹⁰-calidina
DALBK - des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicina
DRG - Gânglio da raiz dorsal
ECA - Enzima conversora de angiotensina
ERK - Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GDNF - Fator neurotrófico derivado de células gliais
GIRK - Canais retificadores de potássio acoplados a proteína G
HOE-140 – Icatibante
i.c.v. - Intracerebroventricular
i.m. - Intramuscular
i.p. - Intraperitoneal
IASP - *International Association for the Study of Pain*
IHS – *International Headache Society*
IL- Interleucina
IPR - Receptores para prostacilinas
ISRSN - Inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina
KD - Calidina
LTP - Potencial de longa duração
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
MK-801 - Maleato de dizocilpina
NaV 1.7 – Canal de sódio voltagem dependente 1.7
NaV 1.8 – Canal de sódio voltagem dependente 1.8
NF- κ B - Fator nuclear κ B
NGF - Fator de crescimento do nervo
NK1R - Receptor de neurocinina 1

NMDA - N-metil-D-aspartato
nor-BNI - nor-binaltorfimina
P2X₃ - Subtipo de receptores para purinas
PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão de fosfato)
PGE - Prostaglandina E
PHMB - ρ -hidroximercuribenzoato
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PLC - Fosfolipase C
RET - Subfamília de receptores tirosina quinase
RNA - Ácido ribonucleico
s.a. - Subaracnóide
s.c. - Subcutâneo
SP - Substância P
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
TrkA - Tirosina quinase A (receptor do NGF)
TrkB - Tirosina quinase B (receptor do BDNF)
TRPA₁ – Receptores de potencial transitório com domínios de anquirina 1
TRPV₁ – Receptores de potencial transitório vaniloide do tipo 1
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VSCC - Canais de cálcio sensíveis a voltagem

SUMÁRIO

| | pág. |
|---|-------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 Vias de Transdução da Dor..... | 1 |
| 1.2 Dor Neuropática | 5 |
| 1.3 Neuralgia do Trigêmeo..... | 10 |
| 1.4 Modelos Experimentais Preditivos de Dor neuropática | 13 |
| 1.5 Sistema da Cininas | 14 |
| 1.6 Dinorfina A (1-17) como Mediador Hiperalgésico..... | 17 |
| 1.7 Diferenças entre a Neuralgia do Trigêmeo e demais Neuropatias Periférica..... | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 Objetivo Geral | 23 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 3. MATERIAIS | 24 |
| 3.1 Animais | 24 |
| 3.2. Reagentes, Drogas e Soluções | 24 |
| 4. MÉTODOS | 26 |
| 4.1 Constrição do Nervo Infraorbital..... | 26 |
| 4.2 Testes Comportamentais..... | 26 |
| 4.2.1 Estimulação mecânica..... | 26 |
| 4.2.2 Estimulação térmica por calor..... | 27 |
| 4.2.3 Estimulação térmica por frio..... | 27 |
| 4.2.4 Resposta hiperalgésica induzida por dinorfina A (1-17)..... | 28 |
| 4.3 Tratamentos..... | 29 |
| 4.4 Análise Estatística..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 5. RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Avaliação do Decurso Temporal..... | 31 |
| 5.1.1 Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação mecânica..... | 31 |
| 5.1.2 Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor..... | 33 |
| 5.1.3 Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio..... | 33 |
| 5.2 Influência dos Tratamentos..... | 36 |
| 5.2.1 Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva mecânica induzidas pela CION..... | 36 |
| 5.2.2 Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor induzidas pela CION..... | 38 |
| 5.2.3 Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio induzidas pela CION..... | 40 |
| 5.2.4 Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação mecânica induzidas pela CION..... | 42 |
| 5.2.5 Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor induzida pela CION..... | 44 |
| 5.2.6 Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio induzida pela CION..... | 45 |
| 5.2.7 Efeito do tratamento local com os antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor e frio induzida pela CION..... | 47 |
| 5.3 Influência da deleção gênica dos receptores B ₁ e/ou B ₂ para cininas no desenvolvimento das alterações de reatividade nociceptiva orofacial mecânica induzida pela CION..... | 49 |
| 5.4 Influência da expressão dos receptores B ₁ e B ₂ para cininas no desenvolvimento das alterações de reatividade nociceptiva orofacial térmica por calor induzidas pela CION..... | 49 |

| | pág. |
|--|-------------|
| 5.5 Hiperalgesia orofacial induzida por dinorfina A (1-17)..... | 51 |
| 5.5.1 Efeito do tratamento prévio com antagonistas dos receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)..... | 51 |
| 5.5.2 Efeito do tratamento prévio com antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas sobre a hiperalgesia térmica por calor induzida pela dinorfina A (1-17)..... | 53 |
| 5.5.3 Efeito do tratamento diário com antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)..... | 55 |
| 5.5.4 Efeito do tratamento com antagonistas de receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)..... | 56 |
| 5.5.5 Efeito do tratamento com antagonistas de receptores B ₁ e B ₂ para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)..... | 57 |
| 5.5.6 Efeito do tratamento com antissoro anti-dinorfina A (1-13) sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) e pela CNIO..... | 59 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 61 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 80 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |
| 9. ANEXO | 97 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vias de Transdução da Dor

A sensação de dor tem um papel fisiológico importante ao constituir um sinal de alerta na detecção de algo que ameace a integridade física do organismo. Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante de precaução e, conseqüentemente, limitação de possíveis danos (Almeida et al., 2004). Porém, quando persistente, a dor deixa de desempenhar suas funções primordiais e passa a provocar reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento (Griffis et al., 2006).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão”. Ela pode ser dividida em duas principais categorias: a dor aguda e a dor crônica. A dor aguda é caracterizada por uma rápida sensação desagradável, que alerta o organismo de alguma ameaçada física. Esta dor geralmente responde bem ao tratamento com analgésicos opióides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Já a dor crônica não tem papel fisiológico, uma vez que ela deixa de constituir apenas um sintoma para tornar-se parte da doença. Tanto a dor inflamatória quanto a dor neuropática são subtipos da dor crônica. Como o próprio nome sugere, a dor inflamatória está associada a um processo inflamatório e sua intensidade reflete a resposta fisiológica do organismo e sua capacidade de resolução da lesão. Na segunda, a dor é deflagrada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central que, por vezes, pode ser decorrente de uma dor originalmente inflamatória. Geralmente as dores crônicas não respondem bem à terapia com AINES. Na maioria dos casos, pacientes que sofrem de dor crônica apresentam quadros de hipersensibilidade, como hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor) ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos) (para revisão ver Besson, 1999; Gold e Gebhart, 2010).

Embora a dor apresente componentes afetivos claramente significativos em humanos, a maioria quase absoluta dos modelos experimentais pré-clínicos de dor infere a intensidade da sensação dolorosa como sendo diretamente proporcional à magnitude da resposta comportamental do animal ou eletrofisiológica dos neurônios envolvidos na sua codificação e condução. Por desconsiderar os

aspectos psicológicos afetivo-emocionais que influenciam na intensidade da dor percebida, em animais, a dor é mais apropriadamente definida como nocicepção, que constitui o processo pelo qual um animal responde a estímulos ditos nociceptivos (Loeser e Treede, 2008). Porém, talvez novas metodologias, que permitam avaliar a intensidade de componentes afetivo-emocionais associados à resposta nociceptiva de roedores, seja pela atenuação da aversividade da nocicepção por tratamento com fármacos analgésicos (King et al., 2009) ou através das expressões faciais (Langford et al., 2010), venham a aperfeiçoar o valor preditivo dos modelos experimentais pré-clínicos de nocicepção para a condição clínica.

A percepção de um estímulo nociceptivo aplicado a um campo receptivo periférico se dá por estruturas específicas denominadas nociceptores (ou receptores da dor), situadas principalmente nas terminações nervosas de uma parcela das fibras sensoriais aferentes primárias, chamadas de fibras nociceptivas. Estes neurônios periféricos estão amplamente distribuídos na pele, vasos sanguíneos, músculos, articulações e vísceras, sendo sensíveis a estímulos nocivos ou potencialmente danosos ao organismo (Gold e Gebhart, 2010). De modo geral, as fibras aferentes primárias que geram e conduzem os impulsos elétricos que codificam a informação proprioceptiva ou nociceptiva ao sistema nervoso central são classificadas em fibras A e C. As fibras A são mielinizadas e subdivididas de acordo com seu diâmetro e velocidade de condução, em α , β e δ . As fibras C não são mielinizadas e geralmente apresentam diâmetro menor que o de fibras A. Estudos de correlação entre experiências sensoriais e o bloqueio seletivo de subtipos de fibras aferentes primárias demonstram que estas fibras conduzem seletivamente a informação referente a diferentes modalidades sensoriais. Aquelas de maior diâmetro (fibras A α e A β) são normalmente associadas à geração e transmissão de informação proprioceptiva, enquanto as de menor diâmetro e pouca (fibras A δ) ou nenhuma (fibras C) mielina são comumente importantes para a percepção de alterações na temperatura e de estímulos nocivos de diferentes naturezas (Julius e Basbaum, 2001). Porém, classificar fibras como sendo nociceptivas apenas com base em seu pequeno diâmetro ou sua baixa velocidade de condução é inapropriado. Por exemplo, neurônios nociceptivos viscerais têm diâmetro maior que os não viscerais (Gold e Gebhart, 2010).

As subpopulações de neurônios nociceptivos são frequentemente definidos com base na expressão de alguns marcadores

específicos. Dessa forma, a presença dos neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) define uma subpopulação de fibras C peptidérgicas, que expressam ainda o receptor tirosina quinase A (TrkA) para a neurotrofina NGF (fator de crescimento do nervo). Outra subpopulação de fibras C pode ser caracterizada por não expressar estes neuropeptídeos, mas sim o receptor tirosina quinase RET para a neurotrofina GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais), sítios de ligação para a isolectina B4 e o receptor P2X₃ para as purinas. Porém, pode haver diferenças na população de fibras nociceptivas que inervam distintos tecidos. Por exemplo, entre os neurônios nociceptivos viscerais, a proporção de imunorreativos para CGRP e que expressam TrkA é maior do que o verificado entre a população de neurônios cutâneos e, por vezes, há células que expressam marcadores das duas subpopulações (como RET e TrkA). Recentemente, outros receptores tem sido utilizados para identificar novos subtipos de neurônios nociceptivos, como os canais de sódio dependentes de voltagem NaV 1.7 e NaV 1.8 e os receptores de potencial transitório (TRP) TRPA1 e TRPV1. Todavia, em vista da distribuição variada destes novos marcadores entre as diferentes subpopulações de nociceptores, a utilidade dos mesmos na classificação de novas subclasses é ainda limitada (para revisão ver Gold e Gebhart, 2010).

As fibras sensoriais nociceptivas aferentes primárias que inervam a maior parte do organismo têm seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e estabelecem conexões sinápticas, com neurônios nociceptivos de segunda ordem, na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Estas últimas, por sua vez, projetam axônios que integram os tratos espinoreticular, espinomesencefálico, espinotalâmico e espinohipotálamico e transmitem a informação nociceptiva para neurônios terciários em centros encefálicos, incluindo a formação reticular, tálamo e hipotálamo, de onde a informação é remetida ao córtex cerebral (Craig e Dostrovsky, 1999; Almeida et al., 2004).

Em contraste, as fibras sensoriais nociceptivas aferentes primárias que inervam a região da cabeça e da face integram os diferentes ramos do nervo trigêmeo e têm seus corpos celulares agrupados no gânglio do trigêmeo, também conhecido como gânglio de Gasser. Tais neurônios fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, localizados nos núcleos sensoriais do tronco cerebral, que conduzem a informação nociceptiva para diferentes núcleos talâmicos (Dostrovsky, 2000). O nervo trigêmeo integra o quinto par dos nervos cranianos e

possui este nome por dividir-se em três principais ramos: oftálmico, maxilar e mandibular (Sessle, 2005).

As aferências do gânglio do trigêmeo se projetam para o complexo sensorial do trigêmeo, que é formado pelos núcleos sensoriais principal e espinal, localizados no sistema nervoso central, na altura da ponte. O núcleo principal recebe, majoritariamente, informações de axônios de maior diâmetro relacionados ao tato discriminativo ou epicrítico (discriminação de dois pontos em contato com a pele) e, em menor parcela, informação protopática (sensibilidade pouco precisa ao tato, temperatura e pressão). O núcleo espinal é uma continuação caudal do núcleo principal, recebe principalmente informação nociceptiva, incluindo aquela associada a dores de cabeça do tipo enxaqueca, e subdivide-se em três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (Figura 1) (Mascaro et al., 2008; Woda, 2003). A percepção dolorosa é transmitida principalmente ao núcleo espinal caudal. A parte ventral de todos os núcleos compreende principalmente aferências dos neurônios que possuem campos receptivos da região inervada pelo ramo oftálmico. Já as regiões dorsal e medial de todos os núcleos recebem projeções de neurônios cujos campos receptivos estão situados nas regiões inervadas pelos ramos mandibular e maxilar, respectivamente (Sessle, 2005).

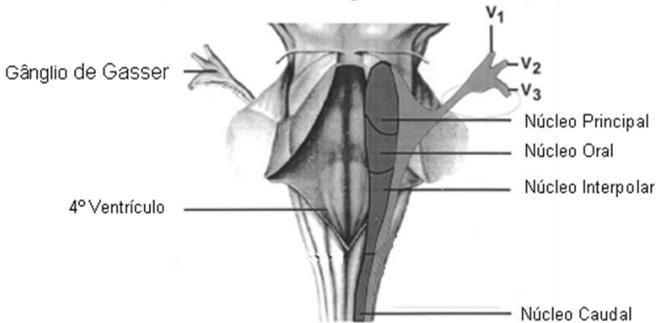


Figura 1. Vista dorsal do tronco encefálico com desenho esquemático do complexo sensorial do trigêmeo. Divisões do núcleo espinal: caudal, interpolar e oral. Núcleo Principal. Raízes sensoriais do nervo do trigêmeo: V1 – nervo oftálmico, V2 – nervo maxilar e V3 – nervo mandibular. Gânglio do trigêmeo (gânglio de Gasser) (Adaptado de Woda, A., 2003).

A grande maioria das fibras aferentes primárias A δ e C transmitem informação nociceptiva da região orofacial para o núcleo espinal caudal, projetando-se principalmente para as lâminas I, II, V e VI, enquanto as fibras A α e β de maior calibre, que conduzem a informação proprioceptiva, projetam-se para as lâminas III-VI. A estrutura do núcleo espinal caudal é subdividida em lâminas, à

semelhança do corno dorsal da medula espinhal, o que o distingue morfológicamente dos outros núcleos trigeminais que apresentam uma estrutura mais uniforme. Além disso, este núcleo é o único do complexo sensorial do trigêmeo que possui substância gelatinosa (envolvida na modulação nociceptiva) (para revisão ver Sessle, 2005).

O controle inibitório da percepção de estímulos nocivos da região orofacial pode ser modulado por diferentes regiões do tronco encefálico e centros superiores cerebrais como o núcleo espinhal caudal, substância cinzenta periaquidantal, núcleo magno da rafe, área pré-tectal anterior e área parabraquial do tronco encefálico e córtex sensorimotor. Estas estruturas exercem sua ação inibitória mediante a liberação de mediadores químicos como a serotonina, encefalinas e GABA (Sessle, 2000; Sessle, 2005).

1.2. Dor Neuropática

Com o aumento da expectativa geral de vida e da sobrevivência dos pacientes com disfunções dolorosas, como consequência do rápido avanço na prevenção, diagnóstico e intervenções das doenças, a demanda por medicações para o tratamento de dor tem aumentado. Dessa forma, instituições de pesquisa, organizações de saúde e a indústria farmacêutica têm investido em pesquisas que desvendem melhor os mecanismos de percepção da dor e identifiquem novos alvos para tratar dores específicas (dor do câncer e dor neuropática, entre outras). Dentre as diversas modalidades de dor crônica, destacamos a dor neuropática que ainda carece de terapias que lhe dêem resolução satisfatória, o que prejudica a qualidade de vida do paciente e gera altos custos para o serviço de saúde (Luo, 2004).

A dor neuropática é definida pela IASP como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso”. Ela geralmente se apresenta como uma dor persistente, intensa e, em alguns casos, espontânea, associada a sensações de queimação e alfinetadas, acompanhada freqüentemente por hiperalgesia e/ou alodinia (Finnerup e Jensen, 2004). Essas manifestações ocorrem principalmente devido a alterações morfofuncionais ocorridas na medula espinhal (Coderre et al., 1993; Ji e Woolf, 2001). O dano ou disfunção neural pode manifestar-se por sintomas negativos (perda sensorial), assim como por sintomas positivos (parestesia, hiperalgesia) (Chong e Bajwa, 2003). Geralmente, a dor neuropática se manifesta dias ou meses após a lesão inicial, ainda na ausência de anormalidades clínicas ou radiográficas identificáveis, e

sua intensidade pode variar de pessoa para pessoa, de nervo para nervo, entre homens e mulheres e com a idade.

Em algumas situações, a dor neuropática pode se estender para além dos limites do campo receptivo dos nervos lesados, manifestando-se bilateralmente, o que sugere alterações nos mecanismos centrais de processamento da informação nociceptiva (Coderre et al., 1993). Dentre as alterações centrais que ocorrem na dor neuropática, podemos citar a perda neuronal, principalmente das fibras do tipo C, devido à sua compressão. Com isso, as terminações centrais das fibras A β , que normalmente restringem-se à lâmina III do corno dorsal da medula espinhal sofrem um rearranjo, brotando para as lâminas mais superficiais da medula (I e II), ocupando os espaços anteriormente preenchidos pelas terminações centrais das fibras C. As novas sinapses formadas entre fibras A β e neurônios nociceptivos secundários passam então a gerar informação que é erroneamente decodificada no encéfalo como sendo nociceptiva (Woolf et al., 1995; Tandrup et al., 2000).

As fibras C também podem ser sensibilizadas por estimulação repetitiva, resultando em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Este fenômeno é conhecido como *wind up* (Herrero et al., 2000), que é caracterizado pelo aumento progressivo no número de potenciais de ação de neurônios do corno dorsal evocados por estímulo (Liu et al., 2000). Episódios de *wind up* podem levar à potenciação de longo prazo (*Long-Term Potentiation*, LTP), que consiste em reforço persistente da eficiência da transmissão sináptica (Pockett, 1995), e seu surgimento parece decorrer do aumento na expressão de canais de sódio dependentes de voltagem e da diminuição na expressão de canais de potássio que ocorre em resposta à lesão neural (Baron, 2006).

Os canais de sódio dependentes de voltagem expressos no sistema nervoso são divididos em dois grupos de acordo com sua sensibilidade à tetrodotoxina, sendo assim classificados como canais de sódio sensíveis ou resistentes à tetrodotoxina. Os primeiros são expressos preferencialmente por fibras de diâmetro médio a grande, enquanto que os últimos são encontrados principalmente em fibras C, e ambos têm sua expressão alterada após a lesão de nervos ou axotomia (Akopian et al., 1996; Cummins e Waxman, 1997). Ambos os canais parecem ser os principais responsáveis pela geração dos disparos ectópicos, que contribuem para a dor espontânea e sensibilização de neurônios periféricos e centrais (Woolf, 2004). Outras alterações responsáveis pela dor crônica são a diminuição da neurotransmissão inibitória na medula espinhal, especialmente a GABAérgica (Woolf,

2004), bem como a redução da eficácia analgésica dos opióides endógenos (Zhang et al., 1998).

A exemplo do que acontece no processo inflamatório, na dor neuropática, a ação dos mediadores excitatórios sobre seus receptores, tanto em neurônios periféricos quanto centrais, inicia uma cascata de sinalização que culmina na manutenção do potencial de ação. Dessa forma, o envolvimento das células gliais periféricas na dor neuropática parece estar relacionado à liberação de mediadores inflamatórios (Moalem e Tracey, 2005; Baron, 2006). Frequentemente a dor neuropática está associada a alterações na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores e mediadores de sinalização extracelular, entre outros. O melhor entendimento dos caminhos de sinalização intracelular em neurônios e células gliais que contribuem para a dor neuropática podem revelar novos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese desta desordem. Estes mecanismos incluem indução da sensibilização através da regulação pós-transcricional de moléculas envolvidas na percepção sensorial de neurônios centrais e periféricos, particularmente a nocicepção, e a manutenção da sensibilização por regulação transcricional. Tudo isso mediado pela ação de múltiplas proteínas quinases (para revisão ver Ji e Strichartz, 2004).

O primeiro exemplo de hiper-sensibilização evocada por estímulos é a sensibilização central das fibras aferentes do tipo C, que resulta na percepção dolorosa a estímulos inócuos. Esta alteração é uma manifestação direta de mudanças pós-transcricionais dependentes de ativação de neurônios da medula espinhal. A liberação pré-sináptica de glutamato, SP e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) também resulta em mudanças na transdução de sinal nociceptivo em neurônios da medula espinhal, como resultado da ativação direta ou indireta de canais iônicos ativados por ligantes (NMDA, NK1 e TrkB). Porém, a maior alteração pós-transcrição que ocorre na medula espinhal são os prostanóides (prostaglandina E (PGE), prostaciclina e receptores IP), que podem ser liberados de sítios pré- e pós-sinápticos. A ativação destes múltiplos receptores resulta no aumento do cálcio intracelular e consequente ativação de enzimas dependentes de cálcio, proteína quinase A (PKA) e tirosina quinase (TrK). O alvo dessas diferentes quinases são receptores acoplados a membrana, canais iônicos (NMDA e AMPA), incluindo a ativação da sintase de óxido nítrico neuronal, produção de prostaglandinas com geração de sinais retrógrados para o terminal pré-sináptico. Todos juntos estes fatores contribuem para a

indução e manutenção da dor neuropática (para revisão ver Woolf e Costigan, 1999).

As principais causas de dor neuropática são: lesões traumáticas de nervos, infecção por *Herpes zoster*, diabetes, radioterapia, quimioterapia, álcool, AIDS, doenças auto-imunes (esclerose múltipla, mielopatias infecciosas e degenerativas), deficiência de vitamina do complexo B, lesões isquêmicas, compressão neural, tumores, degeneração distal e doença de Parkinson (Galvão, 2005).

Uma vez diagnosticada, a dor neuropática pode ser classificada de acordo com as seguintes características:

- Localização - periférica ou central;
- Etiologia - trauma, isquemia ou hemorragia, inflamação, metabólica, neurotóxica, neurodegenerativa, deficiência de vitamina, câncer;
- Sintomas/sinais - tipo de dor, perda ou ganho sensorial, polineuropatias ou mononeuropatias;
- Mecanismos envolvidos - descargas ectópicas, perda da inibição, sensibilização periférica ou central. (Haanpää e Treede, 2010).

Pacientes com dor neuropática geralmente são refratários ao tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais e resistentes ou insensíveis aos opióides quando os mesmos são utilizados com frequência. As indicações farmacológicas descritas na literatura e disponíveis comercialmente para o tratamento da dor neuropática, nem sempre funcionam para todos os pacientes ou apresentam efeitos colaterais que limitam sua dosagem ou impossibilitam a continuidade do tratamento. Dessa forma, vários outros fatores devem ser considerados para a escolha de um fármaco específico para um paciente com dor neuropática, dentre eles: os potenciais efeitos colaterais associados à medicação; potencial interação medicamentosa; co-morbidades que podem ser melhoradas pelo efeito não analgésico do fármaco (distúrbios do sono, depressão, ansiedade); custo associado à terapia; potencial risco de abuso da medicação; risco de sobredosagem intencional. Todos esses fatores devem ser priorizados de acordo com a necessidade de cada paciente (Dworkin et al., 2007).

LaBuda e colaboradores (2005) demonstraram que a hiperalgesia induzida pela ligadura do nervo espinhal em ratos, um modelo de nocicepção neuropática, foi revertida pelo tratamento com gabapentina, amitriptilina e fluoxetina, mais não por indometacina. Estes resultados pré-clínicos podem ser correlacionados com a eficácia

dos fármacos de primeira escolha e a ineficácia do tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais utilizados em humanos com dor neuropática, validando a utilização de roedores para a pesquisa de novos alvos terapêuticos. Portanto, embora muitos modelos experimentais não reproduzam fielmente as alterações comportamentais observadas em humanos, a eficácia de fármacos padrão pode reforçar o valor preditivo clínico de um modelo, quando o mesmo é utilizado para testar a eficácia de potenciais novos fármacos.

Atualmente, duas classes de fármacos são recomendadas para tratamento de dor neuropática, como primeira escolha: a) os antidepressivos tricíclicos (ATC; nortriptilina e desipramina) e inibidores da recaptção de serotonina ou de noradrenalina (ISRSN; duloxetina e venlafaxina); e b) os antiepiléticos (gabapentina e pregabalina). Para pacientes com dor localizada recomenda-se ainda a utilização tópica de lidocaína e capsaicina, embora sua eficácia em estudos que o comparam com placebo seja modesta. Já para crises de dores neuropáticas aconselha-se a utilização de analgésicos opióides, como morfina, oxicodona, metadona, levorfanol ou tramadol. Apesar do aumento recente nos estudos e debates sobre a utilização continuada de opióides no alívio de dores neuropáticas, o emprego crônico destes fármacos não é recomendado por causa dos seus múltiplos efeitos colaterais que incluem constipação intestinal, dependência física, tolerância farmacodinâmica e até mesmo em alguns casos hiperalgesia. Estudos demonstram que a combinação de fármacos de diferentes classes resulta em alívio mais eficaz da dor neuropática, associado a uma menor proporção de efeitos colaterais (Dworkin et al., 2007; O'Connor e Dworkin, 2009; Tölle, 2010; Attal e Finnerup, 2010). Convém mencionar ainda que novos fármacos para utilização na dor neuropática vêm sendo testados, entre os quais se destacam os “patches” de capsaicina, a toxina botulínica A e os agonistas de receptores canabinóides (Attal e Finnerup, 2010).

É importante salientar que as recomendações para tratamento de dor neuropática mencionadas acima não são aplicáveis em pacientes pediátricos ou com neuralgia do trigêmeo (*tic douloureux*). As recomendações para tratamento pertinentes a tais casos foram especificadas recentemente (O'Connor e Dworkin, 2009), e a próxima secção dedicada especificamente à neuralgia do trigêmeo, abordará também suas indicações terapêuticas.

1.3. Neuralgia do Trigêmeo

A primeira descrição da neuralgia do trigêmeo, ou de uma condição similar a ela, foi descrita no século II A.C. por Aretaeus da Capadócia, contemporâneo de Galeno. Também conhecido por suas descrições de enxaqueca, ele fez referência a uma dor em espasmos com distorção do semblante facial (Rose, 1999). No século XI, o médico árabe Jujani mencionou uma dor facial unilateral causadora de espasmos e ansiedade em seus escritos. Interessantemente, ele sugere que a causa desta dor seria a proximidade da artéria ao nervo. Em 1756, Nicolaus André utilizou o termo *tic douloureux* para descrever o que ele acreditava ser uma nova doença clínica. Em 1773, John Fothergill publicou o primeiro relato contendo uma descrição completa de um caso de neuralgia do trigêmeo, a que chamou de doença de Fothergill. O trabalho, que foi apresentado como artigo à sociedade médica de Londres, descreve as características típicas da condição em detalhes, como dor facial unilateral paroxística evocada pelo ato de comer, falar ou tocar, de início e fim repentinos e associados à ansiedade. Posteriormente, Trousseau (1853) denomina a neuralgia do trigêmeo de neuralgia epileptiforme (para revisão ver Nurmikko e Eldridge, 2001; Debta et al., 2010). Em 1988 a neuralgia trigeminal é inserida pelo comitê de classificação de cefaléias, da sociedade internacional de cefaléias, no módulo 12 da classificação e critérios de diagnósticos das cefaléias, neuralgias cranianas e dores faciais (Quesada et al., 2005).

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

apresentam maior risco de desenvolver neuralgia do trigêmeo que a população em geral (Nurmikko e Eldridge, 2001).

Os três grandes ramos do par de nervos trigêmeos, com suas respectivas e extensas ramificações, são responsáveis pela inervação somato-sensorial da cabeça e face. O ramo oftálmico inerva testa, pálpebra, córnea, conjuntiva ocular, mucosas dos seios frontais, etmoidais, esfenoidais e dorso do nariz. O ramo maxilar inerva lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O ramo mandibular inerva lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua. Enquanto que os dois primeiros ramos são puramente sensoriais, o terceiro ramo é formado por fibras sensoriais, bem como fibras motoras responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios (Usunoff et al., 1997; Voogd et al., 1998).

Tem sido proposto que a neuralgia do trigêmeo origina-se da desmielinização do nervo, propiciando o desencadeamento de disparos ectópicos (Love e Coakham, 2001). Porém, cerca de 80 a 90% dos casos classificados como idiopáticos (clássica ou essencial) são causados por compressão do nervo trigêmeo imediatamente na sua saída do tronco encefálico, principalmente pela artéria cerebelar superior (Figura 2) (Krafft, 2008; Nurmikko e Eldridge, 2001). Os casos restantes, denominados de neuralgia secundária, têm como causa lesões intracranianas que podem estar relacionadas a tumores, esclerose múltipla, anormalidade da base craniana ou malformação vascular. Na neuralgia secundária a dor pode ser contínua ou na forma de ataques prolongados (Bennetto et al., 2007).

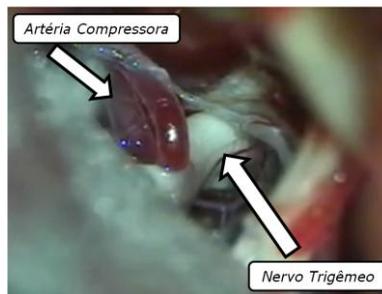


Figura 2. Compressão do nervo do trigêmeo por uma artéria em posição anormal no tronco encefálico (adaptado de uma imagem cirúrgica real).

Na maioria dos casos, o diagnóstico é apenas clínico, embora estudos de imagem ou testes especializados possam ser necessários em pacientes com manifestações atípicas, como idade inferior a 40 anos, sintomas bilaterais, tontura ou vertigem, perda ou distúrbio da audição, episódios de dor com duração maior que dois minutos, dor fora da distribuição do trigêmeo e alterações visuais (Krafft, 2008).

Apesar de ser classificada como dor neuropática, a neuralgia do trigêmeo demanda um tratamento diferenciado das outras formas de neuropatia. Atualmente, a carbamazepina é o fármaco de primeira escolha, embora o tratamento requeira acompanhamento com exames clínicos constantes, por risco de causar efeitos colaterais graves, como agranulocitose e anemia aplásica, (Wiffen et al., 2005; Attal e Finnerup, 2010). Quando há efeitos colaterais intensos, é possível substituir a carbamazepina por seu análogo cetônico, a oxcarbazepina, embora haja risco de reação alérgica cruzada entre estes fármacos. Em casos nos quais a carbamazepina promove alívio incompleto da dor, é possível adicionar um segundo agente ou trocá-la por outro fármaco (Canvaro e Bonicalzi, 2006; Gomez-Arguelles et al., 2008).

A gabapentina pode ser uma alternativa terapêutica útil em casos de neuralgia do trigêmeo resistentes à terapia tradicional, com redução marcada ou remissão da percepção dolorosa em 27% dos casos. Este fármaco é considerado como medicação de segunda linha no tratamento da neuralgia do trigêmeo (Wiffen et al., 2005). A gabapentina não reduz diretamente as descargas ectópicas no gânglio do trigêmeo, mas interfere com a transmissão nociceptiva no sistema nervoso central, atuando sobre a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Lemos et al., 2008).

Pacientes com neuralgia do trigêmeo que são intolerantes à terapêutica medicamentosa, ou que não respondem às terapias existentes, podem ser submetidos ao tratamento por procedimento cirúrgico, que pode ser percutâneo ou aberto (Bennetto et al., 2007; Krafft, 2008). As técnicas percutâneas consistem em compressão por balão, rizotomia por radiofrequência, ou glicerol, ou radiocirurgia estereotáxica com raios gama. Essas técnicas têm a vantagem de serem pouco invasivas, de caráter ambulatorial e isentas de efeitos colaterais graves. Contudo, promovem perda da sensibilidade em grande parte dos pacientes, bem como alívio menos duradouro que as intervenções cirúrgicas abertas. Estas últimas são a rizotomia parcial e a descompressão microvascular, que envolvem a exploração da fossa craniana posterior e maior risco de complicações graves, como meningite, e morte (Ong e Keng, 2003). A descompressão

microvascular é considerada a técnica que promove alívio mais duradouro, com controle da dor em mais de 70% dos pacientes por 10 anos (Tomasello et al., 2008).

Ainda não há consenso sobre qual é o melhor tratamento para a neuralgia do trigêmeo: se o farmacológico ou o cirúrgico. Entretanto, são aspectos importantes a considerar na escolha: o alívio da dor, sua recorrência e morbidade, bem como o risco de mortalidade (Ong e Keng, 2003; Krafft, 2008). Portanto, assim como as dores neuropáticas descritas anteriormente, a neuralgia do trigêmeo ainda carece de uma medicação realmente efetiva para utilização crônica.

1.4. Modelos Experimentais Preditivos de Dor Neuropática

Na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos na dor neuropática, bem como identificar potenciais alvos terapêuticos efetivos, diversos modelos experimentais vêm sendo padronizados e avaliados em animais. Estes modelos abrangem lesões tanto de nervos periféricos (como ciático, espinhais ou do plexo braquial), quanto cranianos (nervo trigêmeo), bem como suas ramificações. O primeiro modelo cirúrgico de dor neuropática a ser desenvolvido foi o de transecção completa do nervo ciático (Wall et al., 1979), o qual foi seguido pelos de ligação total (Bennett e Xie, 1988) ou parcial (Seltzer et al., 1990) do mesmo nervo. Modelos cirúrgicos alternativos, desenvolvidos posteriormente, incluem os de contração dos nervos espinhais L5 e L6 (Kim e Chung, 1992), do nervo infraorbital (Vos et al., 1994), ou ainda o de avulsão do plexo braquial (Rodrigues-Filho et al., 2003). Todos estes modelos cirúrgicos, à exceção do último, causam mononeuropatias. Também merecem destaque alguns outros modelos que fazem uso de ferramentas farmacológicas para a indução de polineuropatias, especialmente a diabetes persistente resultante da administração de estreptozotocina ou aloxano, ou ainda a administração subcrônica de quimioterápicos, como vincristina, cisplatina ou paclitaxel (Flatters e Bennett, 2004).

A contração do nervo infraorbital em ratos é um dos modelos animais utilizados para o estudo da neuralgia do trigêmeo em ratos. Este nervo é predominantemente sensorial, corresponde a quase toda divisão maxilar do trigêmeo e é formado por 18 a 25 feixes nervosos, os quais contêm aproximadamente 20.000 fibras mielinizadas (60%) e 13.000 fibras não mielinizadas (40%) (Jacquin et al., 1984). Estudos prévios demonstraram que ratos submetidos à contração do nervo infraorbital desenvolvem hiperalgesia a estímulos mecânicos, térmicos e químicos

(Vos et al., 1994; Anderson et al., 2003). Recentemente, foram padronizados dois novos modelos de neuralgia do trigêmeo em camundongos, que consistem na ligação parcial do nervo infraorbital (Xu et al., 2008) e na ligação total do nervo mental (Seino et al., 2009). Em ambos os estudos, os animais apresentam hiperalgisia mecânica persistente.

Vários sistemas de neurotransmissores ou mediadores químicos endógenos participam do desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, tais como as endotelinas, diversas citocinas e as cininas (Werner et al., 2007; Quintão et al., 2008; Chichorro et al., 2009; Werner et al., 2010; Austin e Moalen, 2010). Embora existam evidências da participação das cininas em diferentes modelos de dor neuropática, como na constrição do nervo ciático (Ferreira et al., 2005), ligação dos nervos espinhais (Werner et al., 2007) e avulsão do plexo braquial (Quintão et al., 2008), o possível envolvimento deste sistema em um modelo de neuralgia do trigêmeo ainda não foi examinado.

1.5. Sistema das Cininas

O primeiro mediador integrante da família das cininas a ser descrito foi a bradiginina (BK), peptídeo isolado por Rocha e Silva e colaboradores (1949), gerada a partir do cininogênio presente em plasma incubado com veneno da serpente *Bothrops jararaca*. O nome bradiginina foi atribuído de modo a expressar sua lenta ação contrátil sobre segmentos de fleo isolados de cobaia. O nonapeptídeo BK e seu homólogo decapeptídeo calidina (KD) são peptídeos endógenos vasoativos que exercem múltiplas funções fisiológicas, seja no controle da pressão arterial (por conta dos seus efeitos contráteis e relaxantes sobre o músculo liso vascular), na resposta inflamatória ou na indução de nocicepção e hiperalgisia (Calixto et al., 2000; Couture et al., 2001).

A BK e a KD são sintetizadas a partir de precursores inativos chamados de cininogênios, pela ação das calicreínas, que são serino-proteases encontradas nas formas plasmática e tecidual. As calicreínas diferem completamente em suas características bioquímicas, imunológicas e funcionais (Bhoola et al., 1992). A BK é produzida principalmente no plasma a partir do cininogênio de alto peso molecular, enquanto a KD é predominantemente formada nos tecidos a partir do cininogênio de baixo peso molecular (Calixto et al., 2000; Couture et al., 2001). Embora menos potentes que as calicreínas, as enzimas tripsina, uropepsina e plasmina também podem sintetizar cininas.

A calicreína plasmática é normalmente encontrada no plasma na forma de um precursor inativo chamada pré-calicreína plasmática, complexado ao cininogênio de alto peso molecular e ao fator XI da cascata de coagulação. O precursor é clivado em calicreína pelo fator XII da cascata de coagulação (fator de Hageman), quando este último é convertido em fator XIIa por contato com superfícies carregadas negativamente, o que deflagra a produção de cininas. Já a formação de KD depende da conversão de pré-calicreína tecidual em seu produto ativo, em resposta a proteases liberadas durante lesão tissular (Bhoola et al., 1992; Marceau e Regoli, 2004). Em situações patológicas, as cininas também podem ser produzidas por vias alternativas que envolvem enzimas presentes em células inflamatórias. A formação de BK a partir da ação da elastase de neutrófilos ou da triptase de mastócitos são exemplos de tais vias (Cassim et al., 2002; Campbell, 2003).

A exemplo de outros peptídeos, uma vez formadas as cininas são rapidamente metabolizadas por peptidases presentes nos tecidos e fluidos. As enzimas mais relevantes nesse processo são: a) as cininases I, representadas pela carboxipeptidase N (plasma) e a carboxipeptidase M (membrana), que removem a arginina da porção C-terminal das moléculas da BK e da KD, originando os metabólitos ativos des-Arg⁹-BK (DABK) e a des-Arg¹⁰-KD (DAKD), respectivamente; b) as cininases II, da qual fazem parte a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável por clivar o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo, e a endopeptidase neutra 24.11 (neprilisina ou encefalinase), que cliva o dipeptídeo C-terminal da molécula de bradicinina de maneira semelhante à ECA; c) as cininases A e B, a aminopeptidase P e a prolilcarboxipeptidase, que podem inativar as cininas por hidrólise; e d) a aminopeptidase-N, que converte KD em BK (Blais et al., 2000; Cassim et al., 2002; Fincham et al., 2009). A Figura 3 apresenta uma visão esquemática destes processos.

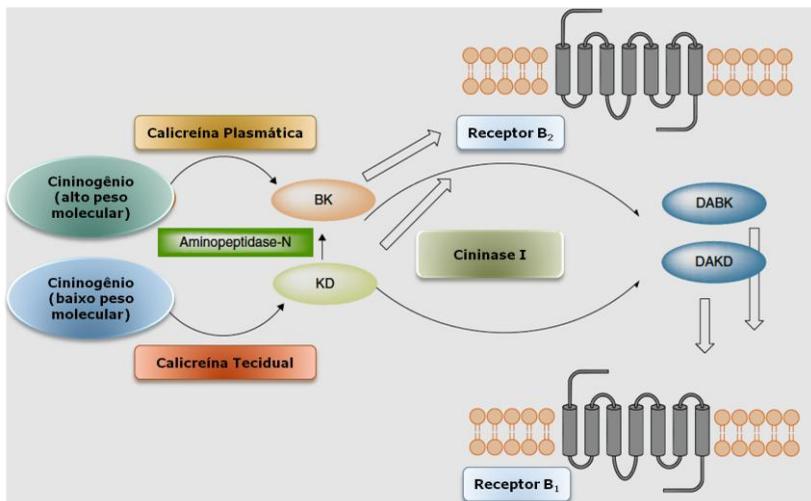


Figura 3. Sistema Cininérgico. BK: bradicinina, KD: calidina, DABK: Des-Arg⁰-BK; DAKD: Des-Arg¹⁰-KD (Adaptado de Fincham et al., 2009).

Os efeitos biológicos das cininas são mediados por receptores específicos acoplados a proteínas G, que ativam preferencialmente a via da fosfolipase C. Estes receptores são classificados de acordo com a relativa potência dos seus agonistas em receptores B₁ e B₂ para cininas, que possuem homologia genética de apenas 36% entre si e cujas expressões e funções são reguladas diferentemente. O receptor B₂ é expresso constitutivamente em diversos tipos celulares, no sistema nervoso central e periférico, no endotélio vascular e em células inflamatórias. Sua atividade é finamente regulada pela sua ligação com os agonistas BK e KD, que têm uma breve meia vida. Já o receptor B₁ é normalmente expresso em níveis muito baixos, mas, em resposta a vários mediadores inflamatórios, pode apresentar-se em quantidades muito mais expressivas em neurônios simpáticos, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas e do endotélio vascular. Os agonistas endógenos do receptor B₁, DABK e DAKD, ativam persistentemente este receptor, uma vez que o mesmo não é prontamente internalizado. Esta característica do receptor B₁ é particularmente importante quando o mesmo apresenta-se super expresso no tecido lesado ou inflamado (para revisão ver Blais et al., 2000; Fincham et al., 2009).

A regulação diferenciada dos receptores de cininas corresponde aos seus diferentes papéis. O receptor B₂ está principalmente envolvido

na dor aguda, reações de inflamação aguda, formação de edema, regulação da função cardiovascular e broncoconstrição, enquanto o receptor B₁ está envolvido na manutenção da dor crônica, vasodilatação, extravasamento plasmático, acúmulo de neutrófilos e liberação de mediadores como IL-6, IL-1 β e TNF- α , que sustentam a resposta positiva entre a expressão do receptor B₁ e a inflamação (Mombouli e Vanhoutte, 1999; Abraham et al., 2006).

Nos últimos quatro anos, foram depositadas aproximadamente 50 novas patentes para antagonistas de receptores de cininas, sendo que a grande maioria destas (> 93%) constitui antagonistas do receptor B₁. Entretanto, até o presente momento, o único fármaco destes que chegou a ser comercializado foi o Icatibante, um decapeptídeo hidrofílico antagonista seletivo para receptores B₂. Resultados obtidos em modelos *in vitro* e *in vivo* suportam eficácias terapêuticas potenciais de antagonistas do receptor B₂ na osteoartrite (Meini e Maggi, 2008), doenças inflamatórias das vias aéreas (Blanners et al., 1998) e nas crises de angioedema hereditário (Bork et al., 2008). Estudos pré-clínicos têm indicado que os antagonistas do receptor B₁ podem ser utilizados para o tratamento da nocicepção associada à lesão tecidual e inflamação (Chen e Biswas, 2008). Dessa forma, a inflamação crônica e a dor neuropática parecem constituir os principais alvos terapêuticos vislumbrados para estas drogas (para revisão ver Fincham et al., 2009).

1.6. Dinorfina A (1-17) como Mediador Hiperálgico

Em 1981, Goldstein e colaboradores identificaram a sequência completa da dinorfina A (1-17), originada da porção N terminal de um precursor contendo 32 aminoácidos (a big-dinorfina), que também origina a dinorfina B da sua porção C terminal, a partir da clivagem de uma ligação Lys-Arg específica. Tanto a dinorfina A quanto a dinorfina B apresentam em sua cadeia peptídica os primeiros cinco aminoácidos que caracterizam a Leu-enkefalina. A caracterização da pró-dinorfina acabou revelando ainda a presença da α - e β -neodinorfina, bem como de seus respectivos fragmentos biologicamente inativos por não apresentarem a porção Leu-enkefalina (para revisão ver Schwarzer, 2009).

As dinorfinas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central e exercem funções variadas, participando na regulação dos sistemas neuroendócrino, termorregulador, locomotor, cardiovascular, respiratório, e de controle sobre comportamento alimentar, reatividade ao estresse, controle emocional e modulação da dor (Fallon e Leslie,

1986; Wee e Koob, 2010). A dinorfina A (1–17) é um dos maiores fragmentos proteolíticos com atividade opióide, que promove seus efeitos em grande parte através da ativação de receptores opióides κ inibitórios localizados em neurônios. *In vivo*, a dinorfina A (1-17) apresenta meia vida biológica curta, pois é convertida rapidamente após a sua liberação em um fragmento des-tirosil desprovido de ações opióides, por ação de aminopeptidases. Em contraste aos demais peptídeos derivados da pró-dinorfina, a dinorfina A (1-17) promove alguns efeitos que envolvem ações excitatórias e excitotóxicas em neurônios e independem de mecanismos sinalizados por receptores opióides (Lai et al., 2008).

As cisteíno-proteases também parecem importantes na degradação da dinorfina, em um processo que origina encefalinas. A clivagem de dinorfina A, por cisteíno-proteases purificadas da medula espinhal de bovinos e humanos, origina Leu⁵-encefalina-Arg⁶ e Leu⁵-encefalina, que, a exemplo de outras encefalinas, são agonistas seletivos de receptores opióides δ (Silberring e Nyberg, 1989; Silberring et al., 1992, 1993). Entretanto e paradoxalmente, a administração do inibidor de cisteíno-proteases ρ -hidroximercuribenzoato (PHMB), em dose que bloqueia a degradação da dinorfina em homogenato de cérebro, potencializou o efeito antinociceptivo da dinorfina A (0,5 nmol, i.c.v.) no teste da formalina em camundongos (Tan-No et al., 2001, 2005). Posteriormente, uma peptidase dependente de tiol que pode degradar especificamente a dinorfina A, mas não outros peptídeos (opióides ou não) foi descrita por Marinova e colaboradores (2004).

A administração sistêmica ou intratecal de dinorfina A produz, ao contrário das encefalinas ou endorfinas, pouca ou nenhuma antinocicepção (Luo et al., 2008). De fato, a administração intratecal da dinorfina A, em baixas doses (≤ 15 nmol), promove comportamentos nociceptivos como morder, lambar e coçar as patas traseiras, bem como hipersensibilidade duradoura à estimulação mecânica (tátil) ou térmica (calor) da região (Vanderah et al., 1996). Doses intratecais mais elevadas de dinorfina A causam paralisia motora associada à manifestação de diversos sinais de neurotoxicidade central, incluindo aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios e reduções nas populações de neurônios sensoriais e motores, bem como de interneurônios espinhais (Faden, 1992; Skilling et al., 1992). Os efeitos pró-nociceptivos e excitotóxicos da dinorfina A não são revertidos por naloxona. Ademais, tais efeitos não são reproduzidos por outros fragmentos da dinorfina como a dinorfina B e a neo-endorfina (Tan-No

et al., 2002; Lai et al., 2008). Este quebra cabeça foi parcialmente resolvido pela demonstração de que o pré-tratamento com MK-801, um antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, bloqueou a hiperalgesia induzida pela administração intratecal de dinorfina A (Vanderah et al., 1996; Laughlin et al., 1997).

Além dos trabalhos descrevendo a participação da dinorfina no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia associada à lesão neuronal, artigos da literatura também sugerem sua participação nas alterações nociceptivas provenientes da administração prolongada de opióides (Tan-no et al., 2005).

Acredita-se que, em condições normais, a dinorfina, presente em interneurônios do corno dorsal da medula espinhal (Botticelli et al., 1981), estimule receptores opióides localizados em fibras aferentes primárias e neurônios do trato espinotalâmico para limitar respostas à estimulação nociva, através de ativação indireta de canais retificadores de potássio acoplados a proteína G (GIRK) e inibição de canais de cálcio sensíveis a voltagem (VSCC) (Lai et al., 2001). Contudo, quando há lesão tecidual ou nervosa, a estimulação nociceptiva persistente induz superexpressão da dinorfina em interneurônios do corno dorsal da medula espinhal, que passam a liberá-la em grande quantidade, promovendo ativação excessiva de proteínas quinase C (PKC) e de VSCC, o que facilita a liberação de neurotransmissores excitatórios pelas fibras aferentes primárias, como SP e CGRP (Figura 4) (para revisão ver Lai et al., 2001).

O sítio de ligação que medeia esses efeitos ainda é desconhecido. Porém, sabe-se que o aumento da neurotransmissão potencializa a atividade dos receptores pós-sinápticos glutamatérgicos ampa/cainato e NMDA por fosforilação do receptor dependente de cálcio/PKC. Isto ocorre em parte, devido à ativação do receptor de SP (NK1R) via fosfolipase C (Lai et al., 2001). Outro alvo para a atuação da dinorfina no receptor NMDA é o sítio de glicina (Zhang et al., 1997). Além disso, a interação dinorfina-NMDA pode ser dependente de pH (Kanemitsu et al., 2003). A translocação da dinorfina através da membrana plasmática para atuar em um alvo efetor intracelular também tem sido sugerida (Marinova et al., 2005).

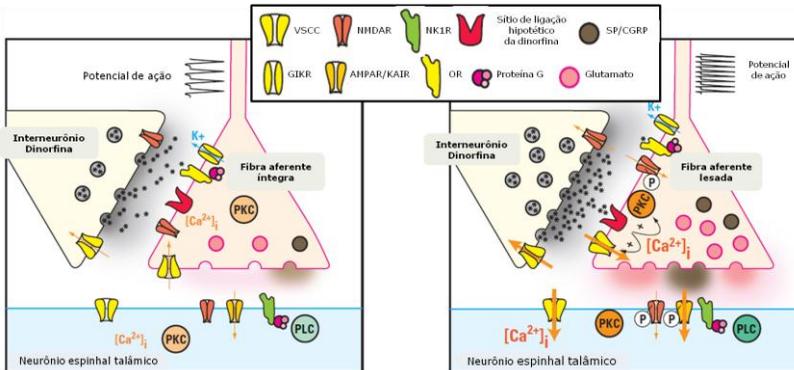


Figura 4. Possíveis mecanismos pelos quais a dinorfina participa na manutenção da dor neuropática. Sob condições normais (painel esquerdo) e após o dano (painel direito). VSCC: canais de cálcio sensíveis a voltagem, GIKR: canais retificadores de potássio acoplados a proteína G, NMDAR: receptores NMDA, AMPAR/KAIR: receptores AMPA/cainato, NK1R: receptor da SP, OR: receptores opióides, PKC: proteína quinase C, SP: substância P, CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, PLC: fosfolipase C (Adaptado de Lai et al., 2001).

O aumento da expressão da dinorfina A na medula espinal pode ser observado em múltiplos modelos experimentais de dor e/ou inflamação crônica, bem como após o tratamento crônico com opióides (Gardell et al., 2005). Em um modelo experimental de dor inflamatória, a hiperalgesia térmica observada 3 dias após a injeção unilateral de CFA na pata traseira de ratos foi bloqueada pela administração intratecal do antissoro anti-dinorfina A, DALBK ou HOE-140 (antagonistas de receptores B₁ e B₂ para cininas, respectivamente), em um momento que coincide com aumento na expressão de dinorfina A no corno dorsal da medula espinal (Luo et al., 2008). Além disso, este efeito hiperalgésico da injeção intratecal de dinorfina A está ausente em camundongos com deleção gênica para receptores B₂, e o HOE-140 também bloqueia a hiperalgesia induzida pela administração intratecal de dinorfina A (2-13) (Lai et al., 2001; Lai et al., 2006; Lai et al., 2008). Tais achados sugerem que receptores cininérgicos espinais medeiam às ações pró-nociceptivas espinais da dinorfina A. A lesão de nervos periféricos também é acompanhada do aumento nos níveis espinais de dinorfina e de outros neuropeptídeos (Dubner, 1991). No caso da dinorfina A, o aumento dos níveis no curso espinal dorsal manifesta-se 5 dias após a ligação do nervo ciático, atingindo valores máximos em 10 dias e mantendo os níveis elevados por semanas, período que coincide com o das alterações sensoriais causadas pela lesão (Kajander et al., 1990). Os

níveis de RNA mensageiro (RNAm) para a pré-pró-dinorfina também aumentam neste período (Draisci et al., 1991). Entretanto, a completa transecção ou esmagamento do nervo ciático induzem apenas pequenas mudanças nos níveis do RNAm para a pré-pró-dinorfina (Draisci et al., 1991), sugerindo que os disparos sustentados dos neurônios aferentes são importantes para a iniciação da super expressão da dinorfina espinhal (Lai et al, 2001).

Dessa forma, embora exista a noção geral de que concentrações elevadas de dinorfina atuem (de acordo com a classificação de opióides endógenos) inibindo a nocicepção crônica após uma lesão neuronal (Kajander et al., 1990; Draisci et al., 1991), consideráveis evidências apontam que, nestas condições, a dinorfina atua como mediador espinhal pró-nociceptivo. Neste sentido, a administração intratecal do antissor anti-dinorfina bloqueia o aumento da sensibilidade mecânica e térmica induzido por ligação de nervos espinhais, sem alterar o limiar de resposta de animais falso operados (Wagner e Deleo, 1996; Nichols et al., 1997; Malan et al., 2000; Wang et al., 2001). Tais dados corroboram a hipótese de que a super expressão da dinorfina é pró-nociceptiva e importante para a manutenção da dor neuropática experimental (Lai et al., 2001).

1.7. Diferenças entre Neuralgia do Trigêmeo e demais Neuropatias periféricas

A relativa resistência do sistema trigeminal ao desenvolvimento de neuropatia é uma observação clínica interessante que instiga pesquisas pré-clínicas comparando as aferências dos sistemas trigeminal e espinhais e suas susceptibilidades a desordens neuropáticas. O sistema trigeminal parece ser programado para a perda temporária de estruturas por ela inervadas, durante o período pós-natal e relacionada à troca de 20 dentes decíduos, com discretos e passageiros períodos de dor neuropática (Hargreaves, 2011).

As características moleculares e neuroquímicas do gânglio do trigêmeo são muito similares, mas não idênticas, àquelas dos gânglios de raízes dorsais. Estas estruturas possuem diferenças na origem de suas células durante o desenvolvimento embrionário: as do gânglio do trigêmeo derivam da crista neural cefálica, de uma região especializada do ectoderma (placode trigeminal, Baker e Bronner-Fraser, 2001), enquanto os de gânglios de raízes dorsais originam-se da crista da medula espinhal (Thun et al., 2009). Porém, existem muitos aspectos comuns nos mecanismos de transdução e processamento da informação

nociceptiva entre o sistema trigeminal e espinhal e são numerosos os exemplos de fatores únicos nos componentes periféricos e centrais do sistema trigeminal, como a regulação da transcrição de canais de sódio após lesão neural (Hargreaves, 2011; Bongniel et al., 2000).

De modo geral, os mecanismos que contribuem para o surgimento das alterações sensoriais neuropáticas ainda são pouco entendidos e provêm, principalmente, de estudos que empregaram modelos de dor por lesão de nervos espinhais (Woolf et al., 1995; Lekan et al., 1996). Além disso, devido às evidências de que a lesão de nervos espinhais ou trigeminais resulta em alterações anatômicas e funcionais distintas, faz-se necessário avaliar se a dor neuropática que se desenvolve nestes dois modelos compartilha dos mesmos mecanismos. Dentre as diferenças que já foram demonstradas estão o “brotamento” de fibras nervosas simpáticas ao redor dos gânglios sensoriais correspondentes, que parece ocorrer somente após lesão de nervos espinhais, bem como na intensidade da atividade neuronal espontânea, significativamente menor em ramos do trigêmeo lesado (Benoliel et al., 2001; Grelik et al., 2005).

Dessa maneira, pesquisas pré-clínicas e clínicas que avaliem a dor orofacial aguda e crônica resultante da lesão de ramos do nervo trigêmeo podem contribuir para aprofundar a compreensão das diferenças existentes em relação aos nervos aferentes dos segmentos espinhais, bem como ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes de tratamento de pacientes com dor orofacial (Fried et al., 2001; Robinson et al., 2004).

Diversos trabalhos da literatura descrevem a participação dos receptores B_1 e B_2 para cininas em diferentes modelos de dor neuropática, o envolvimento da dinorfina A na indução de hiperalgesia mecânica em ratos, e a interação entre os níveis elevados de dinorfina A e a ativação de receptores para cininas no modelo de ligação dos nervos espinhais. Diante disso, nosso projeto além de padronizar o modelo de construção do nervo infraorbital em camundongos com a finalidade de utilizar diferentes linhagens e animais nocautes, tem por finalidade investigar a possível participação dos receptores B_1 e B_2 para cininas na neuralgia do trigêmeo, a influência da dinorfina A exógena sobre a hiperalgesia orofacial e uma possível interação entre os receptores de cininas e dinorfina A nas alterações de sensibilidade nociceptivas orofaciais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar, através de modelos comportamentais e por técnicas farmacológicas, o possível envolvimento dos receptores cininérgicos B_1 e B_2 nas alterações da sensibilidade nociceptiva orofacial induzidas pela constrição do nervo infraorbital (CNIO) em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos traçados para o estudo foram:

- Padronizar o modelo de neuropatia orofacial induzida pela CNIO em camundongos, mediante investigação do decurso temporal do desenvolvimento de alteração sensorial nociceptiva à estimulação mecânica e térmica na região orofacial;
- Avaliar a influência do tratamento com fármacos comumente utilizados na clínica para neuralgia do trigêmeo nas alterações sensoriais produzidas pela CNIO;
- Comparar as influências do tratamento prévio (no momento da cirurgia) ou *a posteriori* com diferentes doses dos antagonistas dos receptores B_1 e B_2 para cininas sobre o decurso temporal do desenvolvimento das alterações sensoriais promovidas pela CION.
- Analisar a influência da expressão de receptores B_1 , receptores B_2 , ou ambos os receptores, no desenvolvimento das alterações sensoriais promovidas pela CION, através do emprego de camundongos com deleção gênica para estas proteínas.
- Verificar a influência do peptídeo endógeno dinorfina A no desenvolvimento e manutenção das alterações sensoriais nociceptivas induzidas pela CNIO, bem como a possível mediação dos seus efeitos por mecanismos operados por receptores B_1 e B_2 para cininas, através do emprego de antagonistas destes receptores.

3. MATERIAIS

3.1. Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando camundongos *Mus musculus* machos da linhagem Swiss, pesando entre 25-35 g e provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ou fêmeas da linhagem C57Bl/6 (do tipo selvagem e nocautes para os receptores B₁ e/ou B₂ para cininas), pesando entre 20-30 g e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. João Batista Calixto, do Departamento de Farmacologia da UFSC. Os animais foram 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 setorial para o biotério laboratorial e alojados em caixas coletivas contendo 20 camundongos cada, no máximo. Os experimentos foram realizados sempre durante a fase clara do ciclo em sala silenciosa e com temperatura ambiente controlada. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Processo número 23080.009342/2008-11).

3.2. Reagentes, Drogas e Soluções

Foram empregados os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- Acetato de Icatibante (HOE-140, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Antissoro Anti-dinorfina A (1-13) (Bachem/Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA);
- Carbamazepina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil);
- Cloridrato de morfina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de naloxona (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec do Brasil Ltda., SP, Brasil);
- des-Arg⁹-(Leu⁸)-bradicinina (DALBK, American Peptide Company, Sunnyvale, CA, USA);

- Dihidrocloridrato de nor-Binaltorfimina (nor-BNI, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Dinorfina A (1-17) (Anaspec, Fremont, CA, USA);
- Gabapentina (Neurontin®, Pfizer, SP, Brasil);
- Indometacina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Maleato de dizocilpina (MK-801, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Oxitetraciclina dihidratada (Terramicina®, Laboratórios Pfizer Ltda., SP, Brasil);
- Solução salina tamponada com fosfato (0,01 M de tampão fosfato, 0,0027 M de cloreto de potássio e 0,137 M de cloreto de sódio, pH 7.4, a 25° C, *phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Solução estéril de NaCl 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO);

4. MÉTODOS

4.1. Constrição do Nervo Infraorbital

A constrição do nervo infraorbital foi realizada conforme o método utilizado por Chichorro e colaboradores (2006a, padronizada por modificações da técnica primeiramente descrita por Vos et al. (1994)). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.). Após o estabelecimento da anestesia e realização de assepsia da face com álcool iodado, foi feita uma incisão na pele abaixo do olho direito situada cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados, para que fosse exposta a porção rostral do nervo infraorbital, próxima à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado cuidadosamente dos tecidos adjacentes para permitir a colocação de duas amarras frouxas em seu entorno, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constricto. 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.

4.2. Testes Comportamentais

4.2.1. Estimulação mecânica

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram primeiro habituados por pelos menos 2 horas nas caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma sessão de seleção prévia dos animais baseada em suas respostas à repetitiva aplicação por 10 vezes com o filamento de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA) de 0,04 g no centro da região superior da cabeça do animal (local que possibilita avaliar uma região inervada pelo trigêmeo sem a necessidade de contenção do animal) e 0,6 g no centro da superfície da pata direita traseira do animal. Foi estabelecido um intervalo de no mínimo 30 s entre cada aplicação. Considerou-se como resposta positiva dos animais à estimulação mecânica o comportamento de retirada rápida (ataque/escape) da cabeça e reações de retirada da pata estimulada. O somatório do número de reações de ataque/escape ou retirada da cabeça/pata após 10 aplicações do filamento foi considerado como

indicativo da intensidade da nocicepção mecânica. Apenas animais que apresentaram resposta nociceptiva entre 0 e 3 aplicações na sessão de seleção prévia foram incluídos nos experimentos subseqüentes.

Para análise do decurso temporal da alteração nociceptiva mecânica, os animais foram estimulados em diferentes períodos após a cirurgia. Em outro bloco de experimentos, no 5º e 36º dia após a cirurgia, o limiar de resposta ao estímulo mecânico foi novamente determinado (basal pós-cirurgia – tempo 0). Em seguida, estes animais receberam um dos diferentes tratamentos (ver abaixo) e foram avaliados repetidamente em intervalos de 1 hora até o máximo de 4 horas.

4.2.2. Estimulação térmica por calor

A ambientação do animal ocorreu na própria caixa de manutenção, a qual foi colocada no mínimo uma hora antes do teste na sala de experimentação. Neste teste, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante (~50º) 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 alteração sensorial nociceptiva térmica ao calor, a estimulação foi realizada em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e em diferentes períodos após a cirurgia. Em outro bloco de experimentos, no 5º e 17º dia após a cirurgia, o limiar de resposta à estimulação térmica por calor foi novamente determinado (basal pós-cirurgia – tempo 0) apenas no lado ipsilateral. Em seguida, estes animais receberam um dos diferentes tratamentos (ver abaixo) e foram avaliados repetidamente em intervalos de 30 min até o máximo de 4 horas. No experimento em que os animais receberam o tratamento local, as avaliações foram realizadas nos mesmos intervalos de tempo que as avaliações do decurso temporal.

4.2.3. Estimulação térmica por frio

Para a realização deste teste, os animais foram previamente habituados às caixas de observação por aproximadamente 1 hora. Em seguida, foi aplicado um spray de tetrafluoretano, por cerca de 1 s, direcionado à região inervada pelo nervo infraorbital (sobre a área de inserção das vibrissas). O tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante os primeiros

2 minutos que se seguiram à aplicação do estímulo frio foi registrado. Foram inclusos nos experimentos apenas animais que apresentaram, antes da realização da constrição, tempos basais de limpeza facial de ≤ 15 s.

Para avaliação do decurso temporal da alteração sensorial nociceptiva térmica ao frio a estimulação foi realizada, em ambos os lados da face, antes da cirurgia (basal pré-cirurgia) e em diferentes períodos após a cirurgia. Adicionalmente, em um grupo separado de animais, foi posicionado um termômetro de contato sobre a superfície da pele facial, de modo a mensurar a temperatura da face antes e imediatamente após a aplicação do spray. Em outro bloco de experimentos, no 5º e 25º dia após a cirurgia, o limiar de resposta à estimulação térmica por frio foi novamente determinado (basal pós-cirurgia – tempo 0) apenas no lado ipsilateral. Em seguida, estes animais receberam um dos diferentes tratamentos (ver abaixo) e foram avaliados repetidamente em intervalos de 30 min até o máximo de 4 horas. No experimento em que os animais receberam o tratamento local, as avaliações foram realizadas nos mesmos intervalos de tempo das avaliações do decurso temporal.

4.2.4. Resposta hiperalgésica induzida por dinorfina A (1-17)

Com a finalidade de observar o desenvolvimento de alteração sensorial nociceptiva orofacial induzida pela dinorfina A (1-17), a mesma foi administrada pela via subaracnóide (entre a vértebra C1 e o osso occipital) na dose de 15 nmol/sítio (5 μ L, Vanderah et al., 1996) conforme metodologia descrita previamente para ratos por Fischer e colaboradores (2005). A via subaracnóide também foi utilizada para efetuar o tratamento prévio ou diário com diferentes drogas.

Os experimentos comportamentais nos quais foi avaliada a influência dos tratamentos centrais (ver abaixo) sobre a hiperalgesia induzida pela dinorfina A (1-17), foram realizados conforme metodologia descrita anteriormente para observação das respostas nociceptivas frente a estímulos térmicos (calor e frio) e mecânico. As avaliações foram realizadas previamente a administração das drogas (resposta basal - Pre), após - nos períodos de 1, 4 e 6 horas - e diariamente (1 avaliação) a partir das 24 horas por um período máximo de 10 dias. Para avaliação dos tratamentos sistêmicos (ver abaixo) os experimentos foram realizados no 3º dia após a administração da dinorfina A (1-17).

4.3. Tratamentos

Tanto para a avaliação do decurso temporal quanto para a avaliação dos tratamentos investigados, diferentes grupos de animais foram utilizados para cada estímulo aplicado – mecânico, térmico por calor e térmico por frio – com a finalidade de evitar uma possível sensibilização prévia do animal.

Após a constrição do nervo infraorbital os animais receberam, em grupos distintos, os tratamentos listados abaixo pela via sistêmica tanto na fase inicial (5º dia) quanto na fase final (17º dia - calor; 25º dia - frio; 36º dia - mecânico) da resposta hiperalgésica:

- Carbamazepina (antiepilético) - 10 e 30 mg/kg, via intraperitoneal (i.p., Sahebgharani et al., 2006);
- Gabapentina (antiepilético) - 30 mg/kg, i.p. (Christense et al., 2001);
- Morfina (agonista opióide) - 2,5 mg/kg, via subcutânea (s.c.) (Chichorro et al., 2009);
- Indometacina (anti-inflamatório não esteroide) - 4 mg/kg, i.p. (Chichorro et al., 2009);
- DALBK (antagonista do receptor B₁) - 0,01 - 3 µmol/kg, i.p. (Werner et al., 2007);
- HOE-140 (antagonista do receptor B₂) - 0,01 - 1 µmol/kg, i.p. (Werner et al., 2007).

O tratamento local com os antagonistas DALBK e HOE-140 foi realizado pela instilação de uma solução contendo 3 nmol das drogas ou com o veículo em um volume de 10 µL sobre o nervo infraorbital no momento da cirurgia, logo após a constrição (Quintão et al., 2008).

Nos experimentos de hiperalgesia orofacial induzida pela dinorfina A (1-17) foram administrados a diferentes grupos os seguintes tratamentos:

- Sistêmico - no 3º dia após a administração da dinorfina A (1-17):
DALBK - 0,1 - 3 µmol/kg, i.p. (Werner et al., 2007);
HOE-140 - 0,1 - 1 µmol/kg, i.p. (Werner et al., 2007);
Naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides) - 10 mg/kg, i.p. (Chen et al., 2010);
nor-BNI (antagonista seletivo do receptor κ opióide) - 10 mg/kg, s.c. (Koyama e Fukuda, 2010);

- MK-801 (antagonista do receptor glutamatérgico NMDA) - 25 e 100 nmol/kg, i.p (Mao et al., 1992).
- Central - pela via subaracnóide, em volume de 5 μ L, 15 min antes da administração da dinorfina A (1-17):
DALBK - 25 e 50 nmol/sítio (Ferreira et al., 2002; Lai et al., 2006);
HOE-140 - 10 e 100 pmol/sítio (Ferreira et al., 2002; Lai et al., 2006);
Naloxona - 28 nmol/sítio (Vanderah et al., 1996);
nor-BNI - 87 nmol/sítio (Lawson et al., 2010);
MK-801 - 10 nmol/sítio (Vanderah et al., 1996);
Antissoro anti-dinorfina A (1-13) - 200 μ g/sítio (Gardell et al., 2004).

4.4. Análise Estatística

Os resultados do presente estudo são apresentados como média \pm erro padrão da média de grupos de 5 a 10 animais. Em todos os experimentos foram utilizados para a análise estatística os valores brutos (número de respostas e tempo de latência ou *grooming*) obtidos durante o período de avaliação. Os dados obtidos foram analisados com ANOVA de uma via (para avaliação dos tratamentos) e duas vias (para avaliação do decurso temporal) para medidas repetidas seguida de teste “post-hoc” de “Bonferroni” utilizando o programa estatístico GrafPad Prism 4[®]. Em todas as análises, diferenças com valores de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do Decurso Temporal

5.1.1. Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação mecânica

A CION induziu aumento persistente da reatividade dos animais à estimulação mecânica da região superior da cabeça. A hiperalgesia mecânica, avaliada através do número de respostas à aplicação repetida do filamento de von Frey (0,04 g) em relação ao valor correspondente registrado no grupo falso-operado, mostrou-se significativa a partir do 5º dia após a cirurgia, atingiu uma intensidade máxima por volta do 19º dia e persistiu por até 36 dias (Fig. 5A). Contudo, conforme ilustrado na figura 5B, a cirurgia de CION não alterou a reatividade dos animais à aplicação de estímulos mecânicos (filamento de von Frey 0,6 g) à superfície plantar da pata traseira em quaisquer dos períodos examinados, indicando que a cirurgia não acarreta hiperalgesia mecânica generalizada.

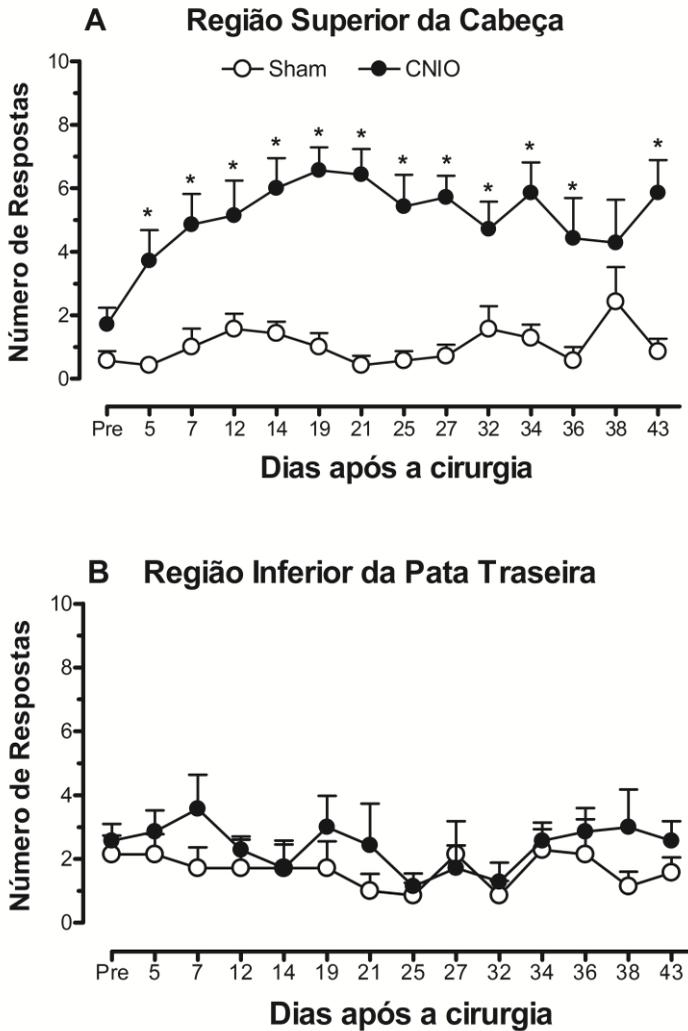


Figura 5. Avaliação da estimulação mecânica em camundongos Swiss submetidos à CNIO. Decurso temporal da reatividade comportamental à estimulação mecânica avaliada na região inervada pelo nervo trigêmeo (A) e na porção inferior da pata traseira direita (B). As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam o número de respostas (frente a 10 estímulos) como comportamento de ataque/escape da cabeça ou comportamentos de retirada pata (n= 8 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação mecânica do grupo sham (ANOVA de 2 vias para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.1.2. *Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor*

Quando o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor foi avaliado em ambos os lados da face de camundongos Swiss submetidos ou não a cirurgia de CION, observou-se que o grupo constricto desenvolveu hiperalgesia restrita ao lado ipsilateral da face. Esta alteração sensorial manifestou-se de maneira significativa já a partir do 2º dia após a cirurgia e manteve-se aproximadamente neste mesmo patamar de intensidade até o 17º dia, a partir do qual a latência de resposta retornou aos mesmos níveis verificados no grupo falso-operado (Fig. 6 A e B).

5.1.3. *Decurso temporal das variações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio*

Os camundongos Swiss submetidos à cirurgia de CION manifestaram hiperalgesia bilateral à aplicação do spray de tetrafluoretano na região orofacial. A aplicação deste estímulo à face dos animais causou redução imediata da temperatura da superfície cutânea de $31,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ para $12,7 \pm 1,3^\circ\text{C}$ ($n = 8$). A hiperalgesia desenvolvida em ambos os lados da face foi semelhante em intensidade, com máximas logo a partir do 5º dia de cirurgia, porém a duração do fenômeno pareceu ser maior do lado ipsilateral do que no contralateral. No lado ipsilateral, o aumento no tempo de *grooming* facial persistiu em níveis significantes até o 25º dia após a cirurgia, pelo menos (Fig. 7A). Contralateralmente, a hiperalgesia perdurou apenas até o 21º dia após a cirurgia (Fig. 7B).

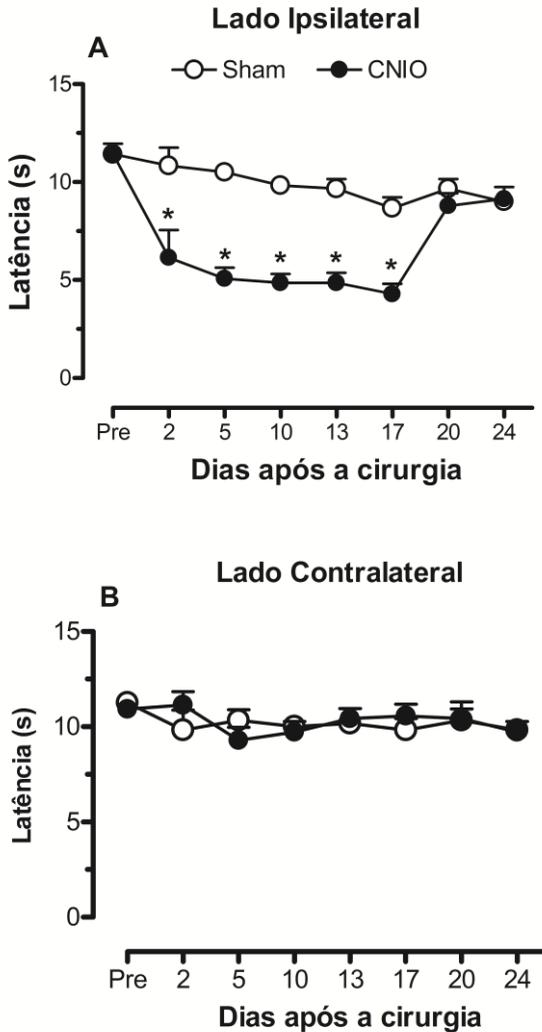


Figura 6. Avaliação da estimulação térmica por calor em camundongos Swiss submetidos à CNIO. Decurso temporal da resposta hiperalgésica avaliada no lado ipsilateral (A) e contralateral (B) à cirurgia. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas ($n= 6$ a 7 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação ipsilateral do grupo sham (ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

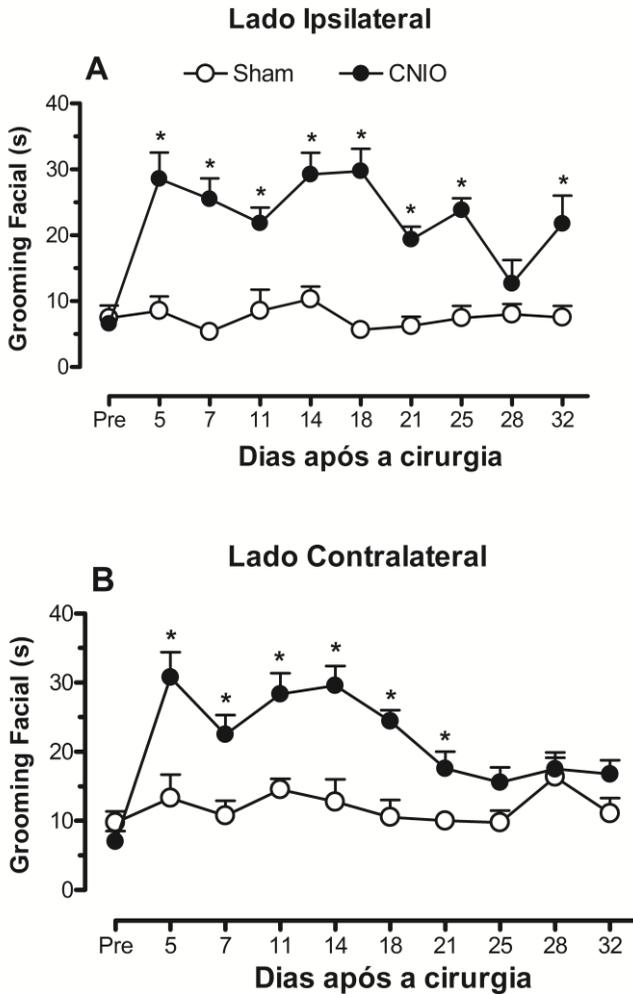


Figura 7. Avaliação da estimulação térmica por frio em camundongos Swiss submetidos à CNIO. Decurso temporal da resposta hiperalgésica avaliada no lado ipsilateral (A) e contralateral (B) à cirurgia. As respostas dos animais à estimulação térmica por frio foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante 2 minutos (n= 9 a 12 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação do grupo sham (ANOVA de 2 vias para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2. *Influência dos Tratamentos*

5.2.1. *Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva mecânica induzidas pela CNIO*

Com a finalidade de melhor caracterizar a adequação do modelo padronizado ao estudo dos mecanismos implicados na neuralgia do trigêmeo e de novas terapias potenciais, foram testados os efeitos de fármacos indicados para tratamento clínico desta condição em dois momentos, nas fases inicial e final da resposta hiperalgésica a cada tipo de estímulo nociceptivo. Os fármacos testados incluíam: carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p.), que é o fármaco de primeira escolha para tratar a neuralgia do trigêmeo; os fármacos úteis no tratamento de outras formas de dor neuropática gabapentina (30 mg/kg, i.p.) e morfina (2,5 mg/kg, s.c.); bem como o anti-inflamatório não-esteroidal indometacina (4 mg/kg, i.p.).

Na fase inicial da hiperalgesia mecânica (5º dia), entre as drogas testadas, apenas a gabapentina não foi efetiva em reduzir de maneira significativa o número de respostas de camundongos Swiss submetidos à CNIO à estimulação mecânica (Figura 8). Porém, quando os mesmos tratamentos foram realizados no 36º dia após a CNIO, observou-se que apenas a maior dose de carbamazepina (30 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica em 1 e 2 horas após o tratamento, com inibição máxima de $55 \pm 16 \%$, 2 h após o tratamento (Figura 9).

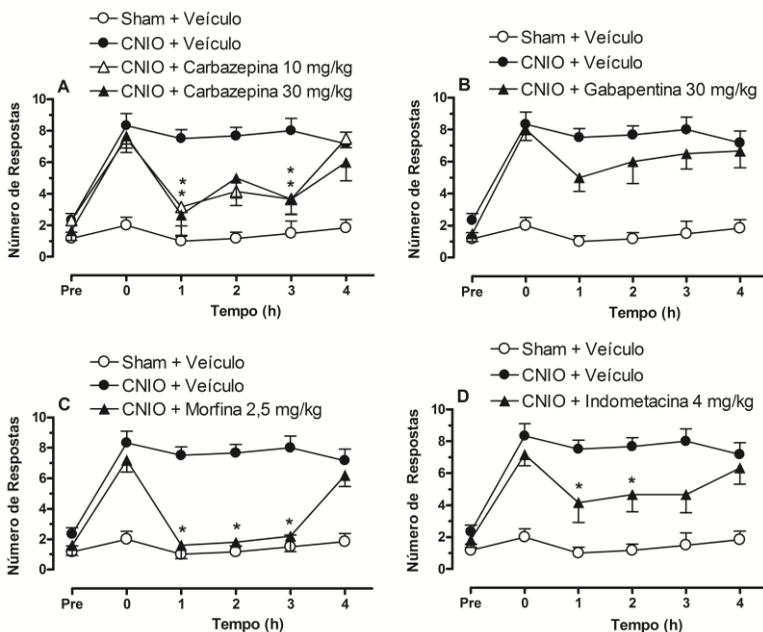


Figura 8. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 5º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), imediatamente antes (0) da administração dos fármacos e 1 h após em intervalos do mesmo valor por um máximo de 4 h. Os valores representam o número de respostas (frente a 10 estímulos) como comportamento de ataque/escape da cabeça (n= 6 camundongos por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

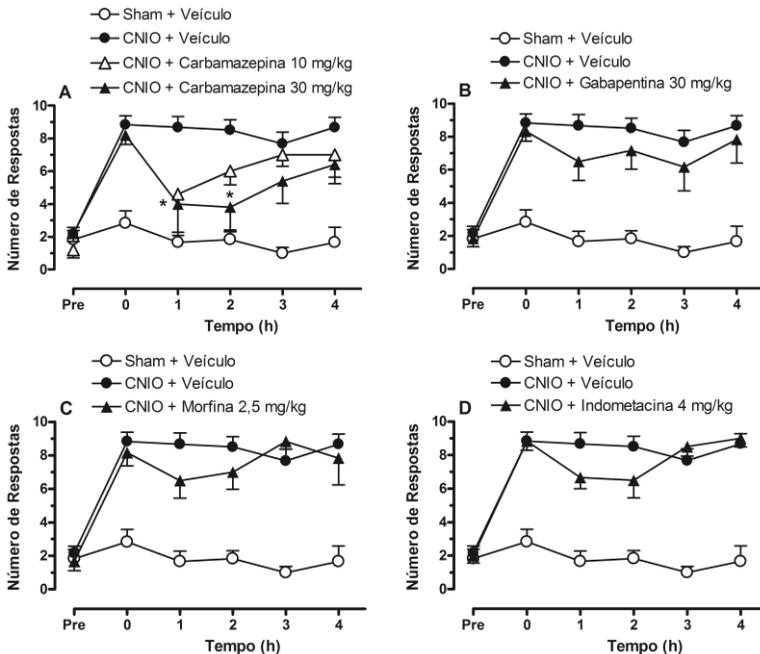


Figura 9. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 36º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), imediatamente antes (0) da administração dos fármacos e 1 h após em intervalos do mesmo valor por um máximo de 4 h. Os valores representam o número de respostas (frente a 10 estímulos) como comportamento de ataque/escape da cabeça (n= 6 camundongos por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.2. Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor induzidas pela CNIO

Administrados no 5º dia após a CNIO, a carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p.), a gabapentina (30 mg/kg, i.p.), a morfina (2,5 mg/kg, s.c.) e a indometacina (4 mg/kg, i.p.) foram todos capazes de reduzir de maneira significativa a hiperalgesia térmica ao calor presente no lado ipsilateral à constrição (Figura 10). Parece pertinente ressaltar que a maior dose de carbamazepina foi o tratamento que causou o efeito anti-hiperalgésico mais duradouro, que se estendeu até 3 h após sua administração (Figura 10A).

Já quando os mesmos tratamentos foram realizados no 17º dia após a CNIO, verificou-se que a indometacina havia perdido seu efeito anti-hiperalgésico (Figura 11D), enquanto o da gabapentina, que no 5º dia chegou a durar por até 2,5 h (Figura 10B), perdurou por apenas 30 min após sua administração (Figura 11B). Já a maior dose de carbamazepina (30 mg/kg) mantém a mesma magnitude de atividade anti-hiperalgésica, apesar de a mesma ser abreviada em 50% na sua duração (de 3 h no 5º dia para 1,5 h no 17º dia), enquanto a menor dose de carbamazepina (10 mg/kg) mostrou-se desprovida de efeito anti-hiperalgésico (Figura 11A). Por outro lado, neste momento mais tardio, a morfina mantém o mesmo perfil anti-hiperalgésico que apresenta no período inicial (Figura 11C).

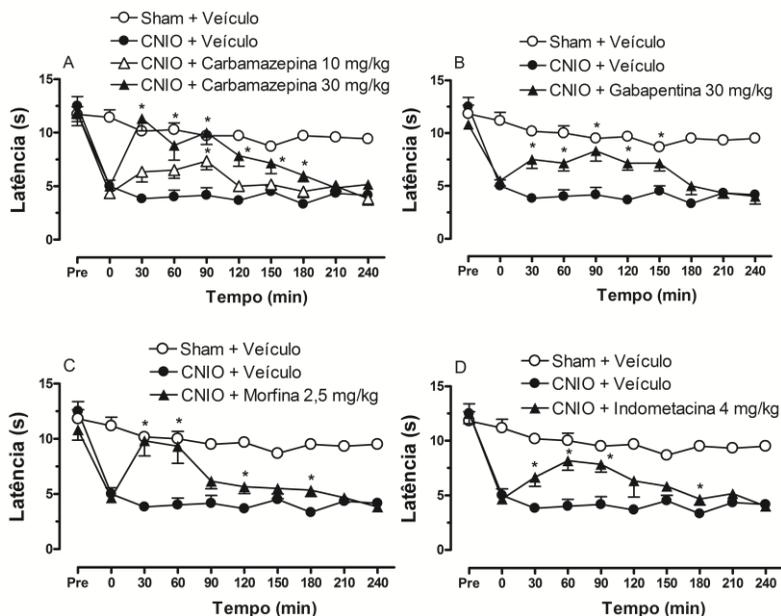


Figura 10. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor no 5º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), antes (0) e em intervalos de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação ipsilateral do grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

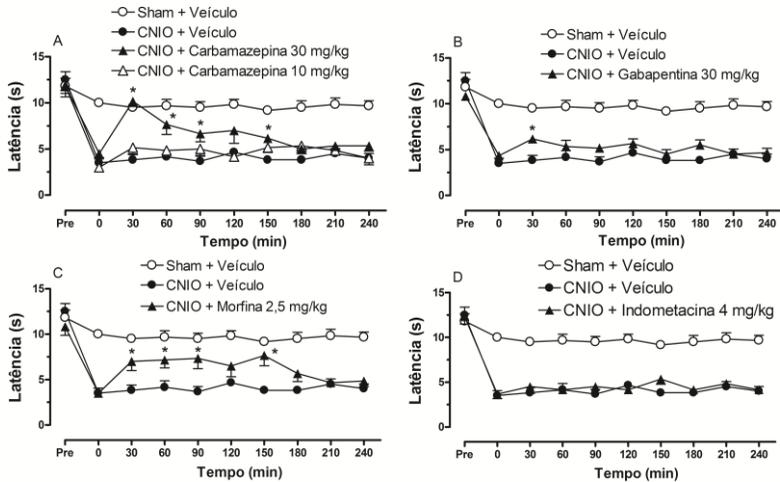


Figura 11. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor no 17º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), antes (0) e em intervalos de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação ipsilateral do grupo construído que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.3. Efeito do tratamento sistêmico com carbamazepina, gabapentina, morfina e indometacina sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio induzidas pela CNIO

Diferentemente do que foi visto com relação à fase inicial da hiperalgesia mecânica, a resposta hiperalgésica de camundongos ao frio, no 5º dia após a CNIO, foi reduzida de maneira estatisticamente significativa por todos os quatro tratamentos, inclusive aquele com gabapentina (Figura 12). Outro aspecto que diferencia a hiperalgesia ao frio, daquela que se desenvolve ao calor e ao estímulo mecânico, é que a fase tardia da alteração sensorial (25º dia após a cirurgia) mostrou-se suscetível à redução por cada um dos 4 tratamentos. Notadamente, no 25º dia após a CNIO, ambas as doses de carbamazepina (Figura 13A) tiveram a duração dos seus efeitos anti-hiperalgésicos ampliados (de 1 h no 5º dia para 1,5 h no 25º dia na dose de 10 mg/kg; de 1 h no 5º dia

para 3,5 h no 25º dia na dose de 30 mg/kg). Tanto a gabapentina (30 mg/kg), quanto a morfina (2,5 mg/kg) mantiveram os mesmos perfis de efeito anti-hiperalgésico que haviam apresentado no 5º dia após a CNIO (Figuras 13B e 13C). Já a indometacina (4 mg/kg) apresentou redução na duração do seu efeito anti-hiperalgésico, de 1,5 h no 5º dia para apenas 30 min no 25º dia (Figura 13D).

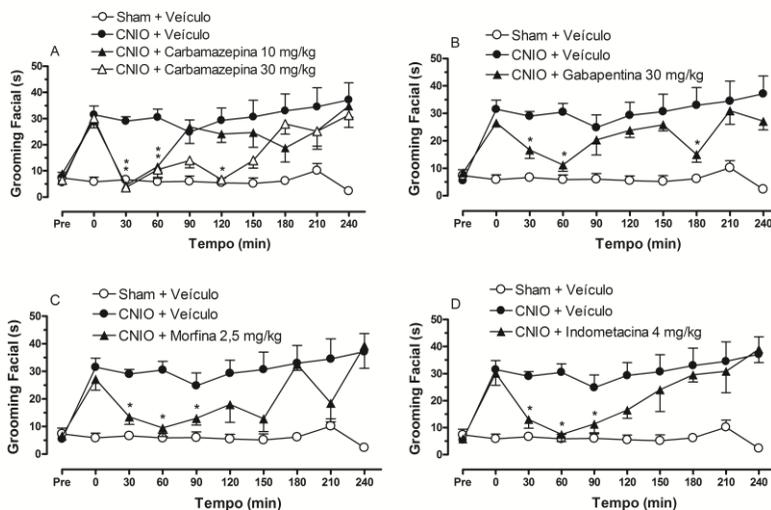


Figura 12. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio no 5º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação térmica por frio foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), antes (0) e em intervalos de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante 2 minutos (n= 6 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação aos dados da estimulação do grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

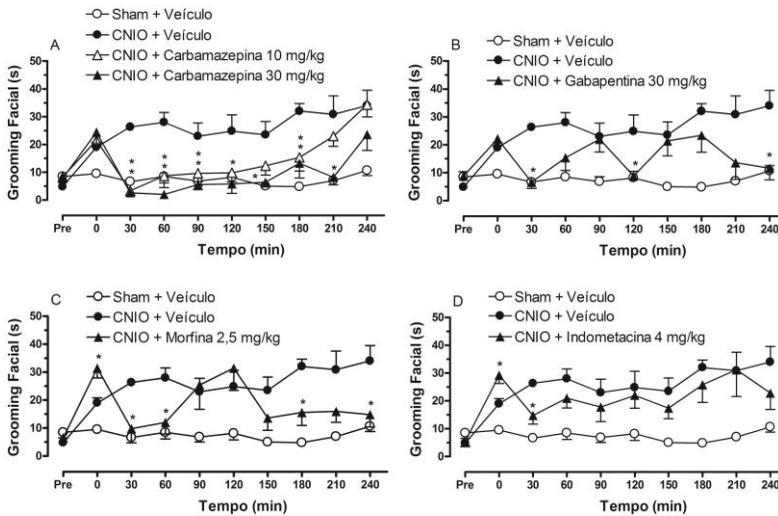


Figura 13. Efeito do tratamento com carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p., A), gabapentina (30 mg/kg, i.p., B), morfina (2,5 mg/kg, s.c., C) e indometacina (4 mg/kg, i.p., D) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio no 25º dia após a CNIO em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação térmica por frio foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), antes (0), antes de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante 2 minutos (n= 5 a 6 animais por grupo). Asteriscos denotam p<0,05 em relação aos dados da estimulação do grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.4. Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B_1 e B_2 para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação mecânica induzidas pela CNIO

Quando administrados no 5º dia após a cirurgia, tanto DALBK (antagonista dos receptores B_1 , 0,01-1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) quanto HOE-140 (antagonista dos receptores B_2 , 0,01-1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) foram capazes de reduzir significativamente, porém, de maneira transitória a hiperalgesia mecânica causada pela CNIO (Fig. 14A e B). As doses de 0,1 e 1 $\mu\text{mol/kg}$ de DALBK causaram reduções significativas do número de respostas à estimulação mecânica 1 e 2 h após sua administração, com inibições máximas de $64 \pm 18\%$ para a dose de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ (2 h) e de $57 \pm 13\%$ para a dose de 1 $\mu\text{mol/kg}$ (1 h). A menor dose de DALBK testada (0,01 $\mu\text{mol/kg}$) acarretou apenas uma inibição significativa pontual de $51 \pm 11\%$ na terceira hora após o tratamento (Fig. 14A). Já o tratamento com HOE-140, nas doses de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ e 1 $\mu\text{mol/kg}$,

reduziu significativamente a sensibilização mecânica 2 e 3 h após sua administração, induzindo inibições máximas de $55 \pm 12\%$ e $47 \pm 13\%$ (na 2^a h), respectivamente (Fig. 14B).

No 36^o dia após a CNIO, já na fase tardia da hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO, o tratamento com o antagonista DALBK, nas doses de 0,1 e 1 $\mu\text{mol/kg}$ (i.p.), reduziu de maneira significativa a alteração sensorial mecânica apenas no tempo de 1^a h após sua administração, em $34 \pm 15\%$ e $31 \pm 17\%$, respectivamente. Já o tratamento com HOE-140 nas mesmas doses não apresentou qualquer efeito anti-hiperalgésico significativo (Fig. 14C e D).

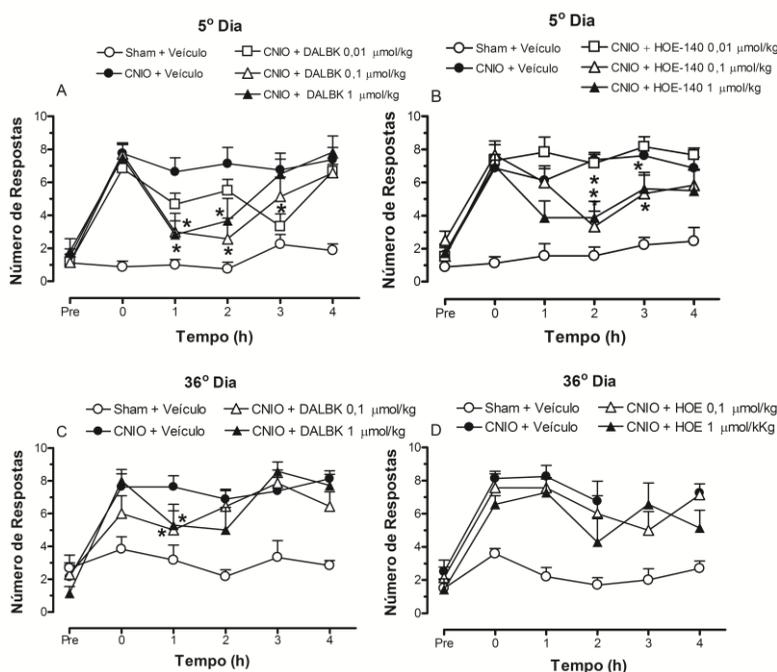


Figura 14. Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B_1 e B_2 sobre a reatividade nociceptiva à estimulação mecânica no 5^o e 36^o dia após a CNIO em camundongos Swiss. Efeito do tratamento com DALBK (antagonista seletivo para receptor B_1 , 0,01-1 $\mu\text{mol/kg}$, A e C) e HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B_2 , 0,01-1 $\mu\text{mol/kg}$, B e D) na hiperalgesia mecânica no 5^o (A e B) e 36^o (C e D) dia após a CNIO. As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), imediatamente antes (0) da administração dos antagonistas e 1 h após em intervalos do mesmo valor por um máximo de 4 h. Os valores representam o número de respostas (frente a 10 estímulos) como comportamento de ataque/escape da cabeça ($n = 6$ a 8 camundongos por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constrito que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.5. Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B₁ e B₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor induzida pela CNIO

O tratamento sistêmico dos animais com DALBK (0,1 ou 1 µmol/kg, i.p.) ou HOE-140 (0,01, 0,1 ou 1 µmol/kg, i.p.) no 5º dia após a CNIO também reduziu de maneira transitória, porém significativa, a hiperalgésia térmica ao calor (Fig. 15A e B). Os efeitos anti-hiperalgésicos da dose mais alta de DALBK e HOE-140 apresentaram-se mais duradouros que os associados às doses mais baixas. O efeito anti-hiperalgésico de DALBK na dose de 1 µmol/kg foi observado 30, 60 e 180 min após sua administração, com pico de efeito no tempo de 60 min, quando a inibição atingiu $78 \pm 25\%$ (Fig. 15A). A ação anti-hiperalgésica do HOE-140 na dose de 1 µmol/kg foi evidente no intervalo de 90 a 180 min após sua administração. Porém, o maior efeito deste antagonista foi observado 120 min após sua administração na dose de 0,1 µmol/kg, quando promoveu inibição de $144 \pm 15\%$ quando comparado ao valor correspondente do grupo constricto tratado com veículo. A dose de 0,01 µmol/kg de HOE-140 também apresentou atividade anti-hiperalgésica significativa em 60 e 90 min após o tratamento, com $54 \pm 8\%$ de inibição (Fig. 15B).

O tratamento com os antagonistas DALBK ou HOE-140 (ambos nas doses de 0,1 e 1 µmol/kg, i.p.) no 17º dia após a cirurgia não foi capaz de reverter a hiperalgésia térmica ao calor (Fig. 15C e D).

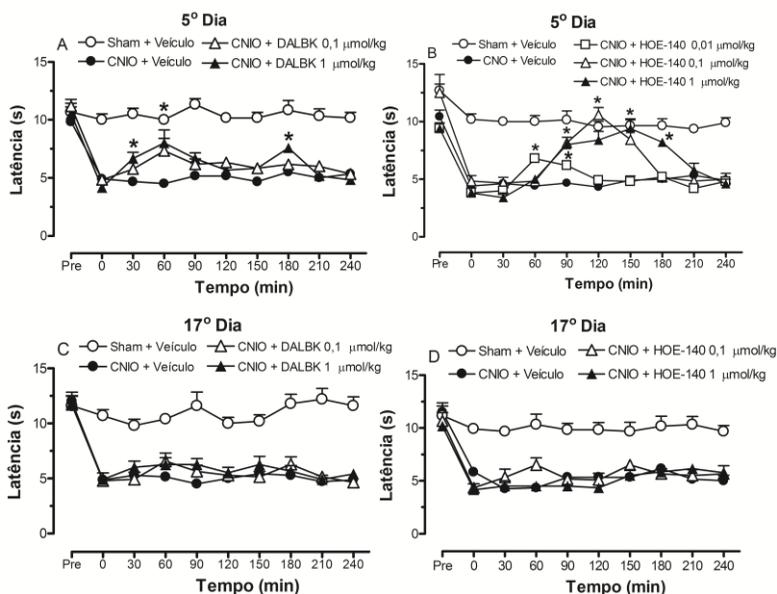


Figura 15. Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B_1 e B_2 sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor em camundongos Swiss no 5° e 17° dia após a CNIO. Efeito do tratamento com DALBK (antagonista seletivo para receptor B_1 , 0,1-1 $\mu\text{mol/kg}$, A e C) e HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B_2 , 0,01-1 $\mu\text{mol/kg}$, B e D) na hiperalgesia térmica ao calor no 5° (A e B) e 17° (C e D) dia após a CNIO. As respostas dos animais à estimulação térmica ao calor foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), imediatamente antes (0) da administração dos antagonistas e em intervalos de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo de latência para retirada da cabeça/movimento vigoroso das vibrissas ($n=6$ a 10 camundongos por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.6. Efeito do tratamento com os antagonistas de receptores B_1 e B_2 para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio induzida pela CNIO

A hiperalgesia térmica ao frio presente no 5° dia após a cirurgia de CNIO foi reduzida significativamente pelo tratamento sistêmico dos animais com DALBK (0,3, 1 ou 3 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e HOE-140 (0,1, 1 ou 1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (Fig. 16A e B). O tratamento com DALBK na dose de 1 $\mu\text{mol/kg}$ reduziu a hiperalgesia térmica ao frio aos 60 e 90 min, sendo a inibição máxima de $53 \pm 9\%$ aos 60 min (Fig. 16A). Já, na dose de 3 $\mu\text{mol/kg}$, o efeito anti-hiperalgésico foi significativo apenas aos 90 min após sua administração, quando a inibição atingiu $44 \pm 11\%$ (Figura

16A). Quanto aos efeitos do HOE-140 sobre a hiperalgesia ao frio na fase inicial, apenas a dose de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ apresentou atividade anti-hiperalgésica significativa em 90 e 120 min após sua administração, sendo que sua maior inibição observada foi de $40 \pm 9\%$ aos 90 min (Figura 16B).

Quando estes mesmos tratamentos foram aplicados no 25º dia após a cirurgia, verificou-se que o antagonista DALBK foi efetivo em reduzir a hiperalgesia ao frio do grupo constricto apenas na dose de 1 $\mu\text{mol/kg}$ (i.p.), aos 90 min após sua administração, quando a inibição foi de $60 \pm 18\%$ (Figura 16C). Nesta fase tardia da hiperalgesia ao frio, ambas as doses de HOE-140 testadas apresentaram atividade anti-hiperalgésica pontual, porém significativa. A dose de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ foi efetiva aos 60 min e a dose de 1 $\mu\text{mol/kg}$ aos 30 min, cada qual acarretando inibição de $51 \pm 10\%$ e $60 \pm 8\%$, respectivamente (Figura 16D).

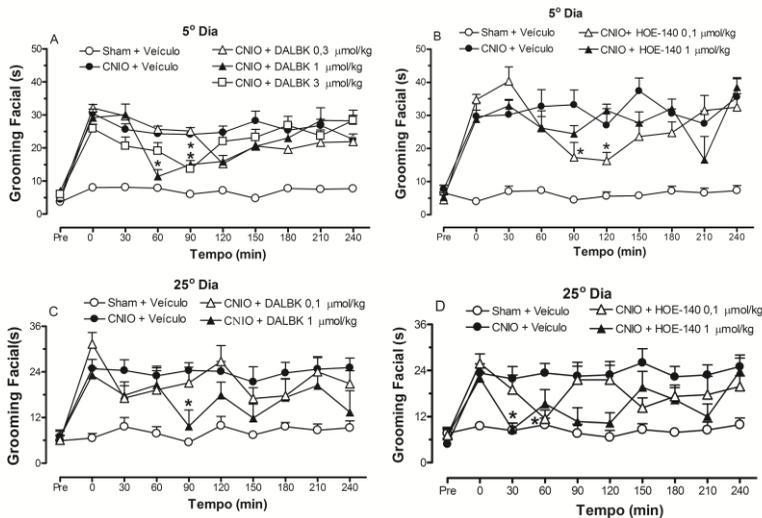


Figura 16. Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B_1 e B_2 sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por frio em camundongos Swiss no 5º e 25º dia após a CNIO. Efeito do DALBK (antagonista seletivo para receptor B_1 , 0,1-3 $\mu\text{mol/kg}$, A e C) e do HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B_2 , 0,1-1 $\mu\text{mol/kg}$, B e D) na hiperalgesia térmica ao frio no 5º (A e B) e 25º (C e D) dia após a CNIO. As respostas dos animais à estimulação térmica ao frio foram avaliadas previamente à cirurgia (Pre), imediatamente antes (0) da administração dos antagonistas e em intervalos de 30 min por um máximo de 4 h após o tratamento. Os valores representam o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante 2 minutos ($n = 6$ a 12 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.7. Efeito do tratamento local com os antagonistas de receptores B₁ e B₂ para cininas, DALBK e HOE-140, sobre as alterações de reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor e frio induzida pela CNIO

A instilação de solução contendo DALBK ou HOE-140 (3 nmol em 10 µL) sobre o nervo infraorbital, logo após a conclusão da colocação das amarras associadas ao modelo de CNIO, foi capaz de retardar o aparecimento da hiperalgesia térmica ao calor. Enquanto a redução da latência de resposta ao calor do grupo constricto, instilado com o veículo manifestou-se a partir do 5º dia após a cirurgia, nos animais instilados com DALBK ou HOE-140 o surgimento desta alteração sensorial foi postergada até o 10º dia após a cirurgia (Fig 17A). Por outro lado, tanto o DALBK quanto o HOE-140 falharam em retardar de modo significativo o desenvolvimento da hiperalgesia ao frio, quando instilados por sobre o nervo imediatamente após a constrição (Fig 17B).

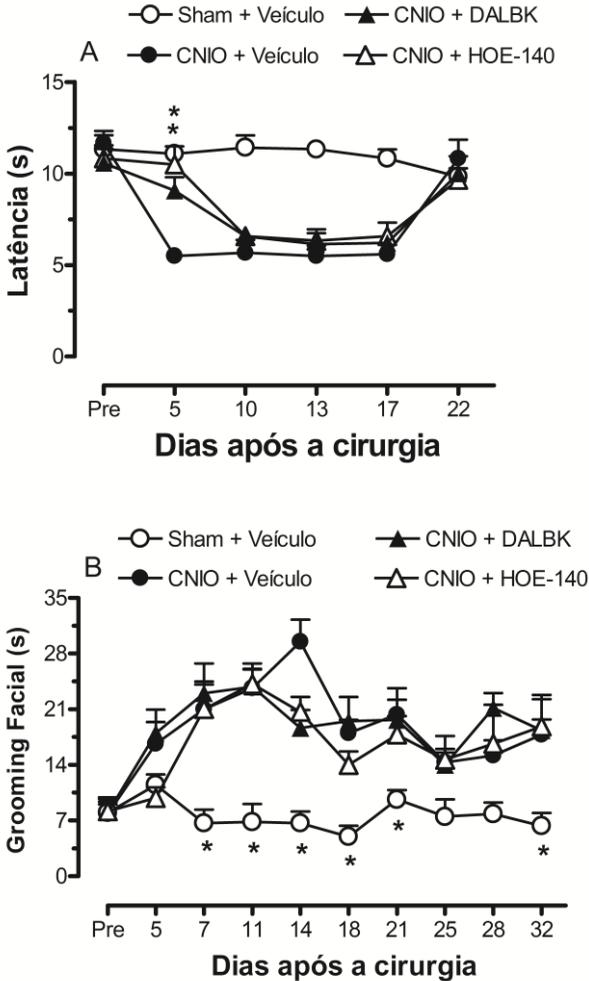


Figura 17. Efeito do tratamento local com os antagonistas dos receptores B_1 (DALBK) e B_2 (HOE-140) sobre a reatividade nociceptiva à estimulação térmica por calor (A) e frio (B) em camundongos Swiss submetidos à CNIO. Ambos os antagonistas foram instilados sobre o nervo infraorbital, logo após sua constrição, na concentração de 3 nmol/10 μ L. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor e frio foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam o tempo de latência para retirada da cabeça/movimento vigoroso das vibrissas (A) ou executando movimentos de limpeza (*grooming*) facial bilateral durante 2 minutos (B) (n= 6 a 7 camundongos por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo constricto que recebeu apenas veículo (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.3. Influência da deleção gênica dos receptores B₁ e/ou B₂ para cininas no desenvolvimento das alterações de reatividade nociceptiva orofacial mecânica induzida pela CNIO

Com a finalidade de corroborar os resultados observados em camundongos Swiss após o tratamento sistêmico com os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ para cininas, foram comparados os efeitos da CNIO sobre reatividade de camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e nocautes para os receptores de bradicinina frente à estimulação mecânica. Como demonstrado na figura 18A, os animais C57Bl/6 do tipo selvagem apresentam alteração sensorial nociceptiva mecânica após a CNIO. Porém, ao contrário dos animais Swiss, que apresentam redução da resposta nociceptiva mecânica no 38° dia após a CNIO, nos animais C57Bl/6 são os animais falso-operados (Sham) que se tornam sensíveis à estimulação mecânica no 34° dia após a cirurgia (Figura 18A). Em outras palavras, com o passar do tempo, ocorre uma sensibilização gradativa dos animais selvagens falso-operados à estimulação mecânica. Em contraste aos animais do tipo selvagem submetidos à cirurgia de CNIO, os animais nocautes para o receptor B₁ (Figura 18B), B₂ (Figura 18C) ou duplo nocaute (B₁/B₂^{-/-}, Figura 18D) submetidos a este procedimento não apresentaram quaisquer alterações sensoriais mecânicas, quando comparados ao grupo falso-operado.

5.4. Influência da expressão dos receptores B₁ e B₂ para cininas no desenvolvimento das alterações de reatividade nociceptiva orofacial térmica por calor induzidas pela CNIO

Quando os animais C57Bl/6 do tipo selvagem foram avaliados frente à estimulação térmica ao calor após a CNIO, observamos o desenvolvimento de hiperalgesia a partir do 2° dia após a constrição estendendo-se até o 13° dia pós-cirúrgico e restrito ao lado ipsilateral (Figura 19A e B). Os animais nocautes para os receptores B₁ e B₂ para cininas, semelhante ao estímulo mecânico, não apresentaram hiperalgesia térmica ao calor, contrariamente a essa resposta, os animais nocautes para o receptor B₁ apresentaram hipoalgesia térmica ao calor, observada no 5° dia após a constrição (Figura 19C).

Ao avaliarmos o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao frio em animais C57Bl/6 do tipo selvagem após a CNIO, não observamos qualquer diferença significativa entre os grupos constritos e falso-operados, o que impossibilitou a utilização de animais nocautes nesse modelo (dados não apresentados).

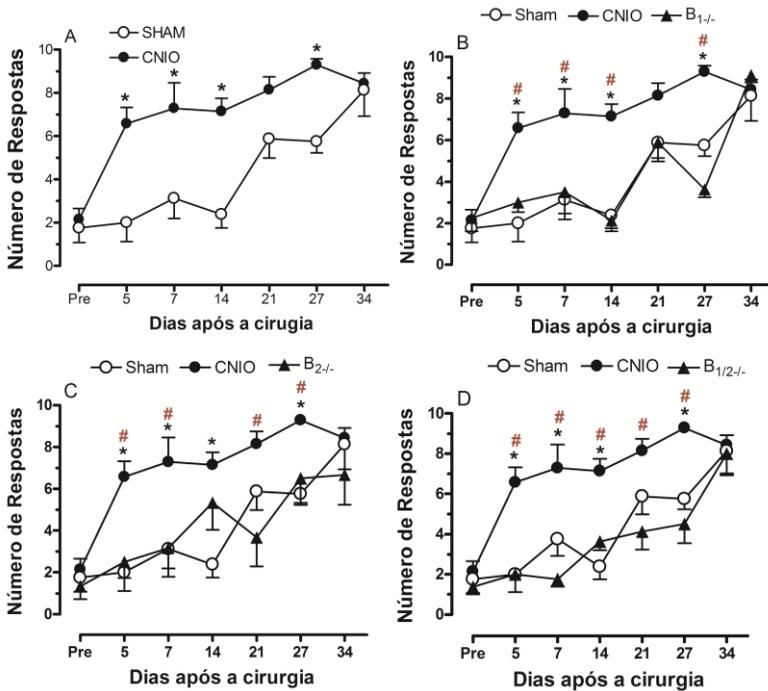


Figura 18. Avaliação da estimulação mecânica em camundongos C57Bl/6 submetidos à CNIO. Decurso temporal da alteração sensorial nociceptiva mecânica avaliada na região inervada pelo nervo trigêmeo (parte superior da cabeça) em animais C57Bl/6 do tipo selvagem (A), nocautes para o receptor B₁ (B), B₂ (C) e duplo nocaute (C). As respostas dos animais à estimulação mecânica foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia (grupos constrictos e sham). Os valores representam o número de respostas (frente a 10 estímulos) como comportamento de ataque/escape da cabeça (n= 6 a 10 animais por grupo). Asteriscos denotam p<0,05 entre os grupos constricto e sham do tipo selvagem; Cerquilhas denotam p<0,05 entre os grupos constricto do tipo selvagem e nocaute (ANOVA de 1 (B, C e D) e 2 (A) vias para medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

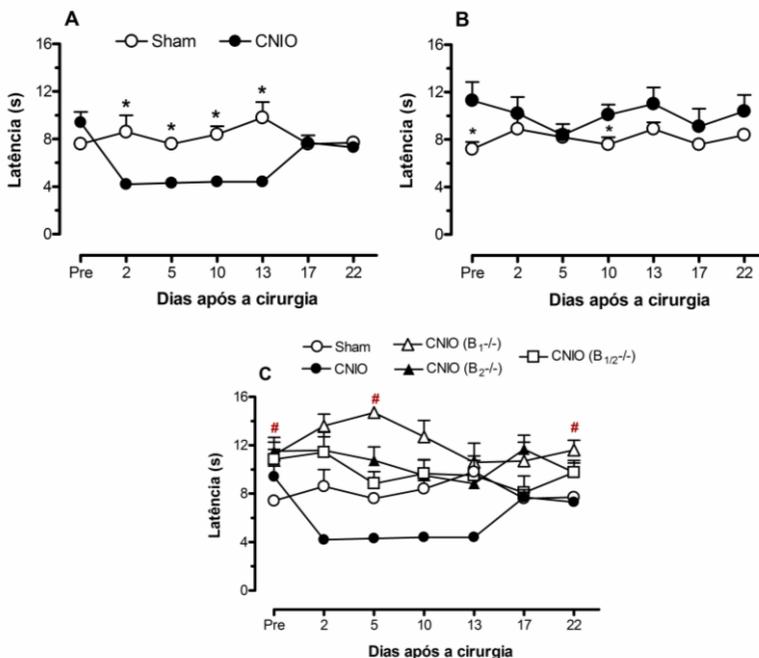


Figura 19. Avaliação da estimulação térmica por calor em camundongos C57Bl/6 submetidos à CNIO. Decurso temporal da resposta hiperalérgica avaliada no lado ipsilateral (A) e contralateral (B) em animais do tipo selvagem e em animais nocautes para os receptores B₁, B₂ ou duplo nocautes (C). As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a cirurgia. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 5 a 6 animais por grupo). Asteriscos denotam p<0,05 entre os grupos sham e constricto do tipo selvagem; Cerquilhas denotam p<0,05 entre os grupos nocaute B₁^{-/-} e constricto do tipo selvagem (ANOVA de 1 (C) e 2 (A e B) vias de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5. Hiperalgesia orofacial induzida por dinorfina A (1-17)

5.5.1. Efeito do pré-tratamento com antagonistas dos receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)

A administração pela via subaracnóide (s.a.) de dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio) foi capaz de produzir hiperalgesia térmica ao calor bilateralmente em camundongos Swiss. A resposta hiperalérgica iniciou 24 h após a administração da dinorfina e permaneceu significativa por até 6 dias após sua administração.

Quando as alterações da reatividade nociceptiva orofacial foram avaliadas frente aos estímulos mecânico e térmico por frio, o grupo tratado com dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.) não apresentou diferença significativa com relação ao grupo controle que recebeu apenas veículo, impossibilitando a utilização destes dois modelos nos testes subsequentes (dados não apresentados).

O tratamento prévio (15 min) dos animais com naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opióides, 28 nmol/sítio, s.a.) ou nor-BNI (antagonista seletivo para o receptor κ opióide, 87 nmol/sítio, s.a.) não foi capaz de bloquear o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) (Figura 20A e B). Podemos observar apenas um retardo (de 24 h para 48 h) no desenvolvimento da hiperalgesia quando os animais receberam o tratamento prévio com nor-BNI (Figura 20B). Em contrapartida, o tratamento prévio (15 min) com MK-801 (antagonista seletivo do receptor glutamatérgico NMDA, 10 nmol/sítio, s.a.) bloqueou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor durante todo o período observado (Figura 20C).

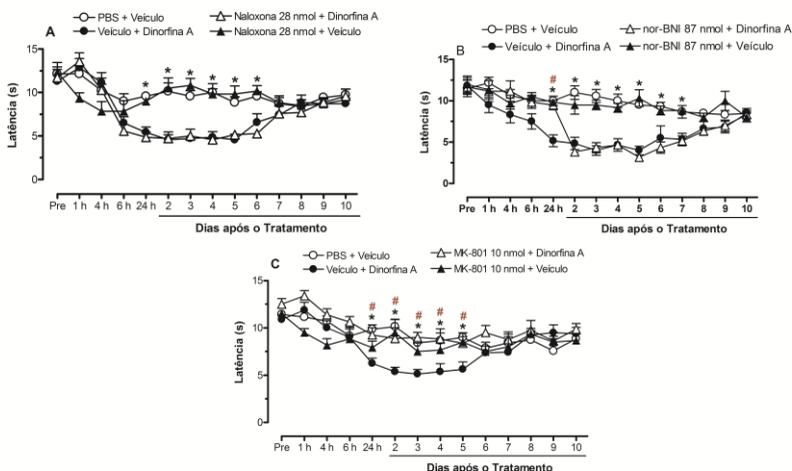


Figura 20. Efeito do tratamento prévio com antagonistas de receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss. Os antagonistas naloxona (não seletivo para receptores opióides, 28 nmol/sítio, s.a., A), nor-BNI (seletivo para o receptor κ opióide, 87 nmol/sítio, s.a., B), MK-801 (seletivo do receptor NMDA, 10 nmol/sítio, s.a., C) ou veículo foram administrados 15 min antes da dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.). As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a administração da dinorfina A ou veículo. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas ($n= 6$ a 7 animais por grupo). Asteriscos denotam $p<0,05$ em relação ao grupo veículo + dinorfina A (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5.2. Efeito do tratamento prévio com antagonistas de receptores B_1 e B_2 para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)

Tanto a administração prévia (15 min) de DALBK quanto de HOE-140, foi eficaz em retardar o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17, 15 nmol, s.a.). O antagonista DALBK foi administrado nas doses de 25 e 50 nmol/sítio (s.a.), sendo que a dose de 50 nmol apresentou maior eficácia, causando um retardo no desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor da 6^a para 48^a h após a indução. Esta mesma dose de DALBK apresentou um efeito anti-hiperalgésico pontual, porém significativo no 5^o dia após a indução (Figura 21A). O efeito do antagonista HOE-140, testado nas doses de 10 e 100 pmol/sítio (s.a), foi menos prolongado (a hiperalgesia térmica tornou-se significativa 24 h após a indução). De maneira semelhante à maior dose de DALBK, a dose de 10 nmol de HOE-140,

gerou um efeito anti-hiperalgésico pontual e significativo no 3º dia após a indução (Figura 21B).

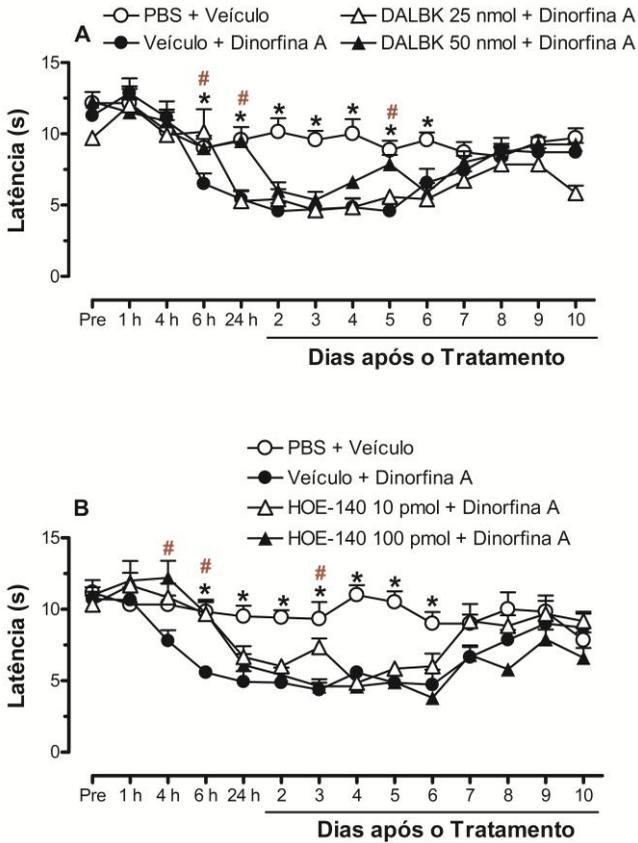


Figura 21. Efeito do tratamento prévio com os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorфина A (1-17) em camundongos Swiss. DALBK (antagonista seletivo para receptor B₁, 25 e 50 nmol/sítio, s.a., A), HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B₂, 10 e 100 pmol/sítio, s.a., B) ou veículo foram administrados 15 min antes da administração de dinorфина A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.). As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a administração da dinorфина A ou veículo. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 a 7 animais por grupo). Asteriscos denotam p<0,05 entre os grupos PBS + veículo e veículo + dinorфина A; Cerquilhas denotam p<0,05 entre os grupos tratados previamente com os antagonistas e veículo + dinorфина A (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5.3. Efeito do tratamento diário com antagonistas de receptores B₁ e B₂ para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)

Tendo em vista que o tratamento prévio com os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ para cininas foram eficazes em retardar o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17, 15 nmol, s.a.), realizamos novamente o tratamento prévio, porém, seguido pelo tratamento diário dos animais, a fim de verificar um possível bloqueio da resposta hiperalgéica.

Como demonstrado no gráfico 22A, o tratamento diário com o antagonista DALBK na dose de 50 nmol/sítio (s.a) foi capaz de bloquear a resposta hiperalgéica a partir do 2º dia após a indução. Já o tratamento diário com HOE-140, na dose de 10 nmol/sítio (s.a.), não demonstrou o mesmo perfil. Ao contrário do tratamento com DALBK, o tratamento com HOE-140 apresentou uma atividade anti-hiperalgéica moderada do início do tratamento que perdurou até a primeira hora após o tratamento no 3º dia. Depois deste período, apesar de sua administração diária, o tratamento com HOE-140 não demonstrou significativa atividade anti-hiperalgéica (Figura 22B).

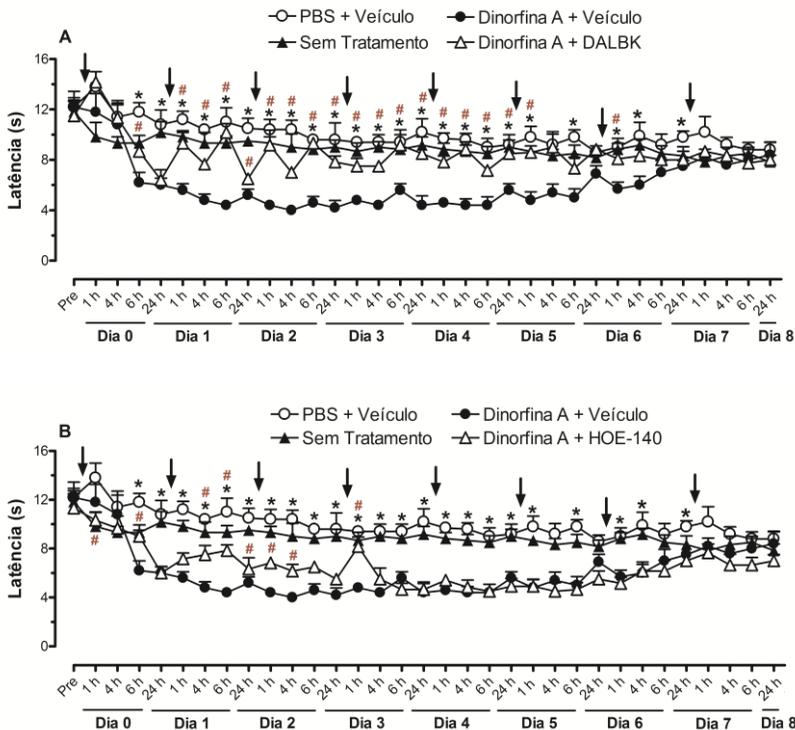


Figura 22. Efeito do tratamento diário com os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss. DALBK (antagonista seletivo para receptor B₁, 50 nmol/sítio, A), HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B₂, 10 pmol/sítio, B) ou veículo foram administrados pela via s.a. 15 min antes da administração de dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio), seguida de uma administração diária (indicadas pelas setas) por um período de sete dias. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a administração da dinorfina A. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 a 7 animais por grupo). Asteriscos denotam p<0,05 entre os grupos PBS + veículo e dinorfina A + veículo; Cerquilhas denotam p<0,05 entre os grupos tratados com os antagonistas e dinorfina A + veículo (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5.4. Efeito do tratamento com antagonistas de receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)

A hiperalgesia térmica ao calor, avaliada no 3º dia após a administração de dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.) não sofreu qualquer alteração quando diferentes grupos receberam o tratamento

sistêmico com os antagonistas naloxona (não seletivo para os receptores opióides, 10 mg/kg, i.p.), nor-BNI (seletivo para o receptor κ opióide, 10 mg/kg, s.c.) ou MK-801 (seletivo para o receptor glutamatérgico do tipo NMDA, 0,025 e 0,01 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) (Figura 23A, B e C, respectivamente).

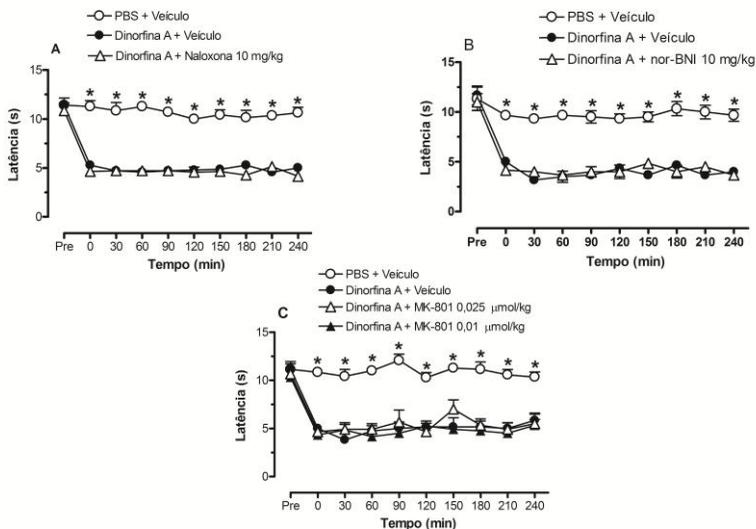


Figura 23. Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores opióides e NMDA sobre a hiperalgesia térmica ao calor no 3º dia após a administração de dinorfina A (1-17) em camundongos Swiss. Naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 10 mg/kg, i.p., A), nor-BNI (antagonista seletivo do receptor κ opióide, 10 mg/kg, s.c., B), MK 801 (antagonista seletivo do receptor NMDA, 0,01-0,025 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., C) ou veículo (i.p.) foram administrados no 3º dia após a administração de dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.). As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em intervalos de 30 min após a administração dos antagonistas ou veículo por um período máximo de 4 h. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 a 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo dinorfina A + veículo (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5.5. Efeito do tratamento com antagonistas de receptores B_1 e B_2 para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17)

Ao avaliarmos o tratamento dos animais após a instalação da resposta hiperalgéica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio, s.a.), observamos que o antagonista DALBK (0,1, 1 e 3 $\mu\text{mol/kg}$), administrado pela via sistêmica (i.p.) no 3º após indução,

reduziu significativamente, nas maiores doses, a hiperalgesia aos 60 min, com inibição máxima de $94 \pm 15\%$ para a dose de $1 \mu\text{mol/kg}$ e $56 \pm 12\%$ para a dose de $3 \mu\text{mol/kg}$ (Figura 24A).

Nenhum efeito significativo foi observado após a administração de HOE-140 ($0,1$ e $1 \mu\text{mol/kg}$) quando avaliado no mesmo período pela mesma via (Figura 24B).

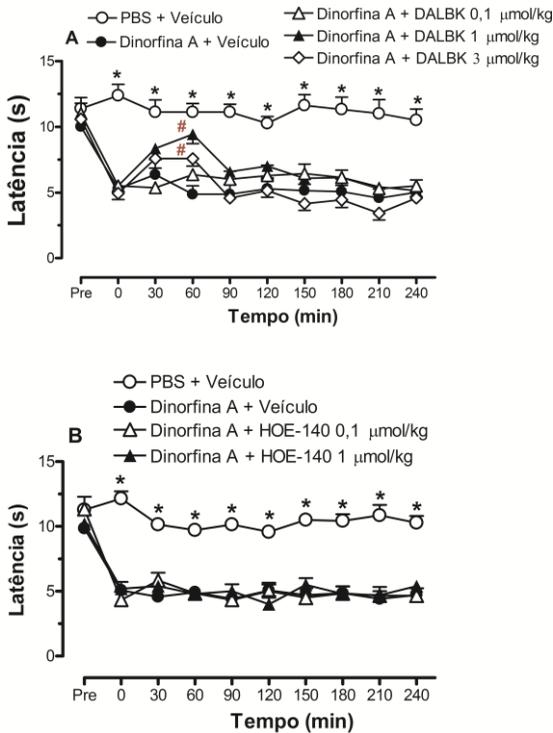


Figura 24. Efeito do tratamento com os antagonistas dos receptores B_1 e B_2 para cininas sobre a hiperalgesia térmica ao calor no 3º dia após a administração de dinorfina A ($1-17$) em camundongos Swiss. DALBK (antagonista seletivo para receptor B_1 , $0,1-3 \mu\text{mol/kg}$, A), HOE-140 (antagonista seletivo para receptor B_2 , $0,1-1 \mu\text{mol/kg}$, B) ou veículo foram injetados pela via i.p. no 3º dia após a administração de dinorfina A ($1-17$, 15 nmol/sítio , s.a.). As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em intervalos de 30 min por um período máximo de 4 h após a administração dos antagonistas. Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas ($n=6$ a 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $p<0,05$ em relação ao grupo dinorfina A + veículo (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

5.5.6. Efeito do tratamento com antissoro anti-dinorfina A (1-13) sobre a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela dinorfina A (1-17) e pela CNIO

Tendo em vista que a dinorfina A (1-17) induz hiperalgesia térmica ao calor, a qual teve seu efeito deslocado pelo tratamento prévio com DALBK e HOE-140, bloqueado e reduzido pelo tratamento diário e sistêmico, respectivamente, com DALBK, utilizamos o antissoro anti-dinorfina A (1-13) para investigar a influência da dinorfina A sobre hiperalgesia induzida pela CNIO em camundongos Swiss. Para isto, o antissoro anti-dinorfina A (1-13) foi administrado pela via subaracnóide na dose de 200 µg/sítio.

O tratamento prévio com o antissoro anti-dinorfina A (1-13), administrado 15 min antes de dinorfina A (1-17, 15 nmol/sítio), utilizado como controle positivo, bloqueou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor (Figura 25A). Quando administrado no 5º dia após a CNIO, o antissoro foi capaz de inibir de maneira significativa, porém transitória (dos 20 aos 120 min), a hiperalgesia térmica ao calor induzida pela CNIO (Figura 25B).

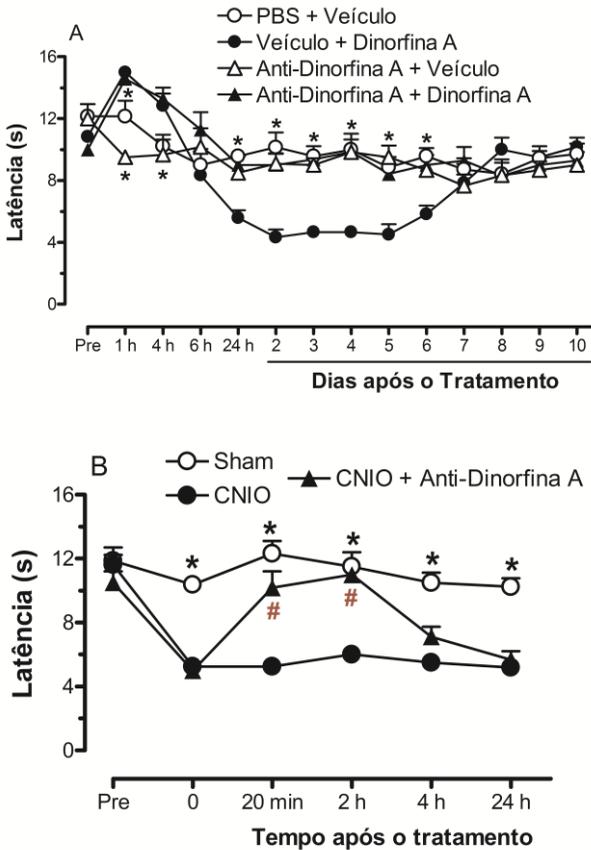


Figura 25. Efeito do tratamento com o antissoro anti-dinorfina A (1-13) sobre a hiperalgesia ao calor induzida pela administração de dinorfina A (1-17, 15 nmol, s.a, A) ou CNIO (B) em camundongos Swiss. As respostas dos animais à estimulação térmica por calor foram avaliadas antes (Pre) e em diferentes períodos após a administração do antissoro anti-dinorfina A (1-13, 200 µg, s.a.). Os valores representam o tempo de latência para que o animal afastasse vigorosamente a cabeça da fonte de calor ou apresentasse movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (n= 6 a 8 animais por grupo). Asteriscos denotam $p < 0,05$ em relação ao grupo CNIO ou veículo + dinorfina A (ANOVA de 1 via de medidas repetidas, seguido pelo teste de Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Descrito primeiramente por Vos e Macievicz (1991), o modelo de neuralgia do trigêmeo induzida pela constrição do nervo infraorbital foi originalmente padronizado em ratos. Os animais submetidos à constrição apresentam redução no ganho de peso, diminuição da atividade exploratória, aumento do comportamento de limpeza (*grooming*) facial bilateral espontâneo e de imobilidade (*freezing*), e desenvolvimento de hiperalgesia mecânica a partir do 12º dia após a cirurgia, a qual perdura por mais de 80 dias (Vos et al., 1994). Chichorro e colaboradores (2006a, 2006b, 2009) também observaram o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (ao calor e ao frio) e mecânica em ratos submetidos ao mesmo modelo de neuralgia.

Com o intuito de estudar os mecanismos envolvidos na neuralgia trigeminal em diferentes espécies, incluindo a utilização de animais nocautes, o primeiro passo deste projeto foi padronizar o modelo de constrição do nervo infraorbital já padronizado em ratos, em camundongos. Ao induzirmos a neuralgia do trigêmeo em camundongos, observamos algumas diferenças quando os resultados são comparados com a resposta hiperalgésica de ratos submetidos ao mesmo modelo (resultados prévios do nosso grupo de pesquisa). Não foi observada nenhuma alteração com relação ao ganho de peso dos animais operados, assim como não foi observado aumento do *grooming* facial espontâneo após a constrição, indicando que a cirurgia não provocou alteração sensorial ou motora que dificultasse ou reduzisse a alimentação do animal. Além disso, a ausência de alteração do *grooming* facial espontâneo após a cirurgia sugere que o animal não apresenta nocicepção espontânea. Porém, como os animais não foram monitorados 24 horas nas suas gaiolas de moradia, tal diferença pode ter passado despercebida.

Diversos artigos da literatura (Wijnvoord et al., 2010; Novák et al., 2010; Lawson et al., 2010; McKelvy et al., 2007; Chaouloff et al., 1995) demonstram diferenças na concentração de neurotransmissores, como a serotonina, e de receptores, como o receptor μ opióide, entre as espécies e o sexo de animais utilizados em pesquisas. Essas diferenças fazem com que cada linhagem responda de maneira particular ao estímulo ao qual é submetida. Destacamos aqui a diferença no limiar nociceptivo observado em quatro linhagens distintas de camundongos após a transecção dos nervos tibial e peroneal. A resposta nociceptiva dos animais estava diretamente relacionada com a concentração de

serotonina na medula espinhal (para revisão ver Wijnvoord et al., 2010). Portanto, diferenças existentes entre as espécies avaliadas podem justificar a alteração comportamental frente ao mesmo modelo experimental, como a redução de peso e aumento do grooming facial observados em ratos Sprague-Dawley, mas não em camundongos Swiss.

A cirurgia foi eficaz em induzir hiperalgesia térmica ao calor restrita ao lado ipsilateral tanto em ratos quanto camundongos, tendo efeito mais duradouro em camundongos Swiss e C57Bl/6 (17 e 13 dias para as respectivas espécies de camundongos, versus 10 dias para ratos). Na avaliação das alterações de reatividade nociceptiva orofacial térmica ao frio, a resposta mostrou-se mais duradoura que em ratos, permanecendo por um tempo duas vezes maior (25 dias), sendo observada também no lado contralateral à cirurgia (do 5° ao 21° dia). Nenhuma alteração significativa na reatividade nociceptiva ao frio foi observada entre o grupo falso operado (sham-operated) e o grupo constricto em camundongos do tipo selvagem da linhagem C57Bl/6.

As discrepâncias observadas no modelo de nocicepção térmica ao frio podem ser originadas por fatores anatômicos, intensidade do estímulo aplicado e diferenças relacionadas ao sexo. Quanto à organização anatômica e funcional do complexo sensorial trigeminal, sabe-se que projeções do gânglio do trigêmeo dirigem-se para ambos os lados do bulbo e do núcleo do trato espinhal, e que a estimulação unilateral do gânglio do trigêmeo ativa neurônios tanto no subnúcleo caudal ipsilateral como contralateral (Jacquin et al., 1990; Ingvarlsen et al., 1997; Samsam et al., 2001). Confirmando esta organização, estudos eletrofisiológicos demonstram 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). Além disso, mudanças sensoriais no lado contralateral à lesão em resposta a uma constrição neural unilateral são comuns e acompanhadas por alteração na expressão de neuropeptídeos como SP, CGRP e do receptor de neurotrofina p75 (Koltzenburg et al., 1999). Sugere-se que o aumento contralateral do receptor de neurotrofina p75 possa promover o aumento na expressão de receptores B₂ para cininas (Zhou et al., 1996; Petersen et al., 1998).

Ao aplicarmos um estímulo, seja o mesmo mecânico, térmico ou químico, podem ser ativados distintos receptores e vias de sinalização. O que vai determinar a seleção entre qual via será ativada são a natureza e a intensidade do estímulo. Como o estímulo ao frio aplicado neste trabalho é um jato de tetrafluoretano, por mais que o experimentador padronize a aplicação manual do jato, o procedimento

pode apresentar alguma variabilidade. Outro fator importante é que, independente da cirurgia, a intensidade fixa do estímulo frio utilizado talvez induza intensidades distintas de nocicepção em linhagens e/ou espécies diferentes. Neste sentido, observamos que a intensidade de resposta dos animais do tipo selvagem da linhagem C57Bl/6 ao frio já era maior que a dos Swiss antes mesmo da cirurgia, impossibilitando a manifestação de aumentos adicionais induzidas pela cirurgia na primeira linhagem.

A maior diferença na alteração de reatividade nociceptiva orofacial induzida pela cirurgia em ratos e camundongos foi na indução da hiperalgesia mecânica. Em ratos, observou-se diferença significativa da resposta hiperalgésica com relação ao grupo controle por mais de 120 dias após a cirurgia (Chichorro et al., 2006b), enquanto a duração do mesmo tipo de resposta foi de 36 dias em camundongos da linhagem Swiss e de apenas 27 dias nos do tipo selvagem da linhagem C57Bl/6. Embora ambas as espécies (*Rattus norvegicus* e *Mus musculus*) pertençam à mesma família (Muridae), o decurso temporal mostrou-se diferente para o mesmo procedimento experimental, indicando que a espécie influencia de modo importante na escolha do modelo, podendo ser inclusive fator determinante para as conclusões de uma pesquisa (Chaouloff et al., 1995; Wijvoord et al., 2010). Em 2002, Benoliel e colaboradores demonstraram que ratos *Lewis* são mais sensíveis à dor neuropática do que ratos *Sprague-Dawley* ou *Sabra* após lesão do nervo trigeminal.

No presente estudo, observamos o desenvolvimento de hiperalgesia após a constrição do nervo infraorbital frente a diferentes estímulos (térmicos e mecânico) em ambas as linhagens de camundongo utilizadas. A duração do período da resposta hiperalgésica mostrou-se significativa e duradoura em comparação aos animais falso-operados (sham), em ambas as linhagens. Por isso, as mesmas foram utilizadas para a avaliação da participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas na neuralgia do trigêmeo, via diferentes formas de tratamento (drogas e/ou vias de administração) ou alterações gênicas.

É importante salientar que este estudo fez uso de camundongos machos da linhagem *Swiss* e fêmeas da linhagem C57Bl/6. Estudos têm demonstrado pequenas diferenças no limiar nociceptivo relacionadas ao sexo de animais da mesma linhagem. Em fêmeas a resposta nociceptiva pode ainda variar dependendo período do ciclo estral que, em camundongos fêmea, dura de quatro a cinco dias, e compreende proestro, estro, metaestro e diestro. Apesar de alguma controvérsia, resultados demonstram que fêmeas na fase proestro apresentam maior

sensibilidade nociceptiva. Porém, quando agrupadas, as fêmeas podem permanecer em anestro (ausência de ciclo estral) continuamente até que sejam expostas a um macho (Vicent e Martin, 2009; Chorilli et al., 2007). Apesar de não ter sido realizado o controle do ciclo estral das fêmeas utilizadas neste estudo, não observamos nenhuma alteração da sensibilidade nociceptiva nos animais falso operados ao longo das avaliações, que tiveram a duração de 22 (térnico ao calor) e 34 dias (mecânico).

Durante o desenvolvimento deste estudo, foram publicados dois trabalhos que padronizavam novos modelos de neuralgia do trigêmeo em camundongos C57Bl/6. O primeiro deles, de Xu et al. (2008), padronizou a constrição parcial do nervo infraorbital e demonstrou que a hiperalgesia mecânica induzida por esta variante do modelo original de Vos e Macievicz, desenvolve-se a partir do 1º dia após a cirurgia, e é mantida até o 23º dia após a constrição. O estudo mostrou ainda, a ativação de células da microglia e de astrócitos, no 1º e 8º dias após a cirurgia, respectivamente, aumento da proliferação celular no 8º dia após a constrição, bem como aumento na marcação para receptores NK1 e diminuição da marcação para CGRP e SP no segmento C1 da medula espinhal e bulbo caudal de animais submetidos à cirurgia. Todas essas alterações limitaram-se ao lado ipsilateral à constrição. Em camundongos C57Bl/6, o *grooming* facial espontâneo ficou restrito ao 1º dia pós-cirúrgico. O outro trabalho, de Seino et al. (2009), padronizou a ligação do nervo mental como modelo para estudo da neuralgia do trigêmeo. Neste modelo, a hiperalgesia mecânica foi observada por apenas duas semanas após a cirurgia. Próximo ao sítio da lesão foi observado aumento da marcação para a SP. Contrariamente aos dados descritos por Xu et al. (2008), e de acordo com os resultados obtidos nesta tese, os autores não registraram a ocorrência de *grooming* facial espontâneo após a cirurgia, apesar de terem utilizado a mesma linhagem de camundongos.

A busca por modelos experimentais que se aproximem das neuropatias humanas e/ou possam ser utilizadas para a pesquisa de novos alvos terapêuticos ainda faz-se necessária. Recentemente os modelos experimentais animais estão sendo reavaliados por causa da baixa porcentagem de fármacos efetivos nestes testes que realmente consegue avançar para estudos clínicos (Mogil et al., 2010). Sabemos que todo modelo tem suas limitações e que dificilmente consegue reproduzir todos os sintomas apresentados por humanos. Muitos modelos, portanto, servem apenas para desvendar os mecanismos fisiológicos envolvidos nas alterações sensoriais. Por outro lado,

diversos avanços na compreensão e no tratamento da dor neuropática resultaram de descobertas feitas em modelos experimentais animais.

Com o intuito de validar o modelo de constrição do nervo infraorbital em camundongos utilizado no presente estudo para a pesquisa de novas alternativas farmacológicas para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, os seguintes fármacos foram utilizados: carbamazepina e gabapentina (indicados como primeira e segunda escolha, respectivamente para o tratamento da neuralgia de trigêmeo) (Attal e Finnerup, 2010; O'Connor e Dworkin, 2009; Wiffen et al., 2005), morfina (opióide, indicados para crises agudas) (Attal e Finnerup, 2010) e indometacina (anti-inflamatório não esteroidal, fármaco não recomendado para a neuralgia do trigêmeo). Os efeitos destes tratamentos foram avaliados em animais submetidos à constrição do nervo infraorbital nas fases inicial e final da resposta hiperalgésica a cada um dos diferentes estímulos aplicados.

Todos os fármacos citados acima foram efetivos em reduzir a hiperalgesia térmica ao calor e ao frio em suas fases iniciais (5º dia), enquanto a hiperalgesia mecânica nesta fase mostrou-se resistente apenas à gabapentina. Possivelmente a gabapentina não apresentou atividade anti-hiperalgésica por termos utilizado apenas uma dose. Esta dose foi escolhida de acordo com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em experimentos com ratos e artigos da literatura. Dessa forma, acreditamos que uma dose mais elevada deveria ter sido utilizada. Apesar da indometacina não ser um fármaco indicado para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, ela apresentou atividade anti-hiperalgésica marcante possivelmente correlacionada à sua atividade anti-inflamatória, uma vez que o procedimento de constrição induz ativação glial e consequente liberação de mediadores inflamatórios (Xu et al., 2008). A infiltração de células inflamatórias, bem como células imunes resistente em resposta a danos no sistema nervoso leva à subsequente produção e secreção de vários mediadores inflamatórios (Moalen e Tracey, 2006).

A ativação de células gliais e da resposta imune adaptativa (mediada pela infiltração de linfócitos T) logo após uma lesão neural já está bem descrita na literatura, tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Quando ativadas, estas células secretam diversas citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição que contribuem para o processo inflamatório, excitabilidade neural e subsequente desenvolvimento da dor neuropática (Xu et al., 2008; Villa et al., 2010; Grace et al., 2011; Komagata et al., 2011). Portanto, é possível observar uma redução

significativa da resposta hiperalgésica com a utilização de fármacos anti-inflamatórios, como a indometacina, até uma semana após a lesão.

Já nas fases tardias das respostas hiperalgésicas (17º dia - calor; 25º dia - frio e 36º dia - mecânico), o efeito anti-hiperalgésico dos fármacos mostrou-se bem limitado. O anti-inflamatório não-esteroidal indometacina perdeu sua eficácia farmacológica frente ao frio e o estímulo e mecânico e apresentou apenas um efeito pontual, porém significativo (meia hora após o tratamento), quando avaliado frente ao frio. Estes resultados sugerem que a atividade anti-hiperalgésica da indometacina na fase inicial estava correlacionada com sua atividade anti-inflamatória, decorrente da inibição da formação de mediadores inflamatórios (prostanóides) pelas cicloxigenases. Já na fase tardia, quando o processo inflamatório não está mais presente, a indometacina deixa de exercer efeito supressor sobre a resposta hiperalgésica. Quanto ao seu efeito discreto e pontual na hiperalgesia ao frio, acreditamos que o mesmo esteja correlacionado à intensidade do estímulo aplicado, já discutido anteriormente, que seria capaz de induzir dor e restabelecer o processo inflamatório.

Preconizada como primeira escolha de tratamento para a neuralgia do trigêmeo, a carbamazepina foi eficaz em reduzir a resposta hiperalgésica frente a todos os estímulos testados (térmicos e mecânico) em ambos os períodos avaliados. Descrita como fármaco de segunda escolha na neuralgia do trigêmeo, a gabapentina, na dose utilizada, mostrou-se efetiva em reduzir a hiperalgesia apenas frente aos estímulos térmicos (frio e calor), quando avaliada na fase tardia da neuralgia do trigêmeo. Ao ser administrada no 36º dia após a cirurgia e ter seu efeito avaliado frente à estimulação mecânica, de maneira semelhante à gabapentina, na dose utilizada, a morfina não apresentou atividade anti-hiperalgésica. Este conjunto de resultados parece validar o modelo como ferramenta para a pesquisa de novas drogas com potencial terapêutico para a neuralgia do trigêmeo, ainda que aqueles atinentes à hiperalgesia ao frio mereçam ser melhor investigados. No entanto, é pertinente ressaltar que, o modelo que utilizamos não parece promover os episódios de dor espontânea que são característicos deste tipo de neuropatia em humanos.

O passo seguinte do estudo consistiu em avaliar se os receptores B₁ e B₂ para cininas constituem alvos pertinentes de uma nova alternativa terapêutica para a neuralgia do trigêmeo. Para esta finalidade, foram testados, em diferentes períodos e por diferentes vias, os efeitos anti-hiperalgésicos dos antagonistas de receptores cininérgicos des-Arg⁹-(Leu⁸)-bradicinina (DALBK, antagonista do receptor B₁) e

Icatibante (HOE-140, antagonista do receptor B_2) sobre as alterações sensoriais nociceptivas induzidas pela constrição do nervo infraorbital em camundongos.

Quando avaliamos o efeito do tratamento com os antagonistas sobre a resposta hiperalgésica frente aos estímulos térmicos (calor e frio) e mecânico, tanto DALBK quanto HOE-140, mostraram-se eficazes em reduzir significativamente a resposta hiperalgésica na sua fase inicial (5º dia). O tratamento local com os mesmos antagonistas, no momento da cirurgia, também foi eficaz em retardar o aparecimento da hiperalgésia frente ao estímulo térmico ao calor. Observamos ainda que tanto o receptor B_1 quanto o receptor B_2 parecem ser importantes ao desenvolvimento da resposta hiperalgésica mecânica e térmica, visto que animais nocautes para os receptores B_1 , B_2 ou duplo nocautes constritos não desenvolveram alterações sensoriais nociceptivas.

Dessa forma, nossos resultados demonstram que ambos os receptores para cininas (B_1 e B_2) contribuem ao desenvolvimento e a manutenção da neuralgia do trigêmeo em resposta à constrição do nervo infraorbital. Contudo, experimentos realizados na fase tardia da resposta hiperalgésica demonstraram que o tratamento com DALBK não apresenta atividade anti-hiperalgésica frente ao estímulo térmico ao calor, mas o HOE-140 ainda se mostrou efetivo em reduzir a resposta hiperalgésica frente ao frio. Estes resultados sugerem uma maior participação dos receptores B_1 para cininas em estágios mais avançados da neuralgia do trigêmeo, demonstrando haver uma alteração da participação dos receptores para cininas frente aos diferentes estímulos e períodos avaliados.

Danos neurais estão associados com inflamação local e liberação de mediadores como CGRP, óxido nítrico e bradicinina (Zochodne et al., 1995; Levy e Zochodne, 1997, 1998; Levy et al., 1999). A lesão neural induzida pela ligação do nervo ciático promove o aumento da densidade de sítios de ligação para ligantes de receptores B_1 e B_2 em neurônios sensoriais (Petersen et al., 1998). Acreditamos que a lesão causada pela constrição do nervo infraorbital, nos moldes em que foi realizada no presente estudo, induz à ativação de ambos os receptores, B_1 e B_2 para cininas, no desenvolvimento da resposta hiperalgésica. Com a redução ou até mesmo resolução do processo inflamatório, sugerimos que o receptor B_1 envolvido na manutenção da dor crônica, e super expresso após a indução mediada por citocinas (IL-1 β) e pelo próprio receptor, torne-se mais relevante para a manutenção da neuralgia.

A utilização de antagonistas para cininas tem demonstrado que o bloqueio dos receptores B₂ promove analgesia na fase aguda de modelos de hiperalgisia inflamatória (Perkins et al., 1993; Sufka e Roach, 1996; Rupniak et al., 1997). Diversas revisões da literatura sugerem que o receptor B₂ participe da fase aguda da resposta inflamatória, através do aumento da permeabilidade vascular, constrição venosa, dilatação arterial, indução de nocicepção mediada pela ativação de neurônios sensoriais (fibras C e A δ) e indução da liberação de prostanóides (Ferreira et al., 1993; Dray, 1997; Couture et al., 2001). Tem-se observado, contudo, que antagonistas do receptor B₂ apresentam efeito anti-hiperalgésico tanto em modelos experimentais agudos (Rupniak et al., 1997), quanto persistentes, de hiperalgisia inflamatória (Ferreira et al., 1993; Perkins et al., 1993).

Contrariamente aos antagonistas de receptores B₂, antagonistas de receptores B₁ mostram-se mais efeitos em promover analgesia em modelos de hiperalgisia inflamatória persistente (Perkins et al., 1993; Khasar et al., 1995). O receptor B₁ participaria da fase crônica destas respostas, promovendo o recrutamento de leucócitos, edema e nocicepção (Dray, 1997; Couture et al., 2001). Porém, estudos mais recentes também apontam um papel do receptor B₁ no desenvolvimento da hiperalgisia e no comportamento normal da dor (Pesquero et al., 2000; Ferreira et al., 2005; Quintão et al., 2008). Em 1997, Tonussi e Ferreira observaram, no modelo de inflamação articular induzida por bradicinina, que o receptor B₁ está envolvido com a ativação de nociceptores, já o receptor B₂ atua na sensibilização nociceptiva. A formação do complexo membranar proteolítico dos receptores B₁ e B₂ também parece contribuir para a redução das respostas mediadas apenas pela ativação do receptor B₂, ao mesmo tempo em que aumenta a capacidade de sinalização dos agonistas bradicinina e calidina via complexo membranar proteolítico (Kang et al., 2004).

Em 2007, nosso grupo de pesquisa demonstrou resultados semelhantes aos desta tese no modelo de neuropatia induzida pela ligação do nervo espinhal em ratos (Werner et al., 2007). O tratamento de ratos com os antagonistas DALBK e HOE-140 no 12º dia após a cirurgia inibiu de maneira significativa a resposta hiperalgésica frente à aplicação de estímulos térmicos e mecânico, na pata. Neste mesmo período, a expressão de ambos os receptores (B₁ e B₂) foi significativamente maior na pata e nos nervos espinhais L4-L6 dos animais submetidos à constrição (Werner et al., 2007). A expressão do RNAm para ambos os receptores avaliada no DRG também está aumentada no 14º dia após a ligação do nervo espinhal (Lai et al., 2006).

Experimentos que avaliam a resposta nociceptiva de animais nocautes para os receptores B_1 e B_2 , em conjunto com resultados da utilização de agonistas e/ou antagonistas em modelos químicos de nocicepção, têm sugerido que ambos os receptores estão envolvidos na via de transmissão nociceptiva espinhal (Ferreira et al., 2002). Quando a participação dos receptores de cininas foi avaliada frente ao processo inflamatório induzido por CFA, observou-se que tanto o antagonista do receptor B_1 (DALBK), quanto o antagonista do receptor B_2 (HOE-140), reduziram significativamente a hiperalgesia térmica ao calor avaliada na pata de camundongos. De maneira curiosa, quando animais geneticamente modificados para não expressar um dos receptores para cininas foram avaliados no mesmo modelo, apenas os animais nocautes para o receptor B_1 apresentaram redução parcial do desenvolvimento da hiperalgesia térmica da pata ao calor (Ferreira et al., 2001).

Resultados obtidos em experimentos *in vitro* revelaram que camundongos que não expressam o receptor B_1 exibem uma redução de 50% na facilitação do disparo do reflexo espinhal nociceptivo, fenômeno presente em vários modelos de dor neuropática, conhecido como *wind-up* (Pesquero et al., 2000). Animais submetidos à ligação parcial do nervo ciático apresentam aumento na densidade de sítios de ligação (*binding*) para ligantes dos receptores B_1 e B_2 no DRG e medula espinhal no 2° e 14° dia após a cirurgia (lado ipsilateral). No lado contralateral, os sítios de ligação tiveram um aumento significativo apenas no 2° dia após a ligação do nervo para o receptor B_1 e ambos os sítios dos receptores B_1 e B_2 no DRG e na medula espinhal 14 dias após a cirurgia (Petcu et al., 2008).

Utilizando o modelo de ligação do nervo ciático, Ferreira et al. (2005) observaram que o tratamento com DALBK mostrou-se efetivo em atenuar o início da resposta hiperalgésica mecânica, porém não apresentou atividade anti-hiperalgésica quando foi administrado no 48° dia após a cirurgia. Neste mesmo trabalho, foi observado um aumento significativo nos níveis de RNAm do receptor B_1 no 7° dia após a cirurgia, quando este foi avaliado na pata, nervo ciático e medula espinhal. Corroborando esses achados, utilizando o modelo de neuropatia induzida pela avulsão do plexo braquial, Quintão e colaboradores (2008) também demonstraram a participação dos receptores B_1 no desenvolvimento da hiperalgesia térmica e mecânica, assim como detectaram aumento nos níveis de RNAm e expressão de proteínas para este receptor na medula espinhal, hipotálamo, hipocampo, tálamo e córtex cerebral 4 dias após a cirurgia.

A utilização de animais nocaute para o receptor B_1 , B_2 ou duplo nocaute no nosso projeto demonstrou que ambos os receptores são importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia orofacial mecânica e térmica ao calor, ainda que o antagonista do receptor B_1 (DALBK) reverta significativamente a hiperalgesia mecânica tardia em camundongos Swiss constrictos. Uma vez ativados, os receptores para cininas podem atuar por diferentes vias de transdução de sinal, incluindo ativação da fosfolipase A_2 , C e D, com subsequente liberação de prostaglandina, óxido nítrico, diacilglicerol (DAG), fosfatos de inositol (gerando mobilização de cálcio intracelular) e várias isoformas de proteína quinase C. Além destas vias, o receptor B_2 também pode atuar via proteínas tirosina quinase, fosfatases e MAPKS (Couture e Lindsey, 2000; Couture et al., 2001; Marceau e Regoli, 2004; Mizumura et al., 2009).

Dados eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sugerem que o receptor B_2 presente em neurônios do corno dorsal da medula espinhal ative, diretamente, a PKC, gerando aumento do cálcio intracelular via inositol trifosfato (IP_3), e, indiretamente, ative a PKA através da produção de PGE_2 . A ativação das duas proteínas quinases aumenta as correntes decorrentes da ativação dos receptores NMDA e AMPA, aumentando a transmissão excitatória neuronal (Kohno et al., 2008). Em neurônios do corno dorsal da medula espinhal, a bradicinina induz fosforilação e consequente ativação da ERK (Xin et al., 2006; Polgár et al., 2007).

A ação da bradicinina via receptores B_2 também pode induzir a ativação do fator nuclear κB ($NF_{\kappa B}$), a expressão gênica de IL-1 β (Pan et al., 1998) e a produção de IL-6 e IL-8 (Hayashi et al., 1998). Estes dados favorecem a hipótese de que o receptor B_2 atue no início do processo inflamatório ou do dano neuronal e que, por um mecanismo de auto-regulação, a dessensibilização dos receptores B_2 ocorra conjuntamente com o aumento da expressão de receptores B_1 . Além dos segundos mensageiros acoplados ao receptor B_2 , várias citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-8 e o $NF_{\kappa B}$ podem induzir o aumento da expressão dos receptores B_1 e estas por sua vez são induzidas pela ativação do receptor B_1 (Calixto et al., 2000; Marceau e Regoli, 2004). O aumento da expressão dos receptores B_1 em neurônios sensoriais tem sido relacionado com condições neuropáticas e a presença de GDNF, enquanto a super expressão dos receptores B_2 é mediada pelo fator de crescimento do nervo (Vellani et al., 2004; Mizumura et al., 2009).

Desta maneira, são múltiplas as vias pelas quais os receptores de bradicinina podem atuar para a indução da resposta hiperalgéica. No

modelo de neuralgia do trigêmeo utilizado, ambos os receptores B_1 e B_2 parecem atuar igualmente no desenvolvimento das alterações sensoriais.

Durante a realização do presente projeto, dois artigos (Lai et al., 2006; Lai et al, 2008) descrevendo a ação pró-nociceptiva da dinorfina sobre receptores B_1 e B_2 para cininas nos chamaram a atenção. Dos dados da literatura surgiram duas perguntas. Será que a dinorfina é capaz de induzir hiperalgesia orofacial? A dinorfina pode atuar sobre os receptores B_1 e B_2 para cininas de modo a participar da mediação da resposta hiperalgéica observada no nosso modelo?

Para responder essas perguntas injetamos dinorfina A (1-17) centralmente, pela via subaracnóide (entre C1 e o osso occipital). Observamos que uma única administração do opióide induziu hiperalgesia térmica ao calor na região orofacial persistente (6 dias). Porém, a administração de dinorfina A (1-17) não acarretou nenhuma alteração significativa na sensibilidade dos animais à aplicação de estímulo térmico frio ou mecânico.

Tanto o pré-tratamento dos animais com DALBK, quanto com HOE-140, foram eficazes em retardar o aparecimento da resposta hiperalgéica à administração de dinorfina A (1-17). Já no pós-tratamento, administrado no período em que a hiperalgesia já estava instalada (3º dia), apenas o antagonista DALBK reduziu de maneira significativa a resposta hiperalgéica na primeira hora após sua administração. Experimentos controles adicionais revelaram que o tratamento com antagonista não seletivo dos receptores opióides (naloxona) ou seletivo para os receptores κ (nor-BNI), tanto previamente quanto após a cirurgia, não alteraram a resposta hiperalgéica induzida pela dinorfina A. Já o tratamento prévio com o antagonista do receptor glutamatérgico NMDA (MK-801) foi capaz de bloquear o desenvolvimento da hiperalgesia. No entanto, quando o mesmo foi administrado durante a hiperalgesia (pós-tratamento no 3º dia) não apresentou nenhuma eficácia.

Estes resultados assemelham-se aos descritos na literatura. Quando a dinorfina A é administrada pela via intratecal em ratos, a mesma promove hiperalgesia térmica que é acompanhada ainda pelo desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (Lai et al., 2006). A administração intratecal de dinorfina A (1-17) induz hiperalgesia mecânica por mais de 60 dias em ratos. O tratamento intratecal com MK-801 (antagonista do receptor glutamatérgico NMDA) bloqueia o seu desenvolvimento da hiperalgesia, mas não é eficaz em revertê-la.

Por outro lado, nenhuma alteração foi observada quando naloxona foi administrada pela mesma via (Vanderah et al., 1996).

As dinorfina são opióides endógenos que se assemelham à leu-enkefalina com porções C terminais extendidas. A dinorfina A (1-17) é o maior fragmento proteolítico da pró-dinorfina, amplamente distribuído no sistema nervoso central (Civelli et al., 1985). A dinorfina desempenha diversas funções fisiológicas, incluindo regulação neuroendócrina, da atividade motora, de funções cardiovascular e respiratória, regulação da temperatura, comportamento de ingesta alimentar, responsividade ao estresse e regulação da dor (Fallon e Leslie 1986; Bruijnzeel et al., 2009; Wee e Koob, 2010). O receptor κ opióide, o qual tem como ligante endógeno a dinorfina, também parece estar envolvido nos mecanismos de reforço/recompensa a drogas de abuso. Agonistas deste receptor bloqueiam o efeito de reforço/recompensa da droga, possivelmente através de sua ação sobre a resposta aversiva/punitiva. A estimulação do receptor κ opióide inibe a liberação da dopamina no estriado. Por outro lado, evidências sugerem que o abuso de drogas promove ativação dos receptores κ opióides, fenômeno que pode ter um papel importante no aspecto motivacional da dependência em animais submetidos ao estresse (Bruijnzeel et al., 2009; Wee e Koob, 2010).

A dinorfina A distingue-se dos demais opióides endógenos por sua ação excitatória (e excitotóxica) neuronal mediada por receptores não-opioides. Diversos modelos de dor inflamatória ou neuropática, como aquelas induzidas pelo CFA, pela ligação do nervo espinal, dor de câncer ósseo, pancreatite crônica, hiperalgesia seguida da exposição prolongada à morfina ou nicotina, trauma espinal e artrite mostram-se associados a elevações regionais significativas da dinorfina A na medula espinal (para revisão ver: Malan et al., 2000; Gardell et al., 2004; Lai et al., 2008). A dinorfina A estimula a liberação de aminoácidos excitatórios de culturas neuronais (Skilling et al., 1992; Wang et al., 2001), induz o aumento de cálcio intracelular (Tang et al., 2000) e pode ser excitotóxica em altas doses (Hauser et al., 1999). Fragmentos da dinorfina reconhecidamente podem aumentar a liberação de CGRP de fibras aferentes primárias em preparações da medula espinal (Claude et al., 1999) e em culturas de DRG (Lai et al., 2001), bem como ativar PKC na medula espinal (Wang et al., 2001)

Dados da literatura confirmam a hipótese de que a dinorfina A espinal atua de maneira similar na tolerância a opióides e no dano neural. Tanto a administração central de agonistas μ opióides, quanto a lesão neural periférica, induz hiperalgesia mecânica e térmica,

diminuição na responsividade nociceptiva ao tratamento central com opióides (tolerância) e aumento na concentração de dinorfina espinhal. Em ambos os casos, a dinorfina parece atuar como mediador endógeno, promovendo o estado hiperalgésico e a tolerância ao opióides. A administração do antissor anti-dinorfina reverte estas alterações sensoriais (Vanderah et al., 2000).

O desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e térmica após a ligação do nervo espinhal foi bloqueada em animais nocautes para a PKC ϵ e animais 129S6 (que não desenvolvem tolerância a morfina). Nestas duas linhagens, os níveis de dinorfina espinhal não foram alterados pelo procedimento. Porém, os animais 129S6 desenvolviam hiperalgesia prolongada em resposta a uma única administração de dinorfina A (1-17). Estes resultados indicam que níveis espinais elevados de dinorfina A são importantes para a indução da hiperalgesia e que os animais 129S6, apesar de não apresentarem aumento dos níveis de dinorfina, possuem todos os mecanismos espinais que medeiam à resposta pró-nociceptiva à dinorfina A (Gardell et al., 2004).

Em 2005, Wu e colaboradores demonstraram que o antissor anti-dinorfina A (1-17), administrado pela via intratecal, era capaz de revelar a atividade anti-hiperalgésica de doses subefetivas de morfina na hiperalgesia mecânica induzida pela ligação parcial do nervo ciático.

Análises imunohistoquímicas do corno dorsal da medula espinhal de ratos demonstraram a co-localização da dinorfina A e pró-dinorfina com CGRP e SP, presentes principalmente nas fibras das lâminas I, II e V (Marvizón et al., 2009). Estes dados sugerem que a dinorfina está presente nas fibras aferentes nociceptivas, juntamente com outros mediadores nociceptivos, auxiliando no desenvolvimento da hiperalgesia e dor neuropática. Recentemente, Takeda e colaboradores (2010) demonstraram que, após a indução da dor inflamatória por CFA, estímulos nociceptivos ativam diferentes áreas do cérebro, mas que esse efeito não foi observado em animais nocautes para pró-dinorfina.

Diversos artigos atribuem o efeito nociceptivo da dinorfina à ativação de receptores NMDA, mais especificamente à subunidade NR2B (Tan-No et al., 2002). Além de atuar em receptores NMDA, a dinorfina A (2-17) também induz a fosforilação da proteína ativada por mitógeno p38 na medula espinhal e o aumento na concentração de PGE₂ no fluido cérebro espinhal (Svensson et al., 2005). A dinorfina e seus fragmentos parecem manter a dor neuropática também mediante a ativação dos receptores glutamatérgico NMDA (Tang et al., 1999). No presente estudo observamos que o antagonista do receptor NMDA, MK-801, foi capaz de impedir o desenvolvimento da hiperalgesia induzida

pela dinorfina administrada pela via subaracnóide. Porém, uma vez estabelecida a resposta hiperalgésica, no 3º dia, o receptor NMDA parece deixar de participar na manutenção desta resposta, visto que o bloqueio desse receptor não com o MK-801 não modifica mais o limiar nociceptivo dos animais. Portanto, outros receptores devem estar envolvidos na manutenção da hiperalgesia induzida por uma única administração de dinorfina A.

Curiosamente, o desenvolvimento de tolerância à ação antinociceptiva dos canabinóides é acompanhado pelo surgimento de hiperalgesia a agonistas canabinóides como o WIN 52,212-2, bem como pelo aumento na concentração de dinorfina espinhal. Estes efeitos são bloqueados pelo tratamento prévio com MK-801 ou antissoro para dinorfina A (1-13) (Gardell et al., 2002a). O tratamento com antissense para o receptor CB1 também promove hiperalgesia e aumenta os níveis espinhais de dinorfina A, efeitos que são prevenidos pela administração intratecal de MK-801 ou antissoro anti-dinorfina (Dogrul et al., 2002). Contudo, é importante ressaltar que a atividade antinociceptiva dos canabinóides não está correlacionada com os receptores κ opióides ou com a dinorfina espinhal, pois animais pré tratados com nor-BNI (antagonista seletivo do receptor κ opióide) não alterou a curva dose resposta do WIN 52,212-2 ou Δ^9 -tetra-hidrocannabinol em animais nocautes ou do tipo selvagem para a pró-dinorfina (Gardell et al., 2002b).

Uma avaliação das alterações de expressão de proteínas e RNAm para os receptores opióides (μ , δ e κ) e para os precursores dos peptídeos opióides (pró-opiomelanocortina, pró-encefalina e pró-dinorfina), em modelos de dor inflamatória e neuropática, revela diferenças entre os mecanismos envolvidos na indução da resposta nociceptiva em cada condição. Com exceção do aumento na transcrição dos receptores μ no 14º dia após a indução de hiperalgesia por CFA, nenhuma alteração foi observada na transcrição dos receptores opióides neste modelo inflamatório. Já na hiperalgesia induzida pela constrição no nervo ciático, observa-se uma redução na transcrição de todos os receptores opióides, acompanhado da redução na expressão dos receptores κ no 14º dia após a constrição. Esta redução dos receptores κ contrasta com o aumento tanto nos níveis da proteína quanto de RNAm para dinorfina (Obara et al., 2009). A redução do receptor κ opióide pode ser uma das explicações pelas quais não observamos nenhuma alteração do limiar nociceptivo ao utilizarmos os antagonistas dos receptores opióides naloxona (que não é seletivo, mas atua preferencialmente sobre receptor μ) e nor-BNI (seletivo para receptor κ).

Outra justificativa para o resultado é que, em maiores concentrações, a dinorfina esteja atuando em receptores B_1 e B_2 para cininas no complexo sensorial trigeminal para produzir seu efeito hiperalgésico.

Reforçando esta hipótese, resultados em cultura de células do DRG e F-11 (neuroblastoma de camundongos) demonstraram que a administração de HOE-140 foi capaz de bloquear o influxo de cálcio causado pela dinorfina e, quando administrado pela via intratecal, o mesmo produziu inibição significativa da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela dinorfina A (2-13). Já o DALBK foi capaz de reduzir significativamente apenas a hiperalgesia térmica. Corroborando os dados farmacológicos, animais nocautes para o receptor B_2 ou para a pró-dinorfina não desenvolvem resposta hiperalgésica à dinorfina A (2-13). Este conjunto de resultados sugere que o receptor B_2 , assim como altos níveis de dinorfina, são necessários para a manutenção da hiperalgesia em modelos neuropáticos (Lai et al., 2006). Por fim, a demonstração de que a dinorfina A desloca a ligação da bradicinina e calidina radioativas de seus sítios específicos de ligação em tecidos cerebrais, assim como em linhagens celulares que expressam endogenamente os receptores B_1 e B_2 com afinidade moderada ($\sim 1 \mu\text{M}$) constitui evidência expressiva de que a dinorfina atua ativando diretamente receptores para cininas (Lai et al., 2008).

Nossos resultados demonstram que o tratamento diário com HOE-140 foi capaz de retardar o surgimento da hiperalgesia em resposta à injeção intratecal de dinorfina, mas que o mesmo já deixou de promover qualquer alteração do limiar nociceptivo a partir do 3º dia. Estes achados sugerem que o receptor B_2 para cininas tem participação apenas no desenvolvimento inicial da resposta hiperalgésica induzida pela dinorfina A (1-17). Por sua vez, o tratamento diário com DALBK foi capaz de promover um bloqueio mais efetivo da resposta hiperalgésica à dinorfina A (1-17), inclusive abolindo a hiperalgesia por completo a partir do 3º dia de administração, evidenciando uma maior participação do receptor B_1 tanto na instalação quanto na manutenção da hiperalgesia.

Se modelos experimentais de neuropatia induzem aumento nos níveis espinais de dinorfina A, que, por sua vez, atua sobre receptores B_1 e B_2 para cininas para induzir alterações nociceptivas, consideramos que seria oportuno avaliar a participação da dinorfina na promoção da hiperalgesia orofacial associada ao modelo de constrição do nervo infraorbital. Neste sentido, observamos que o tratamento dos animais com antissor anti-dinorfina A, no 5º dia após a cirurgia, foi capaz de reduzir de maneira significativa a hiperalgesia térmica ao calor por até 2

h após sua administração. Como controle positivo, realizamos ainda o tratamento prévio dos animais com o antissoro anti-dinorfina A e verificamos que o mesmo bloqueou o desenvolvimento da resposta hiperalgésica à dinorfina A.

Depois da ligação do nervo espinhal, tanto camundongos nocautes para pró-dinorfina como os do tipo selvagem apresentam sinais de dor neuropática no 2º dia após a cirurgia, sugerindo que o desenvolvimento da hiperalgesia pós-operatória não depende da dinorfina. Por outro lado, camundongos do tipo selvagem exibem um aumento significativo nos níveis de dinorfina no 10º dia após a cirurgia similar aos observados em ratos (Wang et al., 2001; Malan et al., 2000), que se correlaciona à presença de dor neuropática sustentada. Além disso, neste mesmo período, animais nocautes para pró-dinorfina apresentam uma completa recuperação da sensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos, demonstrando a importância da dinorfina para a manutenção da dor neuropática. O tratamento com antissoro anti-dinorfina A, pela via intratecal, no 14º dia (mas não no 2º dia) após a cirurgia também reverteu à resposta hiperalgésica de animais do tipo selvagem. Já o tratamento com MK-801, pela mesma via, reduziu a hiperalgesia em ambos os períodos avaliados (2º e 14º dia após a cirurgia) (Wang et al., 2001). Estes dados sugerem que mecanismos diferentes estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, e que a dinorfina estaria envolvida apenas na fase tardia da resposta hiperalgésica. Porém, os nossos resultados obtidos no modelo de constrição do nervo infraorbital são contrários a esta hipótese, pois o pré-tratamento com o antissoro anti-dinorfina mostrou-se capaz de bloquear o desenvolvimento da resposta hiperalgésica induzida pelo procedimento.

A dor neuropática é uma dor crônica que acomete milhares de pessoas e segue sem possuir um tratamento farmacológico totalmente satisfatório. Na maioria das vezes, a medicação utilizada serve apenas para melhorar a qualidade de vida do paciente através do tratamento de sintomas associados à neuropatia como insônia, ansiedade e depressão. A neuralgia do trigêmeo, apesar de acometer um número reduzido de pessoas (cerca de 4 a cada 100.000 pessoas; Oliveira et al., 2009), traz grande desconforto e perda da qualidade de vida para a pessoa acometida por ela. A carbamazepina, fármaco de primeira escolha para a neuralgia do trigêmeo, nem sempre é bem tolerada pelos pacientes. Outras classes de fármacos são indicadas para o seu tratamento, porém nem todos os pacientes respondem bem ao tratamento crônico. Intervenções cirúrgicas podem constituir alternativas não

farmacológicas de tratamento. Porém, como a neuralgia do trigêmeo acomete principalmente pessoas mais velhas e a cirurgia pode ocasionar perda de sensibilidade na região afeta, meningites e em alguns casos risco de morte, nem sempre tais intervenções são desprovidas de risco.

A comunidade científica tem questionado nos últimos anos a validade dos modelos experimentais utilizados na triagem de novas terapias farmacológicas, pois muitas substâncias promissoras em pesquisas pré-clínicas não passam das fases iniciais em ensaios clínicos. No entanto, é inquestionável o avanço científico dos últimos anos, principalmente no que tange o conhecimento dos mecanismos celulares e bioquímicos envolvidos na plasticidade neuronal da dor neuropática. A busca por novas alternativas farmacológicas para o tratamento da dor neuropática, dentre elas a neuralgia do trigêmeo, continua sendo um dos principais objetivos para pesquisadores da área. Nesse sentido, a demonstração da eficácia de fármacos utilizados na clínica em animais experimentais (como os utilizados neste trabalho) contribui para a validação do modelo a ser utilizado na avaliação pré-clínica de potenciais novos alvos terapêuticos, como, por exemplo, antagonistas de receptores B_1 e B_2 para cininas. Os resultados do presente estudo destacam a eficácia do antagonista para o receptor B_1 (Ver detalhes Tabela 1).

Tabela 1: Influência dos diferentes tratamentos em diferentes períodos da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos Swiss. Os símbolos ↓ e - indicam redução ou sem alteração, respectivamente.

| TRATAMENTO | RESPOSTA HIPERALGÉSICA AOS DIFERENTES ESTÍMULOS APÓS CNIO | | | | | |
|---------------|---|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Calor (Fase inicial) | Calor (Fase final) | Frio (Fase inicial) | Frio (Fase final) | Mecânico (Fase inicial) | Mecânico (Fase final) |
| Carbamazepina | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Gabapentina | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - | - |
| Morfina | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| Indometacina | ↓ | - | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| DALBK | ↓ | - | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| HOE-140 | ↓ | - | ↓ | ↓ | ↓ | - |

No presente projeto, além de padronizar em camundongos um modelo de neuralgia do trigêmeo descrito previamente para ratos, demonstramos a participação dos receptores B_1 e B_2 para cininas nas alterações da reatividade nociceptiva orofacial associadas ao modelo de constrição do nervo infraorbital. Por meio de ferramentas

farmacológicas e imunológicas, observamos ainda o envolvimento da dinorfina A na hiperalgesia térmica ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital por interação, principalmente, com o receptor B_1 , mas ainda e em menor grau com o receptor B_2 para cinina e receptor do tipo NMDA para glutamato. Os possíveis mecanismos pelos quais a dinorfina A e os receptores para cininas participam do desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia orofacial induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos são ilustrados na Figura 26.

Figura 26: Esquema dos possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia orofacial induzida pela constrição do nervo infraorbital em camundongos. O PAINEL A (página ao lado) sugere que, em condições normais, a dinorfina presente em interneurônios do complexo trigeminal estimule receptores opióides localizados em neurônios trigeminais de primeira ordem, limitando a resposta à estimulação nociva, através de ativação indireta de canais retificadores de potássio acoplados a proteína G e inibição de canais de cálcio sensíveis à voltagem (como descrito por Lai et al., 2001). De acordo com os resultados observados no presente estudo, o PAINEL B (página ao lado) exemplifica as possíveis vias pelas quais a dinorfina A possa exercer a sua ação hiperalérgica. Após a constrição do nervo infraorbital, a estimulação nociceptiva persistente promovida pela liberação de mediadores como a bradicinina (aliado ao possível aumento do influxo de cálcio no interneurônio inibitório) induz a superexpressão da dinorfina A em interneurônios do complexo trigeminal, que passam a liberá-la em grande quantidade, promovendo ativação excessiva de receptores B_1 e B_2 para cininas, mas principalmente do receptor B_1 . O sítio de ligação que medeia esses efeitos ainda é desconhecido. Porém, uma vez ativados os receptores de cininas ativam a fosfolipase C (PLC), com consequente formação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato A (IP3). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que por sua vez fosforila intracelularmente receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, contribuindo para o influxo de cálcio. Já o IP3, aumenta os níveis de cálcio intracelular, com consequente liberação de vesículas contendo neurotransmissores excitatórios como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (SP/CGRP), e interleucina 1β (IL- 1β). Uma vez liberada na fenda sináptica, a IL- 1β atua tanto em neurônios trigeminais pós-sinápticos (de segunda ordem), contribuindo para a excitabilidade neural juntamente com os outros neurotransmissores excitatórios, quanto em neurônios trigeminais pré-sinápticos (de primeira ordem), contribuindo para o aumento da expressão de receptores B_1 para cininas (via transcrição gênica) e consequente manutenção do aumento de excitabilidade neural.

Legenda:



7. CONCLUSÕES

- O modelo de neuralgia do trigêmeo induzida pela constrição do nervo infraorbital foi padronizado, com sucesso, em camundongos Swiss e C57Bl/6;
- Os efeitos do tratamento com fármacos comumente utilizados na clínica para tratamento da neuralgia do trigêmeo e com anti-inflamatório não esterooidal foram qualitativamente semelhantes ao que se observa na clínica, o que parece validar o modelo para o estudo de novas terapias farmacológicas em pacientes com esta condição;
- O tratamento com antagonistas dos receptores B_1 e B_2 para cininas demonstrou a participação de ambos os receptores no desenvolvimento e manutenção da resposta hiperalgésica orofacial induzida pela constrição do nervo infraorbital;
- Animais nocautes para os receptores B_1 e B_2 para cininas ou duplo nocaute corroboraram os resultados obtidos com ferramentas farmacológicas, visto que não apresentaram resposta hiperalgésica à constrição do nervo infraorbital;
- Uma única administração pela via subaracnóide de dinorfina A (1-17) foi capaz de induzir hiperalgesia térmica orofacial prolongada, a qual foi bloqueada pelo tratamento prévio com antagonistas dos receptores B_1 e B_2 para cininas e do receptor glutamatérgico NMDA. Apenas o antagonista para o receptor B_1 foi efetivo em reduzir a hiperalgesia sustentada induzida pela dinorfina A (1-17) ao ser administrado diariamente, o que sugere uma maior participação de mecanismos operados por este receptor na manutenção da hiperalgesia;
- O tratamento com o antissor anti-dinorfina A, no 5º dia após a cirurgia, foi capaz de reduzir significativamente a resposta hiperalgésica, demonstrando a participação da dinorfina A na manutenção da neuralgia do trigêmeo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, W.M., Scuri, M., Farmer, S.G. Peptide and non-peptide bradykinin receptor antagonists: role in allergic airway disease. *Eur. J. Pharm.*, 533: 215-21, 2006.

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.

Almeida, T.F., Roizenblatt, S., Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.*, 1000: 40-56, 2004.

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

Attal, N. e Finnerup, N.B. Pharmacological management of neuropathic pain. *Pain: Clinical Updates*, in *J. IASP.*, Vol. XVIII, Issue 9, 2010.

Austin, P.J. e Moalem-Taylor, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J. Neuroimmunol.*, 229: 26-50, 2010.

Baker, C.V. e Bronner-Fraser, M. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.*, 232: 1-61, 2001.

Barnes, P.J., Chung, F.K., Page, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.*, 550: 515-96, 1998.

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

Bennett, G.J. e Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v.33, n.1, p.87-107, 1988.

Bennetto, L., Patel, N.K., Fuller, G. Trigeminal neuralgia and its management. *B.M.J.*, 334: 201-205, 2007.

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.

Benoliel R, Eliav E, Tal M. Strain-dependent modification of neuropathic pain behaviour in the rat hindpaw by a priming painful trigeminal nerve injury. *Pain*, 97: 203-212, 2002.

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

Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 44: 1-80, 1992.

Blais, C., Marceau, F., Rouleau, J-L., Adam, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, 21: 1903-1940, 2000.

Bongenhielm, U., Nosrat, C.A., Nosrat, I., Ericksson, J., Fjell, J., Fried, K. Expression of sodium channel SNS/PN3 and ankyrin(G) mRNAs in the trigeminal ganglion after inferior alveolar nerve injury in the rat. *Exp. Neurol.*, 164: 384-95, 2000.

Bork, K., Yasothan, U., Kirkpatrick, P. Icatibant. *Nat. Ver. Drug. Discov.*, 7: 801-802 2008.

Borkowski, J.A., Hess, J.F. Effects of the bradykinin B₁ receptor antagonist des-Arg[Leu] bradykinin and genetic disruption of the B₂ receptor on nociception in rats and mice. *Pain*, 71: 89-97, 1997.

Botticelli, L.J., Cox, B.M., Goldstein, A. Immunoreactive dynorphin in mammalian spinal Cord and dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7783-7786, 1981.

Bruijnzeel, A.W. kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res. Rev.*, 62 (1): 127-146, 2009.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, 87: 1-5, 2000.

Campbell, D. J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35 (6): 784-791, 2003.

Canavero, S. e Bonicalzi, V. Drug therapy of trigeminal neuralgia. *Expert. Ver. Neurotherap.*, 6: 429-440, 2006.

Cassim, B., Mody, G., Bhoola, K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol. Ther.*, 94: 1-34, 2002.

Chaouloff, F., Kulikov, A., Sarrieau, A., Castanon, N., Mormède, P. Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system. *Brain Res.*, 693: 169-78, 1995.

Chen, S.L., Ma, H.I., Han, J.M., Lu, R.B., Tao, P.L., Law, P.Y., Loh, H.H. Antinociceptive effects of morphine and naloxone in mu-opioid receptor knockout mice transfected with the MORS196A gene. *J. Biomed. Sci.*, 20: 17-28, 2010.

Chen, J.J., Biswas, K. Small molecule bradykinin B1 receptor antagonists as potential therapeutic agents for pain. *Prog. Med. Chem.*, 46: 173-204, 2008.

Chichorro, J.G., Zampronio, A.R., Cabrini, D.A., Franco, C.R.C., Rae, G.A. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides*, 43: 133-142, 2009.

Chichorro, J.G., Zampronio, A.R., Era, G.A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp. Biol. Med.*, 231(6): 1136-1140, 2006b.

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

Chong, M.S. e Bajwa, Z.H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J. Pain Symptom Manage*, v.25, n.5 Suppl, p.S4-S11, 2003.

Chorilli, M., Michelin, D.C., Salgado, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 28: 11-23, 2007.

Civelli, O., Douglass, J., Goldstein, A., Herbert, E. Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82 (12): 4291-4295, 1985.

Coderre, T.J., Katz, J., Vaccarino, A.L., Melzack, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52: 259-285, 1993.

Couture, R. e Lindsey, C.J. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors, Part I*, vol. 16, pp. 241-300, 2000.

Couture, R., Harriison, M., Vianna, R.M., Cloutier, F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 161-176, 2001.

Craig, A.D. e Dostrovsky, J.O. Medulla to thalamus. In: Wall, P.D. e Melzack, R. (eds) *Textbook of pain*. Churchill Livingstone, Edinburgo. p.183-214, 1999.

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.

Cummins, T.R. e 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.

Debta, F.M., Ghom, A.G., Shah, J.S., Debta, P. A Comparative Study between Oxcarbazepine and Gabapentin Regarding Therapeutic Efficiency and Tolerability in the Treatment of Trigeminal Neuralgia. *J.I.A.O.M.R.*, 22 (1): 10-17, 2010.

Dogrul, A., Gardell, L.R., Ma, S., Ossipov, M.H., Porreca, F., Lai, J. 'Knock-down' of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain*, 100 (1-2): 203-209, 2002.

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

Draisci, G., Kajander, K.C., Dubner, R., Bennett, G.J., Iadarola, M.J. Upregulation of opioid gene expression in spinal cord evoked by experimental nerve injuries and inflammation. *Brain Res.*, 560: 186-192, 1991.

Dray, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75: 704-712, 1997.

Dubner, R. Neuronal plasticity and pain following peripheral tissue inflammation or nerve injury. *Proc. World Cong. Pain*, 6: 263-276, 1991.

Dworkin, R.H. e O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S.C., Stacey, B.R., Treede, R-D., Turk, D.C., Wallace, M.S. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*, 132: 237-251, 2007.

Erdős, E.G., Renfrew, A.G., Sloane, E.M., Wohler, J.R. Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 104: 222-35, 1963.

Ersahin, C., Simmons, W.H. Inhibition of both aminopeptidase P, and angiotensin-converting enzyme prevents bradykinin degradation in the rat coronary circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 30: 96-101, 1997.

Faden, A.I. Dynorphin increases extracellular levels of excitatory amino acids in the brain through a non-opioid mechanism. *J. Neurosci.*, 12: 425-429, 1992.

Fallon, J.H. e Leslie, F.M. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 249: 293-336, 1986.

Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M.A.S., Araújo, R.C., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B. Reduced nerve injury-induced neuropathic

pain in kinin B1 receptor knockout mice. *J. Neurosci.*, 25: 2405-2415, 2005.

Ferreira, J., Campos, M.M., Araújo, R., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology*, 43 (7): 1188-1197, 2002.

Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araújo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 41 (8): 1006-1012, 2001.

Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Poole, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1227-1231, 1993.

Fincham, C.I., Bressan, A., Paris, M., Rossi, C., Fattori, D. Bradykinin receptor antagonists – a review of the patent literature 2005 - 2008. *Expert Opin. Ther. Patents*, 19 (7): 919-941, 2009.

Finnerup, N.B. e Jensen, T.S. Spinal cord injury pain-mechanisms and treatment. *Eur. J. Neurol.*, 11: 73-82, 2004.

Finnerup, N.B., Sindrup, S.H., Jensen, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*, 150: 573-81, 2010.

Fischer, L., Parada, C.A., Tambeli, C.H. (2005). A novel method for subarachnoid drug delivery in the medullary region of rats. *J. Neurosci. Meth.*, 148: 108-112.

Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*, 109: 150-61, 2004.

Fried, K., Bongenhielm, U., Boissonade, F., Robinson, P.P. The trigeminal system and facial pain. *Neuroscientist*, 7: 155-65, 2001.

Galvão, A.C.R. *Dor Neuropática: Tratamento com Anticonvulsivantes*. Instituto Simbidor. Segmento Farma, p. 10, São Paulo, 2005.

Gardell, L.R., Ibrahim, M., Wang, R., Wang, Z., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Porreca, F., Lai, J. Mouse strains that lack spinal dynorphin upregulation after peripheral nerve injury do not develop neuropathic pain. *Neurosci.*, 123 (1): 43-52, 2004.

Gardell, L.R., Burgess, S.E., Dogrul, A., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Lai, J., Porreca, F. Pronociceptive effects of spinal dynorphin promote cannabinoid-induced pain and antinociceptive tolerance. *Pain*, 98: 79-88, 2002a.

Gardell, L.R., Wang, R., Burgess, S.E., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Lai, J., Porreca, F. Sustained morphine exposure induces a spinal dynorphin-dependent enhancement of excitatory transmitter release from primary afferent fibers. *J. Neurosci.*, 22: 6747-6755, 2002b.

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

Gomes-Arguelles, J.M., Dorado, R., Sepulveda, J.M., Herrera, A., Arrojo, F.G., Aragón, E., Huete, C.R., Terrón, C., Anciones, B. Oxcarbamazepine monotherapy in carbamazepine-unresponsive trigeminal neuralgia. *J. Clin. Neurosci.*, 15: 516-519, 2008.

Grace, P.M., Rolan, P.E., Hulchinson, M.R. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. *Brain Behav. Immun.*, Apr. 7, 2011. doi:10.1016/j.bbi.2011.04.003

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.

Griffis, C.A., Compton, P., Doering, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Biol Res Nurs.*, 7: 297-312, 2006.

Haanpää, M., Treede, R-D. Diagnosis and classification of neuropathic pain. *Pain: Clinical Updates*, in *J. IASP.*, Vol. XVIII, Issue 7, 2010.

Hauser, K.F., Foldes, J.K., Turbek, C.S. Dynorphin A (1-13) neurotoxicity in vitro: opioid and non-opioid mechanisms in mouse spinal cord neurons. *Exp. Neurol.*, 160: 361-375, 1999.

Hargreaves, K.M. Orofacial Pain. *Pain*, 152: S25-S32, 2011.

Hayashi, R., Yamashita, N., Matsui, S., Maruyama, M., Sugiyama, E., Sugiyama, S. Bradykinin stimulates interleukin-8 production by human lung fibroblasts. *Immunology*, 95: 507-511, 1998.

Herrero, J.F., Laird, J.M.A., Lopez-Garcia, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog. Neurobiol.*, 61: 169-203, 2000.

Hunt, S.P. e Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Neurosci.*, 2: 83-91, 2001.

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.

Ji, R.R. e Strichartz, G. Cell signaling and the Genesis of Neuropathic Pain. *Science*, 252: 1-19, 2004.

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

Julius, D. e Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.

Kajander, K.C., Sahara, Y., Iadarola, M.J., Bennett, G.J. Dynorphin increases in the dorsal spinal cord in rats with a painful peripheral neuropathy. *Peptides*, 11: 719-728, 1990.

Kanemitsu, Y., Hosoi, M., Zhu, P.J., Weight, F.F., Peoples, R.W., McLaughlin, J.S., Zhang, L. Dynorphin A inhibits NMDA receptors through a pH-dependent mechanism. *Mol. Cell. Neurosci.*, 24 (3): 525-37, 2003.

Kang, D.S., Ryberg, K., Mörgelin, M., Leeb-Lundberg, L.M. Spontaneous formation of a proteolytic B1 and B2 bradykinin receptor complex with enhanced signaling capacity. *J. Biol. Chem.*, 279 (21): 22102-2207, 2004.

Khasar, S.G., Miao, F.J., Levine, J.D. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtypes of bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci.*, 69: 685-690, 1995.

Kim, S. H. e Chung, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 50 (3): 355-63, 1992.

King, T., Vera-Portocarrero, L., Gutierrez, T., Vanderah, T.W., Dussor, G., Lai, J., Fields, H.L., Porreca, F. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat. Neurosci.*, 12 (11): 1364-1346, 2009.

Kleef, M.V., Genderen, W.E.V., Narouze, S., Nurmikko, T.J., Zundert, J.V., Geurts, J.W., Mekhail, N. Trigeminal Neuralgia. *Evidence Based Medicine. Pain Practice*, 9: 252-259, 2009.

Kniffki, K.D. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neurosci.*, 83: 949-959, 1998a.

Kohno, T., Wang, H., Amaya, F., Brenner, G.J., Cheng, J.K., Ji, R.R., Woolf, C.J. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *J. Neurosci.*, 28 (17): 4533-4540, 2008.

Koltzenburg, M., Wall, P.D., McMahon, S.B. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci.*, 22: 122-127, 1999.

Komagata, S., Chen, S., Suzuki, A., Yamashita, H., Hishida, R., Maeda, T., Shibata, M., Shibuki, K. Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. *J. Neurosci.*, 31: 4896-905, 2011.

Koyama, T. e Fukuda, k. Involvement of the *j*-opioid receptor in nitrous oxide-induced analgesia in mice. *J. Anesth.*, 24: 297–299, 2010.

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

LaBuda, C.J. e Little, P.J. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J. Neurosci. Methods.*, 144: 175-81, 2005.

Lai, J., Luo, M.C., Chen, Q., Porreca, F. Pronociceptive actions of dynorphin via bradykinin receptors. *Neurosci. Lett.*, 437 (3): 175-9, 2008.

Lai, J., Luo, M.G., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Porreca, F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nature Neurosci.*, 9: 1534-1540, 2006.

Lai, J., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Porreca, F. Neuropathic Pain: The paradox of Dynorphin. *Mol. Interv.*, 1 (3): 160-167, 2001.

Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., Van Den Maagdenberg, A.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D., Mogil, J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods*, 7(6): 447-449, 2010.

Laughlin, T. M., Vanderah, T.W., Lashbrook, J., Nichols, M. L., Ossipov, M., Porreca, F., Wilcox, G. Spinally administered dynorphin A produces long-lasting allodynia: involvement of NMDA but not opioid receptors. *Pain*, 72: 253–260, 1997.

Lawson, K.P., Nag, S., Thompson, A.D., Mokha, S.S. Sex-specificity and estrogen-dependence of kappa opioid receptor-mediated antinociception and antihyperalgesia. *Pain*, 151 (3): 806-15, 2010.

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.

Lemos, L., Flores, S., Oliveira, P. Gabapentin supplemented with ropivacain block of trigger points improves pain control and quality of life in trigeminal neuralgia patients when compared with gabapentin alone. *Clin. J. Pain*, 24: 64-75, 2008.

Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216-226, 2008.

Levy, D., Hoke, A., Zochodne, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, 260: 207-209, 1999.

Levy, D. e Zochodne, D.W. Involvement of bradykinin and its B₂ receptor in thermal hyperalgesia following partial peripheral nerve injury. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 23: 165, 1997.

Liu, X., Eschenfelder, S., Blenk, K.H., Janig, W., Habler, H. Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain*, 84: 309-318, 2000.

Loeser, J.D. e Treede, R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137: 473-477, 2008.

Love, S. e Coakham, H.B. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. *Brain*, 124: 2347-2360, 2001.

Luiz, A.P., Schroeder, S.D., Chichorro, J.G., Calixto, J.B., Zampronio, A.R., Rae, G.A. Kinin B1 and B2 receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides*, 44 (2): 87-92, 2010.

Luo D.Z. Mechanistic dissection of pain: from DNA to animal models. In: *Methods in Molecular Medicine*. 99: 1-10, 2004.

Luo, M.C., Chen, Q., Ossipov, M.H., Rankin, D.R., Porreca, F., Lai, J. Spinal dynorphin and bradykinin receptors maintain inflammatory hyperalgesia. *J. Pain*, 9: 1096-105, 2008.

McKelvy, A.D., Mark, T.R., Sweitzer, S.M. Age- and sex-specific nociceptive response to endothelin-1. *J. Pain*, 8 (8): 657-66, 2007.

McMahon, S.B. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 351: 431-440, 1996.

Malan, T.P., Ossipov, M.H., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai, J., Porreca, F. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerveinjured rats. *Pain*, 86: 185-194, 2000.

Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., Lu, J., Hayes, R.L. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.*, 576: 254-262, 1992.

Marceau, F. e Regoli, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3 (10): 845-852, 2004.

Marinova, Z., Vukojevic, V., Surcheva, S., Yakovleva, T., Cebers, G., Pasikova, N., Usynin, I., Hugonin, L., Fang, W., Hallberg,

M., Hirschberg, D., Bergman, T., Langel, U., Hauser, K.F., Pramanik, A., Aldrich, J.V., Gräslund, A., Terenius, L., Bakalkin, G. Translocation of dynorphin neuropeptides across the plasma membrane. A putative mechanism of signal transmission. *J. Biol. Chem.*, 280 (28): 26360-70, 2005.

Marinova, Z., Yakovleva, T., Meltzig, M., Hallberg, M., Nylander, I., Ray, K., Rodgers, D.W., Hauser, K.F., Ekstrom, T.J., Bakalkin, G. A novel soluble protein factor with non-opioid dynorphin A-binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 321: 202–209, 2004.

Marvizón, J.C., Chen, W., Murphy, N. Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *J. Comp. Neurol.*, 517 (1): 51-68, 2009.

Mascaro, M.B., Souza, M.R., Picoli, L.C., Prosdócimi, F.C. O complexo trigeminal e as desordens da motricidade mandibular. *ConScientiae Saúde*, 7 (4) 449-456, 2008.

Meini, S., Maggi, C.A. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm. Res.*, 57: 351-61, 2008.

Mizumura, K., Sugiura, T., Katanosaka, K., Banik, R.K., Kozaki, Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp. Brain Res.*, 196: 53-65, 2009

Moalem, G. e Tracey, D.J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.*, 51: 240-264, 2006.

Mogil, J.S., Davis, K.D., Derbyshire, S.W. The necessity of animal models in pain research. *Pain*, 151 (1): 12-7, 2010.

Mombouli, J.V., Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction from physiology to therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31: 61-74, 1999.

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

Novák, P., Zachařová, G., Soukup, T. Individual, age and sex differences in fiber type composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat strains. *Physiol. Res.*, 59 (5): 783-801, 2010.

Nurmikko, T.J. e Eldridge, P.R. Trigeminal neuralgia: pathophysiology, diagnosis and current treatment. *Br. J. Anaesth.*, 87: 117-132, 2001.

O'Connor, A.B. e Dworkin, R.H. Treatment of Neuropathic pain: An overview of recent guidelines. *Am. J. Med.*, 122 (10 Suppl.): S22-32, 2009.

Oliveira, C.M.B., Baaklini, L.G., Issy, A.M., Sakata, R.K. Neuralgia do trigêmeo bilateral: relato de caso. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, 59: 476-480, 2009.

Ong, K.S. e Keng, S.B. Evaluation of surgical procedures for trigeminal neuralgia. *Anesth. Prog.* 50: 181-188, 2003.

Pan, Z.K., Ye, R.D., Christiansen, S.C., Jagels, M.A., Bokoch, G.M., Zuraw, B.L. Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1 β gene expression in cultured human epithelial cells. *J. Immunol.*, 160: 3038-3045, 1998.

Petcu, M., Dias, J.P., Ongali, B., Thibault, G., Neugebauer, W., Couture, R. Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int. Immunopharmacol.*, 8 (2): 188-196, 2008.

Perkins, M.N., Campbell, E., Dray, A. Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹[Leu⁸]-BK and HOE-140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain*, 53: 191-197, 1993.

Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Silva, J.A. Jr., Walther, T., Oliveira, S.M., Pesquero, J.L., Paiva, A.C., Calixto, J.B., Lewin, G.R., Bader, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (14): 8140-8145, 2000.

Petersen, M., Segond von Banchet, G., Heppelmann, B., Koltzenburg, M. Nerve growth factor regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75. *Neurosci.*, 83: 161-168, 1998.

Polgár, E., Campbell, A.D., MacIntyre, L.M., Watanabe, M., Todd, A.J. Phosphorylation of ERK in neurokinin 1 receptor-expressing neurons in laminae III and IV of the rat spinal dorsal horn following noxious stimulation. *Mol. Pain*, 3: 4, 2007.

Quesada, G.A.T., Baptista, C.E., Pedroso, D.S., Flores, D.L. Trigeminal Neuralgia – from diagnosis to treatment. *Revista Dentística on line*, Ano 5, n: 11, 2005.

Quintão, N.L.M., Passos, G.F., Medeiros, R., Paszcuk, A.F., Motta, F.L., Pesqueiro, J.B., Campos, M.M., Calixto, J.B. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J. Neurosci.*, 28: 2856-2863, 2008.

Robinson, P.P., Boissonade, F.M., Loescher, A.R., Smith, K.G., Yates, J.M., Elcock, C., Bird, E.V., Davies, S.L., Smith, P.L., Vora,

A.R. Peripheral mechanisms for the initiation of pain following trigeminal nerve injury. *J. Orofac. Pain*, 18: 287-92, 2004.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, 156: 261-73, 1949.

Rodrigues-Filho, R., Santos, A.R., Bertelli, J.A., Calixto, J.B. Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: a new model for the study of neuropathic pain. *Brain Res.*, 982 (2): 186-94, 2003.

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

Rupniak, N.M., Boyce, S., Webb, J.K., Williams, A.R., Carlson, E.J., Hill, R.G.,

Sawynok, J. e Liu, X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.*, 69: 313-340, 2003.

Sahebgharani, M., Hossein-Abad, A.A., Zarrindast, M.R. On the mechanism of carbamazepine-induced antinociception in the formalin test. *Int. J. Neurosci.*, 116: 1097-1113, 2006.

Schwarzer, C. 30 years of dynorphins - New insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 123: 353-370.

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

Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43 (2): 205-218, 1990.

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.

Silberring, J. e Nyberg, F. A novel bovine spinal cord endoprotease with high specificity for dynorphin B. *J. Biol. Chem.*, 264: 11082-6, 1989.

Silberring, J., Castello, M.E., Nyberg, F. Characterization of dynorphin Aconverting enzyme in human spinal cord. An endoprotease

related to a distinct conversion pathway for the opioid heptadecapeptide? *J. Biol. Chem.*, 267: 21324–8, 1992.

Silberring, J., Demuth, H-U., Brostedt, P., Nyberg, F. Inhibition of dynorphin converting enzymes from human spinal cord by N-peptidyl-O-acyl hydroxylamines. *J. Biochem.*, 114: 648–51, 1993.

Skilling, S.R., Harkness, D.H., Larson, A.A. Experimental peripheral neuropathy decreases the dose of substance P required to increase excitatory amino acid release in the CSF of the rat spinal Cord. *Neurosci. Lett.*, 139: 92–96, 1992.

Sufka, K.J., Roach, J.T. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists in rats. *Pain*, 66: 99-103, 1996.

Svensson, C.I., Hua, X.Y., Powell, H.C., Lai, J., Porreca, F., Yaksh, T.L. Prostaglandin E2 release evoked by intrathecal dynorphin is dependent on spinal p38 mitogen activated protein kinase. *Neuropeptides*, 39: 485-94, 2005.

Taketa, Y., Niikura, K., Kobayashi, Y., Furuya, M., Shimizu, T., Narita, M., Imai, S., Kuzumaki, N., Maitani, Y., Yamazaki, M., Inada, E., Iseki, M., Suzuki, T., Narita, M. Direct evidence for the ongoing brain activation by enhanced dynorphinergic system in the spinal cord under inflammatory noxious stimuli. *Anesthesiology*, 112 (2): 418-431, 2010.

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: 172-180, 2000.

Tang, Q., Lynch, R.M., Porreca, F., Lai, J. Dynorphin A elicits an increase in intracellular calcium in cultured neurons via a non-opioid, non-NMDA mechanism. *J. Neurophysiol.*, 83: 2610-2615, 2000.

Tan-No, K., Esashi, A., Nakagawasai, O., Niijima, F., Tadano, T., Sakurada, C., Sakurada, T., Bakalkin, G., Terenius, L., Kisara, K. Intrathecally administered big dynorphin, a prodynorphin-derived peptide, produces nociceptive behavior through an *N*-methyl-d-aspartate receptor mechanism. *Brain Res.*, 952: 7–14, 2002.

Tan-No, K., Ohshima, K., Taira, A., Inoue, M., Niijima, F., Nakagawasai, O., Tadano, T., Nylander, I., Silberring, J., Terenius, L., Kisara, K. Antinociceptive effect produced by intracerebroventricularly administered dynorphin A is potentiated by p-hydroxymercuribenzoate or phosphoramidon in the mouse formalin test. *Brain Res.*, 891: 274–280, 2001.

Tan-No, k., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Niijima, F., Sato, T., Satoh, S., Sakurada, S., Marinova, Z., Yakovleva, T., Bakalkin, G.,

Terenius, L., Tadano, T. Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain*, 113: 301–309, 2005.

Thun, J., Persson, A.K., Fried, K. Differential expression of neuronal voltage-gated sodium channel mRNAs during the development of the rat trigeminal ganglion. *Brain Research*, 1269: 11-22, 2009.

Tölle, T.R. Challenges with current treatment of neuropathic pain. *Eur. J. Pain, Supplements 4*: 161–165, 2010.

Tomasello, F., Alafaci, C., Angileri, F.F., Calisto, A., Salpietro, F.M. Clinical presentation of trigeminal neuralgia and the rationale of microvascular decompression. *Neurol. Sci.* 29 (Suppl 1): s191-195, 2008.

Tonussi, C.R. e Ferreira, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B₂ receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B₁ receptor-mediated nociception. *Eur. J. Pharmacol.*, 326: 61-65, 1997.

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., Laughlin, T., Lashbrook, J.M., Nichols, M.L., Wilcox, G.L., Ossipov, M.H., Malan, P.T., Porreca, F. Single intrathecal injections of dynorphin A or *des*-Tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. *Pain*, 68: 275-281, 1996.

Vellani, V., Zachrisson, O., McNaughton, P.A. Functional bradykinin B₁ receptors are expressed in nociceptive neurones and are upregulated by the neurotrophin GDNF. *J. Physiol.*, 560 (Pt 2): 391-401, 2004.

Vicent, T. e Martin, M.D. Ovarian hormones and pain response: A review of clinical and basic science studies. *Gender Medicine*, 6: 168-192, 2009.

Villa, G., Ceruti, S., Zanardelli, M., Magni, G., Jasmin, L., Ohara, P.T., Abbracchio, M.P. Temporomandibular joint inflammation activates glial and immune cells in both the trigeminal ganglia and in the spinal trigeminal nucleus. *Mol. Pain*, 6: 89-103, 2010.

Voogd, J., Nieuwenhuys, R., Van Dongen, P. A. M., Ten Donkelaar, H. J. Mammals. In: Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J., Nicholson, C. *The central nervous system of vertebrates*, v. 3, Springer, Berlin, p. 1637-2098, 1998.

Vos, B.P. e Maciewicz, R.J. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal

neuropathic pain. In: Besson, J.M., Guilbaud, G., editors. Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain, Amsterdam: Elsevier, pp. 147-158, 1991.

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.

Wagner, R. e Deleo, J.A. Pre-emptive dynorphin and *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonism alters spinal immunocytochemistry but not allodynia following complete peripheral nerve injury. *Neurosci.*, 72: 527-534, 1996.

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

Wang, Z., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., Hruby, V.J., Malan, T.P., Lai, J., Porreca, F. Pronociceptive actions of dynorphin maintain chronic neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 21: 279-286, 2001.

Wee, S. e Koob, G.F. The role of the dynorphin- κ opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology*, 210: 121-135, 2010.

Werner, M.F., Trevisani, M., Campi, B., André, E., Geppetti, P., Rae, G.A. Contribution of peripheral endothelin ETA and ETB receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Eur. J. Pain*, 14: 911-917, 2010.

Werner, M.F.P., Kassuya, C.A.L. Ferreira, J. Zamprônio, A.R. Calixto, J.B., Rae, G.A. Peripheral kinin B₁ and B₂ receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology*, 53: 48-57, 2007.

Wiffen, P.J., McQuay, H.J., Moore, R.A. Carbamazepine for acute and chronic pain. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD005451, 2005.

Wijnvoord, N., Albuquerque, B., Häussler, A., Myrczek, T., Popp, L., Tegeder, I. Inter-strain differences of serotonergic inhibitory pain control in inbred mice. *Mol. Pain*, 6: 70, 2010.

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

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

Woolf, C.J. e Costigan, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 7723-7730, 1999.

Woolf, C.J., Shortland, P., Reynolds, M., Ridings, J., Doubell, T., Caggeshall, R.E. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J. Comp. neurol.*, 360: 121-134, 1995.

Wu, H-E., Schwasinger, E.T., Hong, J-S., Tseng, L.F. Pretreatment with antiserum against dynorphin, substance P, or cholecystokinin enhances the morphine-produced anti-allodynia in the sciatic nerve ligated mice. *Neurosci. Letters*, 386: 46-51, 2005.

Xin, W.J., Gong, Q.J., Xu, J.T., Yang, H.W., Zang, Y., Zhang, T., Li, Y.Y., Liu, X.G. Role of phosphorylation of ERK in induction and maintenance of LTP of the C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn. *J. Neurosci. Res.*, 84: 934-943, 2006.

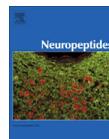
Xu, M., Aita M., Chavkin C. Partial infraorbital nerve ligation as model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural and glial reactions. *J. Pain*, 9: 1036-1048, 2008.

Zhang, L., Peoples, R.W., Oz, M., Harvey-White, J., Weight, F.F., Brauneis, U. Potentiation of NMDA receptor-mediated responses by dynorphin at low extracellular glycine concentrations. *J. Neurophysiol.*, 78: 582-590, 1997.

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

Zhou, X.F., Rush, R.A., McLachlan, E.M. Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *J. Neurosci.*, 16: 2901-2911, 1996.

Zochodne, D.W., Allison, J.A., Ho, W., Ho, L.T., Hargreaves, K., Sharkey, K.A. Evidence for CGRP accumulation and activity in experimental neuromas. *Am. J. Physiol.*, 268: H584-H590, 1995.



Special Issue on Peptide Receptors: Focus on Neuropeptides and Kinins

Kinin B₁ and B₂ receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats

Ana Paula Luiz^a, Samilla Driessen Schroeder^a, Juliana Geremias Chichorro^{a,b}, João Batista Calixto^a, Aleksander Roberto Zamprônio^b, Giles Alexander Rae^{a,*}

^aDepartment of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartment of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 14 November 2009

Keywords:
Kinins
Bradykinin
Kinin receptors
Orofacial hyperalgesia
Infraorbital nerve
Neuropathic pain
Nociception

ABSTRACT

Mechanisms coupled to kinin B₁ and B₂ receptors have been implicated in sensory changes associated to various models of neuropathy. The current study aimed to investigate if kinins also participate in orofacial thermal hyperalgesia induced by constriction of the infraorbital nerve (CION), a model of trigeminal neuropathic pain which displays persistent hypersensitivity to orofacial sensory stimulation, in rats and mice. Male Swiss mice (30–35 g) or Wistar rats (200–250 g; n = 6–10 per group in both cases) underwent CION or sham surgery and were submitted repeatedly to application of heat (~50 °C) to the ipsilateral or contralateral snout, delivered by a heat source placed 1 cm from the vibrissal pad. Decreases in latency to display head withdrawal or vigorous snout flicking were considered indicative of heat hyperalgesia. CION caused long-lasting heat hyperalgesia which started on Day 2 after surgery in both species and lasted up to Day 17 in mice and Day 10 in rats. Administration of DALBK or HOE-140 (peptidic B₁ and B₂ receptor antagonists, respectively; each at 3 nmol in 10 μl) onto the exposed infraorbital nerve of mice at the moment of surgery delayed the development of the thermal hyperalgesia. Systemic treatment on Day 5 (mice) or Day 4 (rats) with Des-Arg⁹, Leu⁸-Bradykinin (DALBK, B₁ receptor antagonist, 0.1–1 μmol/kg, i.p.) or HOE-140 (B₂ receptor antagonist, 0.001–1 μmol/kg, i.p.) transiently reduced heat hyperalgesia in both species. Due to the peptidic nature of DALBK and HOE-140, it is likely that their effects reported herein resulted from blockade of peripheral kinin receptors. Thus, mechanisms operated by kinin B₁ and B₂ receptors, contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by CION in both mice and rats. Perhaps kinin B₁ and B₂ receptor antagonists might constitute effective preventive and curative treatments for orofacial thermal hyperalgesia induced by nerve injury.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Kinins are endogenous peptides involved in various pathophysiological processes, such inflammation, increased vascular permeability, vasodilatation and pain. They are formed in plasma and tissues in response to infection, tissue trauma or inflammatory alterations (for review see Calixto et al., 2000). Once formed and released, kinins exert most of their biological effects by the activation of two G-protein-coupled receptors termed B₁ and B₂. The B₂ receptors are expressed constitutively in many peripheral tissues and in the CNS and exhibit higher affinity for bradykinin (BK) and Lys-BK peptides. On the other hand, B₁ receptors display high affinity for the respective metabolites of these peptides, specifically Des-Arg⁹-BK and Lys-Des-Arg⁹-BK. It is worth noting that B₁ receptors are usually not expressed under physiological conditions, but their expression levels may be quickly up-regulated in re-

sponse to several inflammatory stimuli and tissue injury (for reviews see Calixto et al., 2004; Campos et al., 2006).

It has been reported that patients with neuropathic pain present elevated serum levels of BK (Blair et al., 1998). Several studies have demonstrated the participation of kinins and their receptors in experimental models of neuropathic pain. Systemic administration of B₁ or B₂ receptor antagonists have been found to attenuate thermal hyperalgesia and mechanical allodynia induced by sciatic nerve constriction in rats and mice (Levy and Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003; Gougat et al., 2004; Ferreira et al., 2005). Moreover, sciatic nerve constriction also increases levels of B₁ and B₂ receptor mRNA or protein in dorsal root ganglia (DRG) in both species (Petersen et al., 1998; Levy and Zochodne, 2000; Yamaguchi-Sase et al., 2003; Rashid et al., 2004). More recently, our group reported that kinins contribute distinctly to the development of hyperalgesic states induced by partial ligation of the sciatic nerve (Ferreira et al., 2005), L5/L6 spinal nerve ligation in rats (Werner et al., 2007) and avulsion of the brachial plexus in mice (Quintão et al., 2008). However, the role of kinin receptors

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 9491/221; fax: +55 48 3337 5479.
E-mail address: garae@farmaco.ufsc.br (G.A. Rae).

in a model of orofacial neuropathic pain has never been investigated.

Branches of the trigeminal nerve are particularly vulnerable to damage during surgical procedures or maxillofacial injury. Such occurrences can inflict various forms of sensory disturbance in a significant proportion of patients, leading to the development of neuropathic pain (Becerra et al., 2006). Another form of neuropathic pain is trigeminal neuralgia, which is characterized by severe lancinating pain in orofacial regions innervated by the trigeminal nerve. None of the medical or surgical procedures currently available for treatment of the different forms of orofacial neuropathic pain provide reliable and permanent pain relief. In addition, substantial differences exist between the transmission and processing of nociceptive information by the trigeminal system, as compared to those operating in peripheral nerves innervating other body regions and in the spinal cord (for review see Sessle, 2000). Thus, a better understanding of the mechanisms underlying this condition is clearly warranted in order to develop new effective strategies of treatment.

To this effect, Vos and Maciewicz (1991) developed a rat model of constriction of the infraorbital nerve (CION) which shares many of the features manifested by humans suffering from trigeminal neuropathic pain, including spontaneous pain and hypersensitivity to tactile and thermal stimuli (Vos et al., 1994; Imamura et al., 1997; Chichorro et al., 2009). In light of these considerations, the current study aimed to assess and compare the contribution of signaling mechanisms operated by kinin B₁ and B₂ receptors to orofacial thermal hyperalgesia induced by CION in rats and mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted on male Swiss mice weighing 30–35 g and male Wistar rats weighing 200–250 g, supplied by the animal house of the UFSC. Animals were housed under controlled conditions of light (12 h light/dark cycle, lights on at 07:00 h) and temperature, (22 ± 2 °C), with free access to laboratory chow and tap water, for at least one week prior to use. The experimental procedures were previously approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the UFSC, where the study was carried out, and conducted in accordance with the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and Brazilian regulations on animal welfare. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. Upon conclusion of the experiments, the animals were promptly sacrificed by CO₂ asphyxia in an acrylic chamber.

2.2. Constriction of the infraorbital nerve

Constriction of the infraorbital nerve (CION) was produced by a slight modification of the method originally described, in rats, by Vos et al. (1994). Briefly, mice or rats were anesthetized with an intramuscular (i.m.) 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 1 (mice) and 3 mm (rats) caudal to the mystacial (vibrissal) pads. The superior lip elevator and anterior superficial masseter muscles were bluntly dissected to expose the rostral end of the infraorbital nerve, as it emerged from the infraorbital fissure. Special care was taken not to damage the facial nerve. Two silk 4-0 ligatures were then tied loosely and 2 mm apart around the infraorbital nerve and the wound was closed with additional silk sutures (4-0). Sham-operated animals were operated identically, but no ligatures were applied to the nerve. After surgery, all animals were treated with

oxytetracycline (200 mg/ml, i.m.) and maintained in a warm room until full recovery from anesthesia, before returning them to their housing quarters.

2.3. Measurement of thermal heat hyperalgesia

Thermal heat hyperalgesia of the orofacial area was measured essentially as previously described (Almeida et al., 2008), but adjusting heat intensity to provide baseline response latencies between 9 and 15 s. On each occasion, the animal was temporarily removed from its home cage and gently held by the experimenter, so that a radiant heat source could be positioned 1 cm from the surface of the vibrissal pad. The intensity of the thermal stimulus was adjusted so that it raised the temperature of the vibrissal pad skin to ~50 °C within 15 s. The latency to display either head withdrawal or vigorous flicking of the snout was recorded (in s) using a stopwatch, and a 20 s cut-off time was used to prevent tissue damage. Reductions in the response latency to heat stimulation were considered to be indicative of thermal hyperalgesia. In order to minimize the behavioral impact of constraint-induced stress, each animal was habituated to being held by the experimenter several times (but without application of the heat stimulus) over the 2 days which preceded estimations of baseline responsiveness to thermal stimulation. To establish the time-course of the CION-induced thermal hyperalgesia, the heat stimulus was applied to the ipsilateral or contralateral sides of sham-operated or nerve-injured CION animals on the day preceding surgery [to determine basal responsiveness (Pre); individual withdrawal/flicking latencies usually between 9 and 15 s] and then again on postoperative Days 2, 5, 10, 13, 17, 20 and 24. In the experiments designed to investigate the effects of drug treatments on CION-induced heat hyperalgesia, the heat stimulus was applied solely to the side ipsilateral to surgery.

2.4. Drug treatments

The involvement of kinin B₁ and B₂ receptors on heat hyperalgesia induced by CION was evaluated by treating mice or rats with DALBK or HOE-140 (selective peptidic B₁ or B₂ receptor antagonists, respectively), either by local instillation during surgery or systemically at different time points thereafter. When instilled at the moment of the surgical procedure, DALBK (3 nmol), HOE-140 (3 nmol) or vehicle (PBS solution) were delivered directly onto the exposed infraorbital nerve in a volume of 10 µl in mice only. Thermal hyperalgesia was then evaluated as described above on Days 5, 10, 13, 17 and 22 after surgery. Groups scheduled to receive systemic treatments were given an intraperitoneal (i.p.) injection of DALBK (0.1–1 µmol/kg), HOE-140 (0.001–1 µmol/kg) or vehicle (PBS solution, 1 ml/kg) either on Day 5 post surgery in mice or on Day 4 in rats, when CION-induced thermal hyperalgesia was already fully established. These animals were tested immediately prior to i.p. treatment (to evidence baseline hyperalgesia) and then at 30 min intervals for up to a maximum of 4 h after drug administration. The doses of DALBK and HOE-140 used in this study were chosen based on prior studies demonstrating their suitability to provide effective blockade of B₁ or B₂ receptor-mediated effects in vivo, either when applied locally on the nerve at the moment of surgery (Quintão et al., 2008) or when administered systemically (Werner et al., 2007).

2.5. Drugs and reagents

The following drugs and reagents were used: Phosphate-Buffered Saline (PBS, Sigma, St. Louis, MO), DALBK (Bachem, Torrance, CA); HOE-140 (icatibant, Sigma, St. Louis, MO); oxytetracycline (Terramicina®, Pfizer, Guarulhos, Brazil); Xylazine (Dopaser®, Calier

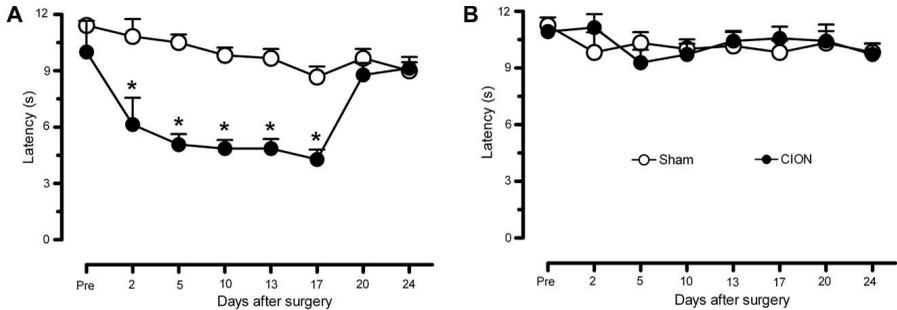


Fig. 1. Influence of CION on the response latency of mice to orofacial heat stimulation. The radiant heat stimulus was applied consecutively to the ipsilateral (A) or contralateral (B) vibrissal pad (relative to surgery) of CION-injured or sham-operated mice, until presentation of head withdrawal or vigorous snout flicking responses. Values represent means \pm SE mean of 6–10 mice, and were obtained 1 day before (Pre) and at the times indicated from Days 2 to 24 after surgery. $P < 0.05$ when compared to corresponding value of sham-operated animals (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Labs, São Paulo, Brazil) and ketamine (Dopalen[®], Sespo, Jacareí, Brazil). The stock solutions of the drugs were prepared in PBS in siliconized plastic tubes, stored at -18°C and diluted to the desired concentration just before use.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM of 6–10 animals for each experimental group. Statistical comparisons of the data were performed by two-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-test. P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Influence of CION on the response latency to orofacial heat stimulation in mice

As previously demonstrated in rats (Chichorro et al., 2009), CION also promoted substantial decreases in response latency to application of radiant heat to the snout in mice, as compared to responses of the sham-operated group. This thermal hyperalgesia achieved significance as early as Day 2 after CION surgery, lasted up to Day 17, and was restricted entirely to application of heat to the side ipsilateral to nerve injury (Fig. 1A and B).

3.2. Effects of DALBK and HOE-140 on CION-induced heat hyperalgesia in mice

To assess if kinins contribute to the development of CION-induced heat hyperalgesia, either DALBK (selective peptidic B_1 receptor antagonist, 3 nmol), HOE-140 (selective peptidic B_2 receptor antagonist, 3 nmol) or vehicle was delivered (in 10 μL) over the infraorbital nerve of mice during the surgical procedure. Both antagonists postponed the onset of hyperalgesia until Day 10 after surgery, relative to sham mice, unlike vehicle-treated CION mice which had already fully developed hyperalgesia by Day 5 (Fig. 2).

Mice treated i.p. with the DALBK (0.1–1 $\mu\text{mol/kg}$) or HOE-140 (0.01–1 $\mu\text{mol/kg}$) on Day 5 after CION surgery showed significant transient reductions in thermal hyperalgesia (Fig. 3A and B, respectively). The higher doses of DALBK and HOE-140 were more effective and presented longer lasting effects. Anti-hyperalgesic effects of DALBK at 1 $\mu\text{mol/kg}$ were observed 30, 60 and 180 min after administration, with a peak effect at 60 min (response latencies, in s: sham-vehicle 10 ± 0.4 , CION-vehicle 4.5 ± 0.2 , CION-DALBK

8 ± 1.1). Anti-hyperalgesic effects of HOE-140 at 1 $\mu\text{mol/kg}$ persisted from 90 to 180 min after administration, but the greatest effect was observed at 120 min after 0.1 $\mu\text{mol/kg}$ injection (response latencies, in s: sham-vehicle 9.5 ± 0.5 , CION-vehicle 4.3 ± 0.3 , CION-HOE-140 10.6 ± 0.6).

3.3. Effects of DALBK and HOE-140 on established CION-induced heat hyperalgesia in rats

CION rats treated i.p., on Day 4 after surgery, with DALBK (selective B_1 receptor antagonist, 0.1–1 $\mu\text{mol/kg}$) or HOE-140 (selective B_2 receptor antagonist, 0.001–0.1 $\mu\text{mol/kg}$) also showed transient attenuations of heat hyperalgesia (Fig. 4A and B, respectively). DALBK was only effective at 1 $\mu\text{mol/kg}$, which promoted anti-hyperalgesic effects at 30 and 60 min after administration.

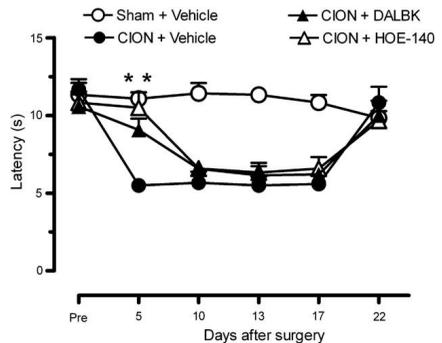


Fig. 2. Effect of kinin B_1 and B_2 receptor antagonist treatment on the development of CION-induced heat hyperalgesia in mice. During CION surgery, DALBK, HOE-140 (selective B_1 and B_2 receptor antagonist, respectively; each at 3 nmol), or vehicle (10 μL of PBS) was instilled onto the exposed infraorbital nerve immediately after ligature placement. Values represent reaction times to heat stimulation of the ipsilateral vibrissal pad, are means \pm SE mean of 6–10 mice per group and were obtained immediately before surgery (Pre) and at the days indicated following surgery. $P < 0.05$ when compared to corresponding value of CION-vehicle group (Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test). Values of sham-operated and CION-vehicle groups differ significantly throughout Days 5–17, but symbols were omitted for sake of clarity.

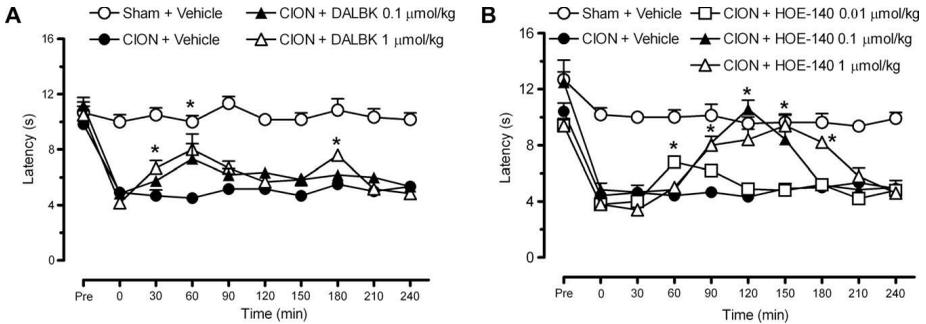


Fig. 3. Effect of kinin B_1 and B_2 receptor antagonist treatment on ongoing (i.e. established) CION-induced heat hyperalgesia in mice. On Day 5 after surgery, CION-injured mice received an i.p. injection of DALBK (selective B_1 receptor antagonist, 0.1–1 $\mu\text{mol/kg}$, A) or HOE-140 (selective B_2 receptor antagonist, 0.01–0.1 $\mu\text{mol/kg}$, B). Control CION-injured and sham-operated mice were treated with vehicle (PBS). Values represent reaction times to heat stimulation of the ipsilateral vibrissal pad, are means \pm SE mean of 6–10 mice per group and were obtained immediately before surgery (Pre), just prior to treatment on Day 5 (time 0) and at the time points indicated thereafter. $P < 0.05$ when compared to corresponding value of the CION-vehicle group (Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test). All values of sham-operated and CION-vehicle groups on Day 5 differ significantly, but symbols were omitted for sake of clarity.

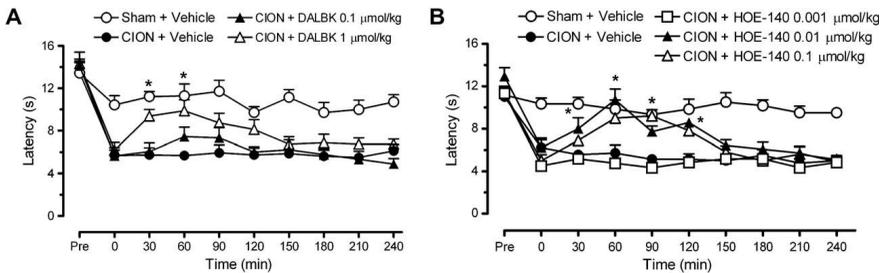


Fig. 4. Effect of kinin B_1 and B_2 receptor antagonist treatment on ongoing (i.e. established) CION-induced heat hyperalgesia in rats. On Day 4 after surgery, CION-injured rats received an i.p. injection of DALBK (selective B_1 receptor antagonist, 0.1–1 $\mu\text{mol/kg}$, A) or HOE-140 (selective B_2 receptor antagonist, 0.001–0.1 $\mu\text{mol/kg}$, B). Control CION-injured and sham-operated rats were treated with vehicle (PBS). Values represent reaction times to heat stimulation of the ipsilateral vibrissal pad, are means \pm SE mean of 6–10 rats per group and were obtained immediately before surgery (Pre), just prior to treatment on Day 4 (time 0) and at the time points indicated thereafter. $P < 0.05$ when compared to corresponding value of the CION-vehicle group (Two-way ANOVA, followed by Bonferroni's test). All values of sham-operated and CION-vehicle groups on Day 4 differ significantly, but symbols were omitted for sake of clarity.

On the other hand, HOE-140 reduced CION-induced hyperalgesia at both 0.01 and 0.1 $\mu\text{mol/kg}$. Significant anti-hyperalgesia was detected between 60 and 120 min after injection of either dose, but 0.01 $\mu\text{mol/kg}$ appeared to be more effective (response latencies at 60 min, in s: sham-vehicle 9.8 ± 0.9 , CION-vehicle 5.7 ± 0.7 , CION–HOE-140 10.7 ± 1.0) and also decreased hyperalgesia at 30 min.

4. Discussion

The current study represents, to our knowledge, the first report that CION, a model of trigeminal neuropathic pain originally developed in rats, also promotes long-lasting orofacial thermal hyperalgesia in mice. Moreover, it provides original evidence that this phenomenon is mediated to a significant extent by mechanisms coupled to kinin B_1 and B_2 receptors in both rats and mice.

The time-course for the development of CION-induced thermal hyperalgesia in mice was quite similar to that seen in rats (Chichorro et al., 2009). In both species, hyperalgesia starts on Day 2 following surgery, is restricted to the ipsilateral side and per-

sists for several days (up to Days 17 and 10 after surgery in mice and rats, respectively). In contrast, Imamura et al. (1997) described that rats submitted to CION developed bilateral orofacial thermal hyperalgesia, but that study employed a distinct surgical procedure, with access to the nerve through the roof of the mouth. Two recent studies also reported sensory alterations in the orofacial region resulting from injury to mice trigeminal nerve branches. The first (Xu et al., 2008) reported spontaneous facial grooming, persistent mechanical allodynia and morphological changes in the brainstem (i.e. cell proliferation and activation of astrocytes and microglia) as early as Day 1 after partial ligation of the infraorbital nerve. The second (Seino et al., 2009) showed that tight ligation of the mental nerve promoted a transient mechanical hyperalgesia 2–3 days after surgery, which was accompanied by increased substance P levels in the injured nerve. However, neither of these studies assessed the effectiveness of these procedures in establishing orofacial thermal hyperalgesia. On the other hand, it remains to be seen if CION can also promote orofacial mechanical and cold hyperalgesia in mice, and if their time-courses and laterality profiles are similar to those we previously established in rats (Chichorro et al., 2006a,b).

There is ample evidence that signaling via kinin B₁ and B₂ receptors is implicated in nociceptive alterations during inflammation and neuropathy. Most of the evidence stems from experiments using selective kinin receptor antagonists (Calixto et al., 2000; Ferreira et al., 2001). Concerning studies on thermal hyperalgesia in particular, rats with congenital deficiency in plasma kininogens develop less hind paw heat hyperalgesia in response to chronic constriction of the sciatic nerve (Yamaguchi-Sase et al., 2003). Also, systemic treatment of rats with DALBK or HOE-140 on Day 12 after spinal L5/L6 nerve ligation attenuated ongoing heat hyperalgesia of the ipsilateral hind paw (Werner et al., 2007). Another elegant study showed, in this same model, that hind paw thermal (and mechanical) hyperalgesia can be suppressed by intrathecal injections of DALBK and HOE-140, which strongly suggests that both antagonists display a central component of anti-hyperalgesic action (Lai et al., 2006). In mice, however, Ferreira et al. (2001, 2005) showed that only B₁ receptor activation is involved in the prolonged hind paw thermal hyperalgesia induced either by CFA (inflammatory stimulus) or by partial ligation of the sciatic nerve. Both studies proposed a shift in the balance of the kinin receptor population modulating heat sensitivity, in which B₂ receptors predominate over B₁ receptors to promote acute thermal hyperalgesia, whereas up-regulation of B₁ receptors, allied to down-regulation of B₂ receptors, perpetuates hyperalgesia in states of chronic inflammation and neuropathy.

The present study detected a significant delay in the onset of orofacial thermal hyperalgesia when DALBK or HOE-140 was instilled onto the exposed infraorbital nerve at the moment of CION surgery. Moreover, the systemic treatment with DALBK or HOE-140 markedly attenuated ongoing (i.e. established) heat hyperalgesia induced by CION in both rats and mice. Due to the peptidic nature of DALBK and HOE-140, it appears more likely that their effects reported herein resulted from blockade of peripheral kinin receptors. Altogether, these data indicate that mechanisms operated by B₁ and B₂ kinin receptors contribute to the development (at least in mice) and maintenance of CION-induced orofacial heat hyperalgesia (in both rodent species). It is interesting that, despite the various differences between the neurological substrates underlying nociceptive signaling generated in the trigeminal as compared to other peripheral nerves (Sessle, 2000), mechanisms coupled to kinin receptors contribute to the thermal hyperalgesia that follows nerve injury at both levels.

The central nervous system expresses appreciable concentrations of BK, allied to the presence of kinin receptors especially in the spinal cord, cerebellum, cortex, and hippocampus (Kariya et al., 1985; Fujiwara et al., 1989; Couture and Lindsey, 2000). In addition, partial sciatic nerve ligation and spinal L5/L6 nerve ligation increase kinin B₁ and B₂ receptor expression in DRG neurons (Petersen et al., 1998) or spinal nerves in rats (Werner et al., 2007), respectively. Partial sciatic nerve ligation was also associated with elevation in B₁ mRNA levels in plantar surface tissue, sciatic nerve, and spinal cord in mice (Ferreira et al., 2005); but levels of B₂ mRNA were not estimated, whereas spinal L5/L6 nerve ligation enhanced DRG levels of mRNA encoding both receptors in rats (Lai et al., 2006). However, avulsion of the brachial plexus, which promotes a state of persistent B₁ receptor-dependent and centrally-mediated hyperalgesia, is associated with an up-regulation of B₁ receptor mRNA levels in the spinal cord, as well as in hypothalamus, hippocampus, thalamus, and cortex (Quintão et al., 2008; again levels of B₂ mRNA were not estimated). Lai et al. (2006) reported that kinin B₁ and B₂ receptors can be activated directly by dynorphin A. More importantly, they found that intrathecal injection of dynorphin A promotes hyperalgesia which is sensitive to inhibition by HOE-140 (but not DALBK), and that neuropathic hyperalgesia induced by ligation of L5/L6 spinal nerves in rats is associated with an up-regulation of spinal levels of mRNA

encoding prodynorphin, but not those encoding kininogen, B₂ or B₁ receptors. In light of these observations, it must be noted that the involvement of either receptor in the promotion of heat hyperalgesia is not necessarily the same in all models of neuropathic pain. Additional experiments are necessary to determine the relative contribution of peripheral versus central kinin B₁ and B₂ receptors to CION-induced thermal hyperalgesia.

In conclusion, the current findings indicate that mechanisms operated by kinin B₁ and B₂ receptors can both contribute significantly to the enhancement of nociceptive responsiveness to orofacial heat stimulation of rodents submitted to CION. Further studies are required to determine the extent to which these kinin receptor-dependent signaling pathways modulating heat hyperalgesia are effective peripherally or centrally, as well as their potential contribution to mechanical and cold hyperalgesia in this model of trigeminal neuropathy. Perhaps kinin B₁ and B₂ receptor antagonists might constitute effective preventive and curative treatments for orofacial thermal hyperalgesia induced by nerve injury.

Acknowledgements

The study was supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (Fapescc), Programas Nacionais de Excelência (PRONEX) and Fundação Araucária. A.P.L., S.D.S. and J.G.C. were the recipients of CNPq doctoral, undergraduate and post-doctoral scholarships, respectively.

References

- Almeida, R.T., Perez, A.C., Francisci, J.N., Castro, M.S., Duarte, I.D.G., 2008. Opioidergic orofacial antinociception induced by electroacupuncture at acupoint ST36. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41, 621–626.
- Becerra, L., Morris, S., Bazes, S., Gostic, R., Sherman, S., Gostic, J., Pends, G., Moulton, E., Scrivani, S., Keith, D., Chizh, B., Borssok, D., 2006. Trigeminal neuropathic pain alters responses in CNS circuits to mechanical (brush) and thermal (cold and heat) stimuli. *J. Neurosci.* 26, 10646–10647.
- Blair, S.J., Chinthagada, M., Hoppenstedt, D., Kijowski, R., Fareed, J., 1998. Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. *Acta Orthop. Belg.* 64, 448–451.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Brain* 123, 1–5.
- Calixto, J.B., Medeiros, R., Fernandes, E.S., Ferreira, J., Cabrini, D.A., Campos, M.M., 2004. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.* 143, 803–818.
- Campos, M.M., Leal, P.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2006. Non-peptide antagonists for kinin B₁ receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 646–651.
- Chichorro, J.G., Zampronio, A.R., Souza, G.E., Rae, G.A., 2006a. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain* 123, 64–74.
- Chichorro, J.G., Zampronio, A.R., Rae, G.A., 2006b. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp. Biol. Med.* 231, 1136–1140.
- Chichorro, J.G., Zampronio, A.R., Cabrini, D.A., Franco, C.R.C., Rae, G.A., 2009. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides* 43, 133–142.
- Couture, R., Lindsey, C.J., 2000. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide receptors*, Part 1, vol. 16. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 241–300.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araújo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41, 1006–1012.
- Ferreira, J., Beirith, A., Mori, M.A.S., Araújo, R.C., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2005. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B₁ receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* 25, 2405–2415.
- Fujiwara, Y., Mantione, C.R., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Yamamura, H.I., 1989. Characterization of (3H) bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B₂ subtypes. *Life Sci.* 44, 1645–1653.
- Gougat, J., Ferrari, B., Saran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Martani, J., Alonso, R., Cudemec, A., Croci, T., Guagnini, F., Urban-Szabo, K., Martinolle, J.J., Soubrie, P.,

- Finance, Le Fur, G., 2003. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl]sulfonyl]amino]propanoyl) amino)-3-(4-[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new non-peptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 661–669.
- Imamura, Y., Kawamoto, H., Nakanishi, O., 1997. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp. Brain Res.* 116, 97–103.
- Kariya, K., Yamaguchi, A., Sasaki, T., 1985. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J. Neurochem.* 44, 1892–1897.
- Lai, J., Luo, M.G., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Porreca, F., 2006. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 9, 1534–1540.
- Levy, D., Zochodne, D.W., 2000. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 86, 265–271.
- Petersen, M., Eckert, A.S., Von Banchet, G., Segond, Heppelmann, B., Klusch, A., Kniffki, K.D., 1998. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in the sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* 83, 949–959.
- Quintão, N.L.M., Passos, G.F., Medeiros, R., Paszcuk, A.F., Motta, F.L., Pesqueiro, J.B., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2008. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J. Neurosci.* 28, 2856–2863.
- Rashid, H., Inoue, M., Matsumoto, M., Ueda, H., 2004. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 1158–1164.
- Seino, H., Seo, K., Maeda, T., Someya, G., 2009. Behavioural and histological observations of sensory impairment caused by tight ligation of the trigeminal nerve in mice. *J. Neurosci. Methods* 181, 67–72.
- Sessle, B.J., 2000. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 57–91.
- Vos, B.P., Maciewicz, R.J., 1991. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson, J.M., Guilbaud, G. (Eds.), *Lesions of Primary Afferent Fibers as a Tool for the Study of Clinical Pain*. Elsevier, Amsterdam, pp. 147–158.
- Vos, B.P., Strassman, A.M., Maciewicz, R.J., 1994. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J. Neurosci.* 14, 2708–2723.
- Werner, M.F.P., Kassuya, C.A.L., Ferreira, J., Zampronio, A.R., Calixto, J.B., Rae, G.A., 2007. Peripheral kinin B1 and B2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* 53, 48–57.
- Xu, M., Aita, M., Chavkin, C., 2008. Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *J. Pain* 9, 1036–1048.
- Yamaguchi-Sase, S., Hayashi, I., Okamoto, H., Nara, Y., Matsuzaki, S., Hoka, S., Majima, M., 2003. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. *Inflamm. Res.* 52, 164–169.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.