



Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica

**INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOGENIA DE MODELO DE DOR NEUROPÁTICA
TRIGEMINAL EM RATOS**

FABRICIO FINAMOR DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Coorientadora Prof. Dra. Andressa de Souza

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, setembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA
E TERAPÊUTICA

**INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOGENIA DE MODELO DE DOR NEUROPÁTICA
TRIGEMINAL EM RATOS**

FABRICIO FINAMOR DE OLIVEIRA

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres

Coorientadora Prof. Dra. Andressa de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica,
UFRGS, como requisito para obtenção do título de
Mestre

Porto Alegre, setembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus queridos familiares, a meus filhos, a minha Orientadora Dra. Iraci L.S. Torres, coorientadora Andressa de Souza por acreditarem em mim.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus que me dá saúde e forças e por permitir que meus sonhos sejam realizados;

Aos meus pais e familiares que estão sempre ao meu lado incentivando e dando suporte logístico, emocional e sentimental;

A meus filhos, bem maior que possuo, por entenderem o quanto este trabalho é importante para mim e para nossa família, serei eternamente grato a vocês;

A minha orientadora Profa. Dra. Iraci L.S.Torres, incansável, minha mãe científica, humilde, serena, inteligente e sábia, são algumas das características desta super mulher; exemplo de orientadora que não se importa em dividir seus conhecimentos e deixar assim seu legado para o meu acadêmico;

A minha coorientadora Profa. Dra. Andressa de Souza, pela paciência, sabedoria e coragem em orientar-me, juntamente com a Maria Clara no ventre participaste ativamente deste projeto. Terás um futuro de sucesso na área acadêmica com certeza;

A minha coorientadora não oficial, mas fundamental na estruturação desta dissertação, Dra. Vanessa Leal Scarabelot, pela paciência, presteza, humildade, simplicidade, inteligência e determinação em me orientar e auxiliar na conclusão deste projeto. No que depender de mim, serás beatificada;

Aos meus colegas do grupo Farmacologia da Dor e Neuromodulação. Em especial aos meus amigos, Carla de Oliveira, Etiane, Joice, Deise, Diego, Bettega e Isabel, sem vocês este estudo não teria ocorrido. Tenho orgulho de fazer parte deste grupo;

A todos os profissionais da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Enfermeira Marta Cioato por todo suporte para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG/HCPA) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste estudo (14-0604).

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica (PPGFT) por me possibilitarem desenvolver este trabalho.

RESUMO

Neuralgia trigeminal (NT) é um tipo de dor neuropática orofacial intensa e debilitante sentida ao longo do nervo trigêmeo. Seu diagnóstico é meramente clínico, sem exames específicos, o que dificulta a prestação e eficácia do tratamento. O sintoma mais característico é alodínia mecânica relacionada à sensibilização central. Seu tratamento é farmacológico e/ou cirúrgico, no entanto pode trazer poucos benefícios e/ou importantes efeitos colaterais sem a garantia de remissão total dos sintomas. No tratamento farmacológico, os anticonvulsivantes são fármacos de primeira linha de tratamento, mas também são obtidas respostas de melhora com o uso de fármacos ansiolíticos e opioides. A dificuldade no tratamento da NT se deve, em parte, à falta de compreensão dos mecanismos envolvidos na geração da dor; sendo, desta forma, imprescindível a busca de um melhor entendimento da fisiopatologia da NT buscando identificar as vias envolvidas no processo de dor. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível envolvimento das vias gabaérgica, glutamatérgica e opioidérgica na fisiopatologia de um modelo de neuralgia trigeminal em ratos. A resposta nociceptiva dos animais foi avaliada por meio do teste de von Frey eletrônico antes e após a administração de agonistas gabaérgicos e opioidérgico e de antagonista glutamatérgico. Além da resposta nociceptiva, foram avaliados os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em gânglio trigeminal, tronco encefálico e córtex pré-frontal. Todos os procedimentos experimentais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA), Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A indução da dor neuropática foi por constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) proposto por Imamura em 1997 adaptado (Imamura Y., Kawamoto H., Nakanishi O. Characterization of heat-hyperalgesia in experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*, 1997; 116: 97-103.). Para isso foram utilizados 112 ratos *Wistar*, machos divididos para o procedimento cirúrgico em 3 grupos: Controle Total, Dor e Sham. Quatorze dias após o procedimento cirúrgico, tempo necessário para o desenvolvimento da dor neuropática, realizamos dois protocolos e dividimos os grupos em: protocolo 1: controle veículo, cirurgia sham veículo, cirurgia sham agonista benzodiazepínico, cirurgia sham antagonista glutamatérgico, dor veículo, dor agonista benzodiazepínico, dor antagonista glutamatérgico; protocolo 2: controle veículo, cirurgia sham veículo, cirurgia sham agonista gabaérgico, cirurgia sham agonista opioidérgico, dor veículo, dor agonista gabaérgico, dor agonista opioidérgico. Os animais dos grupos sham sofreram apenas incisão cirúrgica, sem constrição do nervo. Durante o procedimento cirúrgico a indução anestésica foi feita com cetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg) e a manutenção, com isoflurano 2-3%. O controle da dor pós-operatória foi obtido com cloridrato de tramadol (10mg/kg) no intervalo de 12h por 48h. A resposta hiperalgésica mecânica (von Frey) foi avaliada antes da indução do modelo (medida basal), 7 e 14 dias após cirurgia, pré-administração dos fármacos, 15,30 e 60 minutos após administração dos fármacos: veículo - solução salina; agonista benzodiazepínico – diazepam (2 mg/kg); antagonista glutamatérgico - MK- 801 (0,25mg/Kg), agonista opioidérgico – morfina (5,0 mg/kg) e agonista gabaérgico – fenobarbital (100mg/kg). Os dados foram analisados por Equações Estimativas Generalizadas e expressos em média±EPM. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/HCPA e CEUA/UFRGS sob número: 14-0604 e 29310, respectivamente. Inicialmente foram realizados testes para verificação do modelo de dor, foi observado que 14 dias após cirurgia de constrição do nervo infraorbitário, os animais do grupo dor apresentaram redução nos limiares de retirada da face no teste de von Frey facial comparado aos grupos controle e sham [GEE: interação grupo x tempo (Wald $\chi^2=15,81$; 2, $P<0,05$)]. Após o estabelecimento do modelo, foram realizados testes nociceptivos para avaliação das vias envolvidas na neuralgia trigeminal, observou-se interação grupo x tempo (Wald $\chi^2=175,74$; 18, $P<0,01$). No protocolo 1, os animais do grupo dor que receberam agonista benzodiazepínico (diazepam) apresentaram aumento no limiar nociceptivo a partir de 15 minutos após administração e este resultado permaneceu por até 60 minutos. Os animais do grupo dor que receberam antagonista glutamatérgico (MK-801) apresentaram aumento no

limiar de retirada da face somente na avaliação realizada 60 minutos após a administração do fármaco. No protocolo 2, análise estatística mostrou interação entre as variáveis tempo x grupo (Wald $\chi^2=657,53;18, P<0,01$), os animais do grupo dor que receberam fenobarbital apresentaram aumento no limiar nociceptivo a partir de 15 minutos após administração e este resultado permaneceu por até 60 minutos. Por outro lado, os animais que receberam morfina apresentaram um aumento no limiar nociceptivo significativamente maior que os animais que receberam fenobarbital, no entanto ambos os fármacos reverteram a hiperalgesia induzida pela exposição ao modelo de dor. Na análise bioquímica, em córtex e tronco encefálico foi observado aumento nos níveis de BDNF tanto nos animais submetidos ao modelo de NT quanto aos que foram expostos a cirurgia sham (ANOVA de uma via/SNK, $F_{(2,22)}=13,46$; $F_{(2,25)}=6,08$, $P<0,05$, respectivamente. Em nível periférico foi observado aumento nos níveis de BDNF em gânglio trigeminal nos animais submetidos ao modelo de NT (ANOVA de uma via/SNK, $F_{(2,22)}=4,09$; $P<0,05$). Em soro não foi observada diferença nos níveis de BDNF entre os grupos (ANOVA de uma via, $P>0,05$). Com base nos resultados encontrados, este estudo sugere que há o envolvimento das vias gabaérgica, glutamatérgica e opioidérgica no processamento da dor neuropática orofacial (neuralgia trigeminal) sugerindo que há funcionalidade dos receptores testados. No entanto, estes agonistas gabaérgicos não induziram analgesia nos animais controles e cirurgia sham sugerindo uma alteração na liberação ou na síntese de GABA nos animais com NT. Neste estudo, não foram realizadas análises de expressão e quantificação de receptores, apenas avaliou-se a resposta nociceptiva e os níveis de BDNF centrais e periféricos. De acordo com estes achados a via gabaérgica teve uma resposta mais rápida que a via glutamatérgica. Alguns estudos demonstram que os receptores glutamatérgicos estão localizados em fibras não mielinizadas na periferia isto pode justificar o atraso na resposta dos animais que receberam antagonista glutamatérgico em nosso estudo. Quanto aos níveis de BDNF observamos que há um aumento desta neurotrofina nos animais submetidos ao modelo de NT sugerindo um envolvimento deste neuromodulador em eventos neuroplásticos da NT.

Palavras chave: BDNF, neuralgia trigeminal, via gabaérgica, via glutamatérgica, via opioidérgica

ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (TN) is a type of intense and debilitating orofacial neuropathic pain felt along the trigeminal nerve. The diagnosis is purely clinical, without specific tests, which makes the promptness and effectiveness of treatment. The most characteristic symptom is mechanical allodynia related to central sensitization. Its treatment is pharmacological and / or surgical treatment, however can bring few benefits and / or significant side effects without the guarantee of complete remission of symptoms. In drug treatment, the anticonvulsant drug are first-line treatment, but also enhances responses are obtained with the use of anxiolytic drugs and opioids. The difficulty in treating NT is due in part to the lack of understanding of the mechanisms involved in the generation of pain; It is thus essential to search for a better understanding of the pathophysiology NT seeking to identify the pathways involved in pain process. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible involvement of GABAergic pathways, glutamatergic and opioidergic in the pathogenesis of a model of trigeminal neuralgia in rats. The nociceptive response of the animals was assessed using the von Frey test eletrônicoantes and after administration of opioid agonists and GABAergic and glutamatergic antagonist. In the nociceptive response was evaluated derived neurotrophic factor levels in the brain (BDNF) in the trigeminal ganglia, brainstem, and prefrontal cortex. All experimental procedures were performed in the Animal Experimentation Unit (UEA), Unit of Analysis and Molecular Protein (UAMP) Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA). The induction of neuropathic pain was by chronic constriction of the infraorbital nerve (CCI-ION) proposed by Imamura in 1997 adapted. For that they were used 112 male Wistar rats divided into the surgical procedure into 3 groups: Full Control, Pain and Sham. Fourteen days after surgery, time required for the development of neuropathic pain, performed two protocols and divided groups: Protocol 1: vehicle control, sham surgery vehicle, sham surgery benzodiazepine agonist, sham surgery glutamatergic antagonist, vehicle pain, agonist benzodiazepine pain and antagonist glutamatergic pain. Protocol 2: vehicle control, vehicle sham surgery, sham surgery gabaergic agonist, sham surgery opioid agonist, vehicle pain, gabaergic agonist pain, opioid agonist pain. The animals of the sham group underwent only surgical incision without nerve constriction. During surgery anesthesia was induced with ketamine (50 mg / kg) and xylazine (5 mg / kg) and maintained with isoflurane 2-3%. The control of postoperative pain has been obtained with tramadol hydrochloride (10mg / kg) at 12h intervals for 48 hours. The mechanical hyperalgesic response (von Frey) was assessed before induction model (baseline measurement), 7 and 14 days after surgery, pre-administration of drugs, 15,30 and 60 minutes after drug administration: Vehicle - saline; benzodiazepine agonist - diazepam (2 mg / kg); glutamatergic antagonist - MK-801 (0.25mg / kg), opioid agonist - Morphine (5.0 mg / kg) and gabaergic agonist - phenobarbital (100 mg / kg). Data were analyzed by Equation Generalised Estimates and expressed as mean \pm SEM. All procedures were approved by CEUA / HCPA and CEUA / UFRGS under number: 14-0604 and 29310, respectively. Initially tests were carried out to verify the pain model, it was observed that 14 days after infraorbital nerve constriction surgery, animals pain group showed a reduction in the face withdrawal thresholds to von Frey facial test compared to control and sham groups [GEE: group x time interaction (Wald $\chi^2 = 15.81$; 2, P <0.05)]. After the model category, nociceptive tests were performed to assess the pathways involved in the trigeminal neuralgia, observed group x time interaction (Wald $\chi^2 = 175.74$; 18 P <0.01). In protocol 1, the animals in the group who received pain benzodiazepine agonist (diazepam) showed an increase in nociceptive threshold from 15 minutes after administration and this result remained for up to 60 minutes. Animals of group pain that received glutamate antagonist (MK-801) showed an increase in the withdrawal threshold of the face only in the assessment was performed 60 minutes after drug administration. In protocol 2, statistical analysis showed interaction between the variables time x group (Wald $\chi^2 = 657.53$; 18, P <0.01), the animals showed increased nociceptive threshold from 15 minutes after administration of phenobarbital and morphine and this result remained for up to 60 minutes. On the other hand, animals

receiving morphine showed an increased nociceptive threshold significantly higher in the animals receiving phenobarbital, however both drugs reversed hyperalgesia induced by exposure to pain model. In biochemical analysis, cortex and brainstem was observed increase in BDNF levels in both animals subjected to NT model and those who were exposed to sham surgery (one-way ANOVA / SNK, $F(2,22) = 13.46$; $F(2,25) = 6.08$, $P < 0.05$, respectively, at the peripheral level increase was observed in BDNF levels in trigeminal ganglion of animals subjected to the NT model (one-way ANOVA / SNK $F(2,22) = 4.09$; $P < 0.05$). In serum was no difference in BDNF levels between groups (one-way ANOVA, $P > 0.05$) based on the results, this study suggests that there is involvement of gabaergic pathways, glutamatergic and opioidergic processing orofacial neuropathic pain (trigeminal neuralgia) suggesting that there is functionality of the tested receptors. However, these GABAergic agonists did not induce analgesia in control animals and sham surgery suggesting a change in release or GABA synthesis in animals with NT. In this study, were not realized expression analysis and quantification of receptors, only evaluated the nociceptive response and the central and peripheral levels of BDNF. According to these findings, gabaergic pathways had a faster response than glutamatergic pathways. Some studies have shown that glutamate receptors are located in non-myelinated fibers in the periphery that can justify the delay in the animals that received glutamatergic antagonist in our study. As for BDNF levels we observed that there is an increase of this neurotrophin in animals subjected to NT model suggesting an involvement of this neuromodulator in neuroplastic events NT.

Key words: BDNF, trigeminal neuralgia, gabaergic pathways, glutamatergic pathways, opioidergic pathways.

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Neuralgia de Trigêmeo: Critérios Diagnósticos Clínicos.....	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão do Impulso Nervoso.....	20
Figura 2. Dermátomo da Neuralgia Trigeminal.	32
Figura 3. Fluxograma do estudo.	45
Figura 4. Exposição do nervo infraorbitário.....	46
Figura 5. Teste de von Frey eletrônico facial.	47
Figura 6. Hiperalgisia mecânica avaliada no teste de Von Frey.....	49
Figura 7. Hiperalgisia mecânica avaliada no teste de Von Frey.....	50
Figura 8. Hiperalgisia mecânica avaliada no teste de Von Frey.....	51
Figura 9. Níveis Centrais de BDNF.....	52
Figura 10 Níveis periféricos de BDNF.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrópico

A δ - A delta

AINE – Anti iinflamatório não esteroides

AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CBR - receptor de benzodiazepina central

CCI-ION – Constrição Crônica do Nervo Infraorbitário

CDME – Corno dorsal da medula espinhal

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CNSVT – Complexo nuclear sensitivo do trigêmio

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CT – Grupo Controle Total

CTV - Controle Total Veículo

D- Grupo Dor

DBz - Dor + Agonista benzodiazepínico

DGa - Dor + Agonista gabaérgico

DGlu - Dor +Antagonista glutamatérgico

DOp - Dor +Agonista opioidérgico

DV - Dor Veículo

EUA – Estados Unidos

fMRI – ressonância magnética funcional

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GABA A - Ácido gama-aminobutírico A

GABA B- Ácido gama-aminobutírico B

GEE – Equações Estimativas Generalizadas
HCPA – Hospital de Clinicas de Porto Alegre
HHA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IASP- International Association for the Study of Pain
IHS – Internacional Headache Society
IL-6 – Interleucina 6
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-10 – Interleucina 10
KA – Cainato
LTP – Potenciação de longa duração
NFkB – Fator nuclear kappa B
NMDA- N-metil D-Aspartato
NO – Óxido Nítrico
NOS – Óxido Nítrico Sintase
NT – Neuralgia Trigeminal
PET – Tomografia por emissão de próton
POMC – Pró-opiomelanocortina
REZ – Root Entry Zone
S – Grupo Sham
SBz – Sham +Agonista benzodiazepínico
SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal
SGa - Sham +Agonista gabaérgico
SGlu - Sham +Antagonista glutamatérgico
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SOp - Sham +Agonísta opioidérgico

SP – Substância P

SV - Sham Veículo

TNF- α – Fator de necrose tumoral – alfa

TrkB - Receptor de tirosina-quinase B

T spo - proteína translocador

UAMP – Unidade de Análise Molecular e Proteínas

UEA – Unidade de Experimentação Animal

V1 – Ramo Oftálmico do Nervo Trigêmeo

V2 – Ramo Maxilar do Nervo Trigêmeo

V3 – Ramo Mandibular do Nervo Trigêmeo

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 DOR.....	16
1.2 TRANSMISSÃO DO IMPULSO DOLOROSO.....	17
1.3 MODULAÇÃO DA DOR.....	20
1.4 DOR CRÔNICA.....	22
1.5 DOR NEUROPÁTICA	27
1.5.1 Neuralgia Trigeminal.....	29
1.6 TRATAMENTOS ATUAIS.....	35
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	39
3. HIPÓTESES	40
3.1 HIPÓTESE DO PROTOCOLO 1:	40
3.2 HIPÓTESE DO PROTOCOLO 2:	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL.....	41
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	41
5. METODOLOGIA.....	42
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
5.2 LOCAL DA PESQUISA	42
5.3 ANIMAIS	42
5.4 TAMANHO DA AMOSTRA	43
5.5 FÁRMACOS	43
5.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
5.7 CIRURGIA.....	45
5.8 TESTE COMPORTAMENTAL	46
5.9 MORTE DE ANIMAIS.....	47
5.10 DOSAGEM DE FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF).....	48
5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
6.RESULTADOS	49
6.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS.....	49
6.1.1 Protocolo 1 (Benzodiazepínico/GLUTA).....	50

6.1.2 Protocolo 2 (GABA/OPIOIDE).....	51
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	51
6.2.1 Níveis de BDNF	51
7.DISSCUSSÃO	55
8.CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR

Dor é uma experiência vivenciada pela quase totalidade dos seres humanos, como sintoma ou doença e é causa frequentemente da procura pelo sistema de saúde (Siqueira e Teixeira, 2001). Ela é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tais lesões” (Merskey e Bogduk, 1994). Mais do que uma sensação, dor é descrita como uma experiência multidimensional que além de sensações somáticas associadas a ela, possui um forte componente motivacional, evocando tanto reflexos de retirada como comportamentos altamente organizados de aversão e fuga (Sessle et. al. 2002). Habitualmente ela é conceituada como um sintoma de doença que pode ser cárie dentária, tumor, fratura entre outras. No entanto, a dor pode ser a própria doença. Em quaisquer destas situações ela continua sendo subjetiva e permanece um desafio na prática clínica (Siqueira e Teixeira, 2001).

De acordo com a duração, dor pode ser classificada como aguda, que tem função protetiva importante para a sobrevivência, alertando o indivíduo sobre iminente dano tecidual; ou crônica, quando persiste por três meses ou mais. Dor crônica não tem finalidade protetiva, é considerada doença *per se*, trazendo sérias consequências ao indivíduo, comprometendo a qualidade de vida do paciente (Russo e Brose, 1998). A ocorrência de dor, especialmente crônica, é crescente talvez em decorrência dos novos hábitos de vida, da maior longevidade do indivíduo, do prolongamento da sobrevivência das pessoas com afecções clínicas naturalmente fatais, das modificações dos meios ambientes e, provavelmente, do reconhecimento de novas condições algicas e da aplicação de novos conceitos que traduzam seu significado (Siqueira e Teixeira, 2001).

Um estudo recente sugere que 1,5 bilhões de pessoas sofrem com dor crônica no mundo (*Global Industry Analysis*, 2015). Nos Estados Unidos (EUA) são 100 milhões de pessoas adultas (*Institute of Medicine Report*, 2011), gerando um custo de 560 a 635 bilhões de dólares diretamente, ou indiretamente por ausências ao trabalho (Aronoff, 2016). No Brasil, mais de 1/3 da população julga que a dor crônica compromete as atividades habituais e mais de 3/4 considera que a dor crônica limita as atividades cotidianas, relações sociais e familiares (Teixeira et al., 2001). Devido à dor, cerca de 50% a 60% dos indivíduos tornam-se parcial ou totalmente incapacitados, transitória ou permanentemente (Jensen et al., 1985).

1.2 TRANSMISSÃO DO IMPULSO DOLOROSO

Um estímulo prejudicial ou potencialmente destrutivo para os tecidos é considerado nocivo. A percepção de estímulos nocivos acontece pela ativação de nociceptores (receptores sensoriais do tipo terminações nervosas livres) localizados em quase todo o organismo com exceção do sistema nervoso central (SNC) (Basbaum e Jessell, 2000). Nociceptores constituem a porção terminal periférica de fibras que conduzem potenciais de ação propagados até o corno dorsal da medula espinhal e subnúcleo caudal do nervo trigêmeo no tronco encefálico. Tais fibras são axônios de células sensoriais primárias, conhecidas como neurônios aferentes primários, localizados no gânglio dorsal da medula espinhal e no gânglio trigeminal (gânglio de Gasser). Neurônios primários ou de primeira ordem são neurônios que recebem informações sensoriais; seus corpos estão localizados nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal ou no gânglio trigeminal (tronco encefálico), quando se localizam na região orofacial. Seu axônio único deixa o corpo celular e se bifurca, sendo que, um dos prolongamentos se dirige para a periferia, onde recebe estímulos nociceptivos e o outro adentra o SNC fazendo sinapses com neurônios secundários. Quando nos referimos a estímulos orofaciais, a informação penetra no subnúcleo caudal do complexo nuclear sensitivo do trigêmeo (CNSVT) no tronco encefálico fazendo também sinapses com

neurônios de segunda ordem, dando origem às vias ascendentes de condução da dor (Basbaum e Jessell, 2000; Messlinger et al., 2006).

As fibras que transmitem o estímulo nocivo são de dois tipos – A delta (A δ) e C. Fibras do tipo A δ são mielinizadas, com maior velocidade de condução e contribuem para a percepção da dor de forma rápida conduzindo estímulos térmicos e mecânicos. Enquanto as fibras C, não mielinizadas e com menor velocidade de condução, relacionam-se principalmente a dor de caráter dolente, provocando sensação de queimação (Basbaum e Jessell, 2000; Morgan e Mikhail, 1996).

Há duas vias principais de condução da dor: trato paleoespinotalâmico e neoespinotalâmico. Ambas partem da medula espinhal, cruzam a linha média (ao nível da comissura anterior) e chegam ao tálamo. O trato neoespinotalâmico ou espinotalâmico lateral, de aparecimento mais recente no curso da evolução biológica. Compreende as fibras do tipo A δ , com poucas estações sinápticas, e se projeta no núcleo ventral pósterolateral do tálamo. Os neurônios terciários localizam-se no córtex sensitivo primário e secundário onde ocorre a integração e interpretação dos estímulos. Entretanto, estímulos de dor lenta passam primeiro pela formação reticular, antes de chegar ao tálamo e, de lá para o córtex sensitivo primário e secundário. Algumas dessas fibras terminam no tronco encefálico promovendo reações comportamentais e fisiológicas aos estímulos dolorosos (Lent, 2010; Sessle, 2010). O trato trigeminotalâmico, de maneira análoga ao trato espinotalâmico, parte do núcleo sensitivo do trigêmeo, atravessa a linha média e ascende até o tálamo (núcleo ventral pósteromedial) (Messlinger et al., 2006).

Esses tratos relacionam-se com os aspectos discriminativos da dor, como localização, intensidade e duração. Observa-se estreita relação topográfica entre a área estimulada na periferia e as regiões talâmicas e corticais ativadas, ou seja, há somatotopia. Isto contribui para que o indivíduo saiba precisar com exatidão o ponto de origem da dor em um trauma (Bear et al., 1996; Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

O trato espinotalâmico medial ou paleoespinotalâmico é mais antigo na escala de evolução. Ao contrário do trato lateral, tem várias estações sinápticas. A partir da medula espinhal, projeta-se para o tálamo medial e, daí, difusamente para o córtex cerebral de ambos os hemisférios cerebrais. Perde-se assim, a somatotopia dos estímulos percebidos. Projeta-se também para a substância cinzenta periqueductal, o que pode representar importante ligação entre vias ascendentes e descendentes da dor. Fibras colaterais do trato medial alcançam o sistema reticular e hipotálamo, sendo responsáveis pela resposta de alerta observada em associação à presença de dor. Sua projeção para estruturas do chamado sistema límbico explica o aparecimento das respostas emocionais desagradáveis. Devido às múltiplas estações sinápticas, a via paleoespinotalâmica é a que mais se presta à influência moduladora de outros sistemas centrais. (Bear et al., 1996; Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

Entre os mediadores liberados na sinapse entre o neurônio primário e o secundário estão glutamato, o mais importante, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Glutamato é o principal aminoácido excitatório atuando nos seguintes receptores de membrana: ionotrópicos ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA), NMDA, kainato e metabotrópicos. Os receptores AMPA são ativados pelos primeiros potenciais de ação; os do tipo NMDA precisam de estímulos persistentes para serem ativados, pois em condições normais estão bloqueados por um íon magnésio. SP é um neuropeptídeo da classe das taquicininas liberado pelas fibras amielínicas peptidérgicas em resposta a estímulos nocivos, seu receptor é o de neurocinina NK1, ligado à proteína G, metabotrópico. Adicionalmente, CGRP, um peptídeo liberado por pequenas fibras amielínicas, se liga ao seu receptor e potencializa a ação da substância P. Além disso, nos nociceptores trigeminiais, CGRP aumenta a liberação do BDNF, uma neurotrofina relacionada aos eventos modulatórios da dor ligados a neuroplasticidade e sensibilização central (Khan e Smith, 2015).

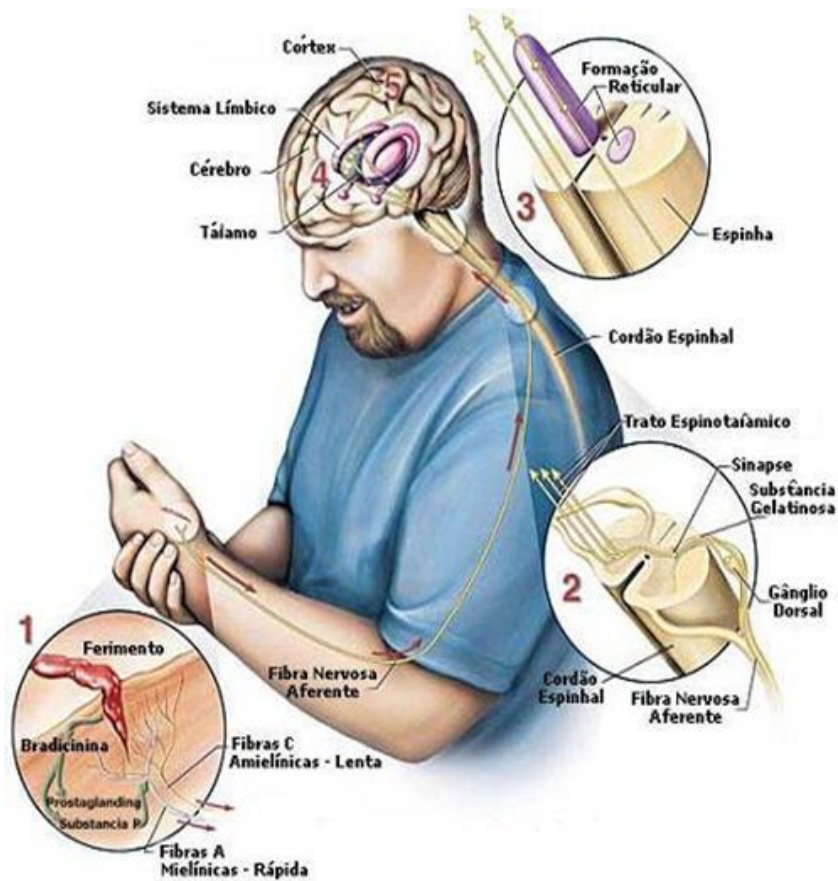


Figura 1. Transmissão do Impulso Nervoso

Fonte: [https://www.google.com.br/search/transmissão da dor/](https://www.google.com.br/search/transmiss%C3%A3o+da+dor/) www.medicinanet.com.br

1.3 MODULAÇÃO DA DOR

A transmissão de estímulos nocivos desde a periferia até os centros supra espinhais não é um processo linear. Circuitos, em diferentes níveis, têm capacidade de modular a transmissão das informações nociceptivas, alterando a resposta ao estímulo nocivo. O balanço da atividade entre circuitos excitatórios e inibitórios determinará quais informações chegarão ao cérebro. A modulação do processo nociceptivo pode ocorrer em nível periférico, medular e supra-espinhal (Chudler e Bonica, 2001; Millan 2012).

Teoria da Comporta proposta por Melzack e Wall (1965), busca explicar como a ativação de certos mecanismos podem diminuir ou suprimir a percepção da dor, por meio da estimulação de interneurônios inibitórios. A transmissão nociceptiva ativa determinadas áreas encefálicas promovendo a liberação de moduladores da dor como opioides (endorfina,

dinorfina, encefalinas), noradrenalina e serotonina, dentre outras atuando (REF). Segundo a Teoria da comporta, a atividade de grandes fibras aferentes somatossensoriais (táteis) ativa um interneurônio na substância cinzenta da medula espinhal, que por sua vez causa inibição pré-sináptica das fibras aferentes nociceptivas de menor calibre (dor). A atividade do neurônio de segunda ordem da via nociceptiva pode ser, portanto, modificada pela atividade de outras vias somatossensoriais. Isto explica porque pequena dor cutânea pode ser abolida esfregando-se a área da pele afetada, isto é, o ato de esfregar ativa grandes fibras aferentes somatossensoriais que inibem a transmissão das fibras aferentes nociceptivas. Alguns tentam explicar os efeitos da acupuntura por meio dessas teorias (Chudler e Bonica, 2001).

O sistema inibitório descendente, é um sistema de projeções descendentes para o complexo trigeminal e o corno dorsal da medula espinhal (CDME), compostopelo tronco encefálico, mesencéfalo, subcórtex e córtex, sendo que a parte final da via inibitória é no CDME. Moduladoresda transmissão nociceptiva foram identificadas nos neurônios do CDME, dentre eles, destacam-se aminoácidos inibitórios (GABA, glicina), monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina), acetilcolina, histamina e peptídeos opioides endógenos (encefalinas, endorfinas e dinorfinas) . Serotonina e noradrenalina contribuem para o efeito antinociceptivo da via espinhal e supra espinhal (Chudler e Bonica, 2001)..

Outra importante área na modulação da dor é a substância cinzenta periaquedutal (SCP). SCP recebe aferências do hipotálamo, córtex frontal e insular, amígdala, núcleo parafascicular do tálamo, núcleo cuneiforme, locus ceruleus formação reticular e CDME e apresenta neurônios que contêm opioides endógenos, substância P e GABA. Estimulação elétrica e administração local de morfina nesta estrutura produzem marcada analgesia, tanto em animais como em seres humanos (Terman e Bonica, 2001).

Opioides endógenos são classificados em encefalinas, β -endorfinas e dinorfinas, tendo como precursores pró-encefalina, pró-opiomelanocortina (POMC) e pró-dinorfina, respectivamente. POMC é sintetizada principalmente na hipófise e dá origem ao

hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Em situações de estresse, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) induz síntese e liberação na corrente sanguínea de ACTH e β -endorfina pela adenohipófise. Podem ser liberados após estímulos dolorosos, agindo em vários receptores opioides (μ , δ , κ) de modo a suprimir as respostas nociceptivas periféricas, medular e encefálico. Opioides inibem a liberação de neurotransmissores excitatórios locais, incluindo o glutamato e a substância P. Essa liberação é inibida por meio do bloqueio do influxo de cálcio extracelular, necessário para liberação de neurotransmissores de vesículas (Gaskell H., Derry S., Stannard C., Moore R., 2016).

Em conclusão, a modulação da dor é um processo fisiológico importante que utiliza uma rede de comunicação do SNC envolvendo liberação de peptídeos opioides, aminas biogênicas e outros transmissores. A expressão de diversos padrões de experiência nociceptiva revela a plasticidade do sistema nervoso e a sabedoria do organismo em tentar preservar a homeostase em um ambiente nocivo (Terman e Bonica, 2001).

1.4 DOR CRÔNICA

Dor crônica pode ser definida como uma dor contínua ou recorrente de duração de pelo menos três meses e, muitas vezes, com etiologia incerta. Não responsiva a procedimentos terapêuticos convencionais sendo causa de incapacidades e inabilidades trazendo perdas à qualidade de vida do paciente. Para fins de pesquisa clínica, a Associação Internacional para Estudo da Dor preconiza dor crônica como aquela com duração maior que seis meses, de caráter contínuo ou recorrente (três episódios em três meses) (Merckel N., 1994). Devido a sua longa duração, dor crônica perde a função homeostática, protetiva, de ser sinal de alerta a dano. Quadros de dor crônica levam a comprometimento funcional, sofrimento, incapacidade progressiva e alto custo socioeconômico. Independentemente da patologia de base, a dor crônica *per se* leva a implicações na saúde dos pacientes, deixando de ser um sintoma e passando a ser tratada como doença pelos profissionais de saúde (Martinez et al., 2004).

Dor crônica, relacionada à persistência de estimulação nociceptiva, induz alterações no sistema somatossensorial nociceptivo devido à neuroplasticidade em circuitos neurais (Staud, 2006; Staud e Rodriguez, 2006). Síndromes dolorosas crônicas ativam os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e simpatoadrenal que promovem depressão do sistema imune e alterações em nível de sistema nervoso periférico (SNP) e SNC (Sessle et al., 2010).

Em SNP, após ocorrência de lesão tecidual, inicia-se um processo chamado de sensibilização periférica, que consiste na diminuição do limiar nociceptivo e no aumento da intensidade e do tempo de resposta a estímulos dolorosos em neurônios primários da região afetada. Respostas a estímulos térmicos de calor são as mais afetadas pela sensibilização periférica. Células lesadas e do sistema imune liberam substâncias algogênicas e pró-inflamatórias, com efeito sinérgico (Leung e Cahill, 2010). Após estimulação repetida, os nociceptores podem apresentar resposta aumentada a estímulos nocivos (hiperalgesia) ou a quaisquer estímulos, incluindo os não-nocivos (alodinia) (Basbaum e Jessell, 2000).

A diminuição do limiar de dor, o aumento e o prolongamento da resposta a estímulos dolorosos em neurônios de primeira ordem, a partir de uma lesão tecidual, podem ser gerados por um processo chamado de sensibilização periférica. Sendo a resposta a estímulos térmicos de calor a mais afetada por este processo. Mediadores liberados pelo tecido lesado, como adenosina, bradicinina, ions potássio e serotonina (5-HT) atuam diretamente no nociceptor, já prostaglandinas como a prostagladina E2 e a prostaciclina sensibilizam o nociceptor aos demais mediadores, todos estes estímulos associados resultam em hiperalgesia primária (Basbaum e Jessell, 2000).

O nociceptor libera peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene related peptide* - CGRP) e substância P (SP). SP atua em mastócitos e macrófagos, induzindo liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) e histamina. Estes mediadores ativam o nociceptor e provocam extravasamento de CGRP. Este processo induz vasodilatação, edema e liberação adicional de

bradicinina, óxido nítrico com consequente invasão de monócitos e linfócitos T, levando a uma maior sensibilização do nociceptor, caracterizando o quadro de hiperalgesia secundária (Woolf C., Salter M., 2000).

Por outro lado, mecanismos endógenos de controle da inflamação excessiva evitam dano tecidual e mantêm a homeostase. Por exemplo, leucócitos liberam interleucina-10 (IL-10), uma citocina com ampla e potente ação anti-inflamatória, que age inibindo fator nuclear kappa B (NFkB) e síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL 1- β e TNF- α minimizando dano tecidual. IL-10 inibe resposta imune inata e adquirida na fase resolutive do processo inflamatório. Entretanto, muitas vezes, esses mecanismos são insuficientes na prevenção de alterações neuroplásticas decorrentes de processos nociceptivo prolongado (Khan et al, 2015, Ouyang et al, 2011).

No caso de estimulação nociceptiva prolongada decorrente de demora ou incapacidade de resolução da lesão, a hiperalgesia pode persistir e este processo inflamatório ou lesão neural induzem a alterações plásticas funcionais, químicas e estruturais no SNC. Salientando que neurônios nociceptivos do CDME têm sua sensibilidade aumentada à estimulação sensorial, desencadeando fenômeno de sensibilização central, um tipo de plasticidade sináptica consequente de atividade decorrente de intensa, repetida e sustentada estimulação nociceptiva (Costigan et al, 2009 ; Latremoliere e Woolf, 2009). Este fenômeno consiste em estado de hiperexcitação neuronal decorrente da diminuição das vias inibitórias e/ou aumento da eficácia sináptica, processos relacionados a sinais dolorosos dos neurônios do CDME ou do subnúcleo caudal do CNSVT. Em virtude disso, estes neurônios do CDME passam apresentar atividade espontânea, diminuição no limiar de ativação, aumento da resposta a estímulos supralimiais e aumento do tamanho de seus campos receptivos. Somando-se ainda alteração ao processamento sensorial, déficit funcional em mecanismos antinociceptivos descendentes, ativação das vias facilitatórias da dor e aumento da percepção da dor secundária (somação temporal) (Nijs et al., 2010). Além de alterações em neurônios de segunda ordem,

são sugeridas alterações no processamento central da dor em neurônios de terceira ordem. Apesar de sensibilização central apresentar semelhanças com sensibilização periférica, seus mecanismos moleculares diferem substancialmente, assim como o tipo de estímulo que tem sua resposta alterada. A resposta a estímulos mecânicos é especialmente alterada na sensibilização central, por outro lado, a resposta a estímulos térmicos a altas temperaturas, na sensibilização periférica. Devido a alterações em propriedades de neurônios centrais, o processamento será alterado e a sensação dolorosa, distorcida e aumentada, ocorrendo mesmo na ausência de estímulos nocivos exógenos ou endógenos, fazendo com que pequenos estímulos não nocivos passem a desencadear respostas exageradas (alodinia), dor com estímulos subliminares (hiperalgesia) ou até mesmo dor espontânea (Latremoliere e Woolf, 2009). Tal mecanismo contribui para quadros de dor crônica, como a de membro fantasma, em que mesmo após a amputação, o paciente relata dor com localização e intensidade similares às apresentadas antes da cirurgia (Terman e Bonica, 2001).

É importante salientar que, outros processos envolvidos na sensibilização central como o fenômeno *wind-up* e potenciação de longa duração (*long-term potentiation* - LTP) desencadeados pela permanência do estímulo nociceptivo. *Wind-up* consiste na amplificação do sinal decorrente de sensibilização de neurônios de segunda ordem ao glutamato. A somação temporal de estímulos repetidos transmitidos por fibras C induz liberação deste aminoácido excitatório, juntamente com substância P e CGRP que atuam respectivamente em receptores NMDA, NK1, CGRP_r (Aronoff, 2016; Garcia-Recio e Gascón, 2015).

A ativação do receptor NMDA, passo central no início e manutenção da sensibilização central, ocorre tardiamente, pois é necessário remover o íon magnésio que bloqueia o receptor. Esta remoção ocorre somente após ligação de glutamato ao receptor AMPA promovendo despolarização de membrana, abertura do canal iônico e conseqüente influxo de sódio e efluxo de potássio, associados à despolarização gerada pela ativação dos receptores NK1 e CGRP. Além disso, ao atingir determinada voltagem, canais de cálcio dependentes de

voltagem, são abertos, ampliando o efeito despolarizante (Latremoliere e Woolf, 2009). Cálcio intracelular ao atingir nível ideal, ativa cascatas de sinalização responsáveis pelo início e manutenção do processo de sensibilização central. Wind-up tem duração limitada, desaparecendo em alguns segundos após a interrupção do estímulo, representando uma potenciação homossináptica, uma vez que ocorre somente nas sinapses ativadas de curto prazo (Klauman et al, 2008; Latremoliere e Woolf, 2009).

LTP, um mecanismo de memória, também ocorre no processamento de estímulos dolorosos relacionados ao fenômeno de sensibilização central (Latremoliere e Woolf, 2009). Possui três fases: inicial, com duração de minutos; precoce, com duração de algumas horas; tardia que pode durar de muitas horas a vida toda. Quando os nociceptores são ativados por estímulos repetidos ocorre somação destes tornando os potenciais de ação sinápticos gerados por fibras A δ e C mais lentos, podendo durar mais de 20 segundos. A soma destes potenciais lentos em neurônios primários gera potenciais longos nos neurônios do núcleo trigeminal. Alguns segundos de despolarização de fibras primárias podem levar a despolarizações de vários minutos no neurônio secundário. No momento em que o receptor NMDA é ativado, ocorre um aumento do cálcio intracelular, ativando enzimas cinases dependentes de cálcio que ativam a enzima óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela síntese de neuromediador óxido nítrico (NO). NO atravessa membranas e se difunde em todas as direções, agindo, também em neurônio pré-sináptico, aumentando liberação de glutamato por horas. No entanto, o mecanismo de longa duração do fenômeno de LTP, é ligado à ativação da expressão gênica de proteínas para novos receptores glutamatérgicos, moléculas de adesão e componentes de novos sítios pós-sinápticos nas espinhas dendríticas (Lent, 2010).

Os aminoácidos glicina e ácido gama-aminobutírico (GABA), que atuam como neurotransmissores inibitórios parecem exercer importante papel na inibição segmentar da dor. O GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório no SNC. Em nível de medula espinhal, sua atuação se faz por meio de receptores ionotrópicos GABA-A e GABA-

B. Quando o receptor GABA-A é ativado promove influxo de cloreto hiperpolarizando a membrana celular e conseqüentemente, inibindo a transmissão do estímulo. A picrotoxina, um potente antagonista GABA-A, parece se ligar do lado interno do canal, impedindo o influxo de cloreto para o interior da célula. Por outro lado, a ativação de receptores GABA-B aumenta a condutância de potássio também promovendo hiperpolarização e inibição da transmissão do estímulo. Por sua vez, a ativação dos receptores de glicina aumenta o influxo de cloretos, sendo sua ação mais complexa que a do GABA por também ter efeito facilitatório sobre os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (Waxham, 1999).

Outro importante sistema de neurotransmissores envolvido na modulação inibitória da dor é o sistema opioide. Opioides endógenos compreendem endorfinas, dinorfinas e encefalinas, se ligam a receptores específicos que podem ser de três tipos: mu, delta e kappa. Em neurônios de medula espinhal, seu efeito predominante é diminuir o disparo neuronal. A ligação em receptores pré-sinápticos faz com que a liberação de neurotransmissores envolvidos nas vias de dor seja reduzida, por promover o fechamento de canais de cálcio. A estimulação de receptores pós-sinápticos inibe a neurotransmissão por aumentar a condutância de potássio promovendo hiperpolarização de membrana, reduzindo a transmissão do estímulo (Chudler e Bonica, 2001 e Gutstein e Akil, 2001).

1.5 DOR NEUROPÁTICA

Podemos subdividir dor crônica em nociceptiva e neuropática. Dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de nociceptores e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares. Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (Bennett M., Smith B., Torrance N., 2006). Pode ter como etiologia traumas em tecido nervoso, patologias inflamatórias, infecciosas, metabólicas,

autoimunes, degenerativas, neoplásicas, uso de medicamentos quimioterápicos, iatrogenias, entre outras. (Latremoliere e Woolf, 2009).

Mais recentemente, em função da possível concomitância de ambos tipos de dor, e das dificuldades diagnósticas, alguns autores recomendam o uso do termo “dor predominantemente neuropática” ou “dor predominantemente nociceptiva”, dependendo do padrão clínico de apresentação. Fatores de risco para o estabelecimento da dor neuropática são idade, gênero e polimorfismos genéticos (Bennett M., Smith B., Torrance N, 2006).

Torrance et al. em 2006 avaliaram randomicamente 6000 adultos procedentes de postos de saúde do Reino Unido, encontraram uma prevalência de dor crônica de origem predominantemente neuropática de 8,2% dos pacientes. Este percentual representou 17% de todos os pacientes com dor crônica, sendo composto majoritariamente por mulheres, idosos e indivíduos de baixo nível socioeconômico. Entretanto, a prevalência de dor neuropática provavelmente aumentará no futuro, devido ao aumento da sobrevivência de pacientes com doenças crônicas associadas a este tipo de dor (câncer, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e diabetes) e ao envelhecimento populacional (Torrance N, Smith B., Bennett M., Lee A.,2006; Smith A., Singleton J., 2008).

Quanto à fisiopatologia das neuropatias, existem cerca de 20 teorias para tentar explicar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da dor neuropática. No entanto, a maioria delas é fundamentada em modelos neuroquímicos excessivamente teóricos e complexos, de pouco entendimento entre os próprios neurologistas (Woolf C., Salter M., 2000). Um reflexo disso é o baixo rendimento dos tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis para a dor neuropática, onde o alívio da dor em 30% dos indivíduos é considerado sucesso terapêutico, e na verdade pode ser considerado um efeito placebo dos tratamentos. Outro motivo para a persistente refratariedade do tratamento da dor neuropática é a ênfase de certos pesquisadores no fenômeno da sensibilização central como causa de dor neuropática. Tal fenômeno é incapaz de responder pela maioria dos casos de dor neuropática, já que a

mesma pode frequentemente ser aliviada por meio de bloqueio anestésico do nervo periférico (Serra J, Campero M, Bostock H, Ochoa J.,2004). Atualmente, o mecanismo mais plausível e cientificamente aceito para explicar a dor neuropática é a geração ectópica de impulsos nervosos envolvendo fibras de pequeno calibre do tipo C e A δ (Bostok H, Campero M, Serra J, Ochoa J., 2005). Após lesão de nervo, alguns pacientes desenvolvem alteração na distribuição e conformação de canais iônicos (especialmente canais de sódio) que promovem aumento da excitabilidade axonal das fibras finas nociceptivas. Tal excitabilidade é, muitas vezes, gerada longe do foco da lesão inicial (por isso chamadas de descargas ectópicas), mas capaz de acarretar o surgimento de sintomas de características neuropáticas. Salientando que entre os tratamentos mais eficazes para a dor neuropática esta o uso dos anticonvulsivantes que atuam em canais de sódio, como a carbamazepina e gabapentina. Alguns pesquisadores consideram dor neuropática como uma “epilepsia do nervo ou da via nociceptiva”. São características da dor neuropática: dor espontânea, alodínia, hiperalgesia mecânica ou térmica, anestesia, disestesia e hipoestesia (Sessle et. al., 2010).

1.5.1 Neuralgia Trigeminal

As dores orofaciais são divididas em três grandes grupos: dores somáticas, dores neuropáticas e dores psicogênicas. Dores neuropáticas podem ser classificadas em episódicas ou contínuas, de acordo com as características clínicas. Dores episódicas são de natureza neurogênica e, entre os episódios de dor, apresentam períodos de completa remissão. São eventualmente desencadeadas por algum evento ou estímulo. Dores neuropáticas episódicas são classificadas em neurovasculares e neurálgicas. Dores neurálgicas são associadas às neuralgias e caracterizadas por ataques repentinos de dor semelhantes a choques elétricos ou em queimação que se projetam heterotopicamente ao longo do curso de um nervo. A relação entre o estímulo inicial ou desencadeante e a localização da dor é anatomicamente preciso, ao contrário da relação entre o estímulo inicial e a intensidade da dor as em que a intensidade da

dor depende do grau de estímulo. Frequentemente, após um período de dor severa, pode haver um intervalo, durante o qual a dor não pode ser induzida, chamado de período refratário. Geralmente ocorrem após os 50 anos, com dores unilaterais que duram apenas alguns segundos ou até 1 minuto. As mais comuns na região da face são as neuralgias trigeminais e as do glossofaríngeo (Leclerq et al, 2013).

O nervo trigêmeo é um nervo misto, predominantemente sensitivo com uma pequena porção motora, responsável pela inervação da face e da cavidade bucal. A raiz sensitiva subdivide-se em três ramos: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3) inervando três dermatômos faciais distintos. A raiz motora inerva musculatura mastigatória e segue mesmo percurso do ramo mandibular, não podendo ser distinguido deste por ressonância magnética. Corresponde ao 5º par craniano, é bilateral e cada um dos elementos inerva uma hemiface, partida base do crânio pelos forames oval (V3) e redondo (V2). V1 entra na órbita ocular pela fissura orbital superior. A raiz trigeminal emerge da ponte e segue para o interior da fossa de Meckel, onde se encontra gânglio trigeminal ou gânglio de Gasser que contém corpos celulares de neurônios sensitivos. O núcleo trigeminal é amplamente distribuído no tronco encefálico do mesencéfalo à medula espinhal cervical superior (Leclerq et al, 2013).

Neuralgia trigeminal (NT), *tic douloureux*, síndrome da dor facial paroxística, doença de Fothergill, ou Prosopalgia dolorosa é um exemplo de neuropatia que acomete o nervo trigêmeo. Esta condição patológica é debilitante para o paciente porque a região orofacial é ricamente inervada e tem grande representação no córtex somatossensorial. Aspectos psicológicos e emocionais também são relevantes quando relacionados a essa região do corpo; a qualidade de vida e o desempenho das atividades diárias usuais são comprometidos (Zakrzewska, 2006, Kryzanowska e Avedaño, 2012). Muitas vezes o diagnóstico é dificultado ou retardado pela inexistência de testes e exames específicos, o que compromete a eficácia do tratamento e dificulta pesquisas científicas (Ibrahim, 2014). Apesar de haver escassez de dados, estima-se que a incidência de neuralgia trigeminal seja de 28,9 casos a cada 100.000

habitantes (Dieleman et al, 2008). Este quadro de dor crônica pode afetar pessoas de todas as idades, mas o maior número de casos ocorre a partir dos 50 anos, principalmente entre 60 e 70. Esta condição acomete mais o gênero feminino, sem diferença entre as raças (Ritter e Friedman, 2009). De acordo com Teixeira, (2001) o risco de sua ocorrência é mais elevado em pacientes hipertensos e com esclerose múltipla. Sintomas neurovegetativos, tais como salivação, lacrimejamento, rinorreia, congestão da mucosa nasal, hiperemia cutânea, ou edema da face podem acompanhar as manifestações álgicas (Teixeira, 2001). Neuralgia pós-herpética, artropatia temporomandibular, processos inflamatórios de face, afecções odontológicas, siringobulbia, doença de Paget, acromegalia, processos inflamatórios meníngeos, lesões do sistema nervoso central, síndrome estilo hioideia, neuralgia dos nervos intermediário, glossofaríngeo ou vago, miosite temporal ou síndrome de Raeder, constituem os diagnósticos diferenciais mais comuns para NT (Cruccu et al, 2006).

De acordo com a última classificação da Sociedade Internacional de Cefaleia (IHS- *International Headache Society*), neuralgias trigeminais são classificadas do ponto de vista clínico como clássicas, que incluem os casos sem déficits neurológicos e sem etiologia definida ou que decorrem potencialmente da compressão vascular da raiz do nervo trigêmeo; ou sintomáticas, quando são identificadas anormalidades estruturais que justificam a dor, excetuando se a compressão neurovascular da raiz do trigêmeo. Pertencem a este último grupo, os doentes com diagnóstico de esclerose múltipla, tumor e ou anormalidades da base do crânio, dentre outras causas (Gronseth et al., 2008).

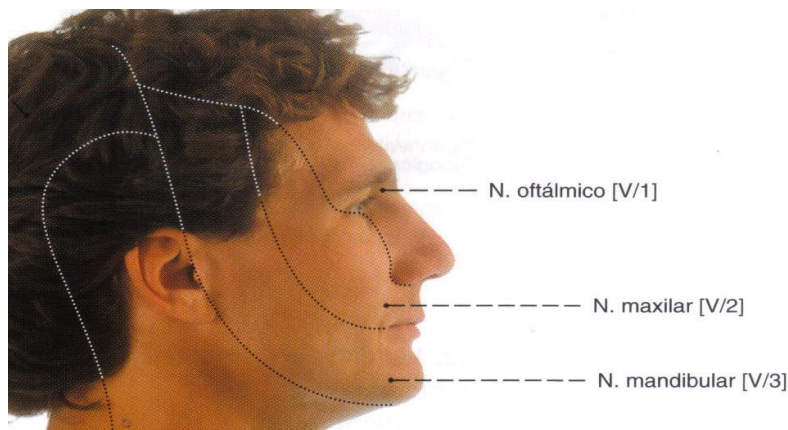


Figura 2. Dermátomo da Neuralgia Trigeminal.

Fonte: autor

Neuralgia trigeminal clássica é a mais comum, caracteriza-se por dor de forte intensidade, penetrante, cortante, do tipo choque, paroxística, descrita de acordo com a linguagem habitual do doente como *relâmpagos, ferroadas, penetração de calor de forte intensidade na face, anzóis na face*. Os pacientes sempre salientam a intensidade e o sofrimento que a dor evoca; com duração de alguns segundos até poucos minutos, unilateral na maioria das vezes. Esta dor pode ser espontânea ou surgir a partir de toque em pontos (*trigger points*) ou zonas de gatilho também chamadas de zonas algiogênicas que, quando estimulados, iniciam uma crise dolorosa na hemiface ipsilateral. No caso de existir uma zona de gatilho, há um período refratário, no final de um episódio de dor, durante o qual é possível tocar nesta zona sem causar dor (Leclercq, 2013). Estas zonas algiogênicas podem se localizar intra- ou extra oralmente e, não raro, distantes do local onde a dor é percebida. Muitas vezes o estímulo desencadeador é inocente, inofensivo, caracterizando fenômeno de alodínia. A ativação de pontos de gatilho ocorre durante atividades cotidianas como mastigação, escovação dental, lavagem do rosto, maquiagem, barbear, toque de lençol ou do vento em uma caminhada; podendo ocorrer várias vezes em intervalos de poucas horas. Exame clínico neurológico apresenta-se normal (Edlich, 2006, Zakrzewska e McMillan, 2011). Muitas teorias foram propostas para explicar a fisiopatologia da NT, mas, até o momento, nenhuma delas explica todos os aspectos clínicos desta condição. Baseado em observações clínicas, foi

sugerido que NT seja causada pela compressão do nervo trigêmeo por vasos (principalmente por artérias, mas ocasionalmente por veias) ou tumores. Como resultado da pressão sobre o nervo neste ponto, a mielina é perdida e isto leva à despolarização anormal e à reverberação, resultando em impulsos ectópicos, os quais se manifestam sob a forma de dor. A ausência de testes laboratoriais e anátomo patológicos objetivos e o amplo espectro de síndromes de dor facial tornam o diagnóstico difícil. Até o momento, o diagnóstico da NT depende estritamente da história clínica do paciente que deve preencher os critérios da IHS e da IASP (Sabalys et al, 2012).

Tabela 1 – Neuralgia de Trigêmeo: Critérios Diagnósticos Clínicos

1.Caráter	Disparo, choque elétrico, lancinante, superficial
2.Intensidade	Moderada a muito intensa
3.Duração	Cada episódio de dor dura não mais do que 2 minutos, numerosos episódios durante o dia
4.Periodicidade	Períodos de semanas, meses sem dor; também períodos sem dor entre os ataques
5.Local	Área de distribuição do nervo trigêmeo
6.Irradiação	Dentro da área do nervo trigêmeo ou além
7.Fatores desencadeantes	Estímulos inócuos como comer, lavar, falar
8.Fatores de Alívio	Frequentemente o sono, drogas anticonvulsivantes
9.Fatores associados	Zonas de gatilho da dor, perda de peso, baixa qualidade de vida, depressão

*A classificação da IHS sugere que no mínimo 4 destes devem estar presentes para se dar o diagnóstico. Quadro produzido pelo autor adaptado de Wall & Melzack- Textbook of Pain, 4thEd, Londres, Churchill Livingstone, 1999;739-760.

O mecanismo mais aceito sugere que a neuralgia trigeminal clássica se desenvolva a partir de processo de desmielinização decorrente de esclerose múltipla, malformação de Chiari presença de massa dentro das cisternas em contato com a raiz do trigêmeo e compressão neurovascular (Leclerq, 2013). Compressão neurovascular é causa mais comum,

sendo responsável por 80 a 90% dos casos (McLaughlin et al, 1999). Essa teoria é baseada em exames de imagem e cirurgias subsequentes e em análises ultraestruturais de tecido neuronal, mostrando alterações histológicas no tecido (Benes et al, 2005; Cha et al, 2011 e Chen et al, 2012). Tem sido sugerido que o contato de um vaso tortuoso ou aberrante, frequentemente a artéria cerebelar superior ou um de seus ramos, perpendicularmente à raiz nervosa do trigêmeo, na região da “zona de sua entrada” na ponte ou *root entry zone* (REZ), cause microtraumas, por sua pulsação, levando, com o tempo, à desmielinização (Love e Coakham, 2001). O mecanismo de inibição da dor e promotor do período refratário após uma crise, se deve à hiperpolarização da membrana pelo efluxo de íons de potássio por canais iônicos (Devor e Rappaport, 2002).

A neuralgia trigeminal sintomática ou secundária é subsequente a uma patologia ou lesão traumática e a dor assemelha-se àquela sentida em decorrência de lesão em nervo espinhal. Qualquer doença ou lesão da via trigeminal pode ser responsável pela neuralgia trigeminal secundária. Algo que pode ajudar na identificação do local de origem da dor é o conhecimento da anatomia e dos dermatômos envolvidos. Episódios dolorosos são longos, com duração de até 4 horas, no entanto, uma dor leve e contínua, pode persistir entre os episódios. A dor intensifica-se no período da noite, sendo descrita como superficial, em queimação ou agulhadas provocada por estímulos (nocivos ou não) na região afetada. Podem ser afetados os três dermatômos não havendo existência de pontos gatilho e período refratário (Merskey e Bogduk, 1994). Lesão do núcleo trigeminal, lesão da raiz nervosa dentro das cisternas ou da fossa de Meckel, lesão do seio cavernoso e lesão de ramo distal são exemplos de lesões da via trigeminal que podem levar a NT sintomática. Estas lesões são, muitas vezes, identificáveis em exames de imagem como ressonância magnética funcional (Leclercq, 2013). Exames de ressonância magnética funcional (fMRI) e tomografia por emissão de pósitron (PET) têm auxiliado na identificação regiões cerebrais ativadas por estímulos dolorosos (Cruccu G, Anand P, Attal N, Garcia-Larrea L, Haanpä M, Jørum E, Serra J, Jensen TS, 2004).

Há evidências de que a dor neuropática espontânea seja associada a menor atividade no tálamo contralateral, enquanto a dor provocada seja associada a aumento da atividade nas regiões talâmica, insular e somato-sensitivas (Peyron R, Laurent B, Garcia-Larrea L, 2000).

1.6 TRATAMENTOS ATUAIS

O tratamento de dores crônicas é complexo, sendo obtidos melhores resultados com tratamentos multidisciplinares. O manejo farmacológico foca o bloqueio de mecanismos que induzem ou exacerbam as crises de dor (Ferreira e Perla 2007). A abordagem terapêutica centra-se na reabilitação e manejo do quadro sintomático (Hans e Hansen, 1999), e deve ser iniciada precocemente, pois estímulos nociceptivos prolongados e generalizados aumentam a excitabilidade central induzindo danos físicos e mentais (Mailis e Papagapiou, 1993).

Terapias analgésicas para tratamento de condições dolorosas agudas e crônicas são baseadas em três classes de fármaco: anti-inflamatórios não esteroides (AINE), analgésicos opioides e fármacos adjuvantes como antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésicos locais, agonista receptor alfa-2. Tanto os AINE quanto os opioides são relacionados a uma variedade de efeitos colaterais. Além disto, alguns estágios de dor crônica, particularmente envolvendo lesões do nervo, são inadequadamente controlados por esses agentes. Os fármacos adjuvantes são frequentemente importantes, em dose adequada, na promoção de alívio da dor e na prevenção de crises dolorosas (Mailis e Papagapiou, 1993).

Ainda não existe cura para NT (Allsop et al, 2015), no entanto há casos em que ocorre remissão espontânea de sintomas. Salientando que a maioria dos pacientes experimenta episódios de dor recorrentes e necessita de tratamento (Kraft, 2008), sendo a primeira escolha é o tratamento farmacológico (Cruccu et al., 2008; Gronseth et al., 2008; Zakrzewska e Linskey, 2009).

O tratamento clínico da NT é baseado no uso de fármacos anticonvulsivantes como estabilizadores de membrana. A terapia de primeira linha deve ser a carbamazepina ou a

oxcarbazepina de acordo com as diretrizes de tratamento baseado em evidências clínicas, pela baixa toxicidade e pela relativa ausência de efeitos adversos (Gronseth et al., 2008).

Carbamazepina foi utilizada para tratar doentes com NT pela primeira vez em 1962 por Blom. Ela reduz os paroxismos e as crises desencadeadas pelo contato com os pontos de gatilho e proporciona alívio da dor em 58% a 100% dos doentes (Cruccu et al., 2008). É um anticonvulsivante que bloqueia os canais de sódio da membrana, diminuindo sua excitabilidade e atenuando seletivamente as descargas ectópicas associadas à dor na NT. É capaz de promover alívio completo da dor em poucos dias principalmente em pacientes com diagnóstico recente. Apesar de ser muito bem tolerada, pode apresentar efeitos colaterais importantes como disfunção hepática, leucopenia, náusea, cansaço e sonolência, além da possibilidade de interações medicamentosas. Seu uso deve ser iniciado com doses baixas aumentando gradativamente para minimizar esses efeitos (Cruccu et al., 2008; Gronseth et al., 2008; Zakrzewska e Linskey, 2009).

Oxcarbazepina, é um pró-fármaco da carbamazepina com eficácia semelhante e menos efeitos colaterais (Cruccu et al, 2008 e Gronseth et al, 2008). Por não usar sistema citocromo hepático, tem menos interações e é mais tolerável que carbamazepina. Os fármacos de segunda linha de tratamento são baclofeno (relaxante muscular) e lamotrigina (anticonvulsivante) (Zakrzewska e McMillan, 2011).

O tratamento de segunda linha é baseado em pouca evidência e inclui terapia adicional com lamotrigina ou troca para lamotrigina ou baclofeno. Outros fármacos anticonvulsivantes têm sido estudados em pequenos estudos abertos. O tratamento com fenitoína, gabapentina, pregabalina e valproato também têm sido sugerido como benéficos. Na emergência, infusão intravenosa de fosfetoína pode promover alívio, além de injeções locais de lidocaína em pontos-gatilho (Cruccu et al, 2008).

A eficácia do tratamento farmacológico geralmente reduz-se ao longo do tempo, havendo necessidade de aumento da dose provocando aumento dos efeitos colaterais. É

importante salientar que 30% dos pacientes não respondem ao tratamento farmacológico (Finnerup et al, 2005; Edlich, 2006 e Attal et al, 2006). Nesses casos, pode se fazer necessária uma abordagem cirúrgica, com maior índice de sucesso quando realizada precocemente. No entanto este tipo de abordagem é dificultado quando a NT afeta pacientes idosos que não apresentem boas condições de saúde geral. As técnicas cirúrgicas mais utilizadas são termocoagulação do gânglio de Gasser e descompressão neurovascular.

Na termocoagulação do gânglio de Gasser, o gânglio é lesionado por calor, injeção de glicerol ou compressão mecânica por balão. Todos estes envolvem a inserção de uma cânula através do forame oval no gânglio trigeminal, sendo realizada sob intensa sedação ou anestesia geral. Cerca de 90% dos pacientes relatam alívio imediato da dor. Pode promover alívio sintomático por até doze anos podendo ser repetida duas ou três vezes ao longo da vida. Entretanto, tem como aspecto negativo o risco de dor por desaferentação, tão debilitante quanto NT (Leclercq, 2013; Zakrzewska e McMillan, 2011).

A descompressão microvascular é a única técnica que visa preservar a função trigeminal intacta, oferece o alívio mais prolongado da dor. 90% dos pacientes relatam alívio inicial da dor e mais de 80% permanecendo sem dor após 1 ano, 75% após 3 anos e 73% após 5 anos, com melhoras sustentáveis na realização das atividades diárias. No entanto, é um procedimento cirúrgico maior, extremamente invasivo, que envolve craniotomia para atingir o nervo trigêmeo na fossa posterior. A taxa média de mortalidade varia de 0,2% a 0,5%. Salientando que até 4% dos pacientes em ambulatório têm problemas sérios como extravasamento de líquido, infartos, hematomas ou meningite asséptica. As complicações de longo prazo mais comuns são perda sensorial leve (7%) e surdez (10%) (Zakrzewska e Mcmillan, 2001).

Considerando a relevância do tema e as dificuldades de tratamento da neuralgia trigeminal, este estudo objetiva elucidar mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da dor neuropática orofacial ampliando o conhecimento sobre as bases neurobiológicas fornecendo

subsídios para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento farmacológico e não farmacológico.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Dor crônica é uma doença debilitante com consequências nefastas para a condição física mental do indivíduo. A prevalência de dor crônica na comunidade varia de 7 a 65%. De 10 a 40% dos indivíduos americanos apresenta dor com duração superior a um dia pelo menos uma vez ao ano na Nova Zelândia. Nos Estados Unidos, aproximadamente 89 bilhões de dólares são destinados anualmente ao tratamento, compensações trabalhistas e litígios envolvendo doentes com dor crônica (Siqueira e Teixeira, 2001). Além do desconforto causado pela dor, outras comorbidades como dificuldades psicomotoras, depressão e ansiedade estão relacionadas a quadros de dor crônica como artrite reumatoide, dor miofacial, fibromialgia e dores crônicas orofaciais levando a prejuízo social e econômico do paciente. Neuralgia trigeminal (NT) reduz significativamente a qualidade de vida do paciente, sendo considerada a mais agonizante das dores orofaciais. O tratamento farmacológico é a primeira escolha na NT envolvendo uso de analgésicos clássicos ou fármacos adjuvantes e estabilizadores de membrana como os anticonvulsivantes. Apesar dos anticonvulsivantes compreenderem o grupo farmacológico com melhor resposta no tratamento das neuralgias, a resposta quanto à remissão dos sintomas é ainda insuficiente. Além disto, são relacionados a importantes efeitos adversos. A associação destes fatores leva alguns pacientes a necessitarem de intervenção cirúrgica ao longo do curso da doença. Desta forma, o conhecimento das vias envolvidas na fisiopatogenia da NT reveste-se de fundamental importância para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento deste quadro.

3 HIPÓTESES

3.1 HIPÓTESE DO PROTOCOLO 1:

Na NT ocorre inibição da via gabaérgica associada à hiperativação da via glutamatérgica, sendo este o possível mecanismo fisiopatológico deste quadro de dor crônica.

3.2 HIPÓTESE DO PROTOCOLO 2:

Na NT ocorre inibição das vias gabaérgica e opioidérgica contribuindo para o estabelecimento deste quadro de dor crônica.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível envolvimento das vias de neurotransmissão gabaérgica, glutamatérgica e opioidérgica na fisiopatogenia da neuralgia trigeminal (NT) em ratos.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

a. Mensurar a resposta nociceptiva (hiperalgesia mecânica), por meio do teste de von Frey eletrônico, de animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial;

b. Avaliar o efeito da administração de agonistas gabaérgico na resposta nociceptiva observada de animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial;

c. Analisar a ação da administração de agonistas opioidérgico na resposta nociceptiva observada de animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial;

d. Apreçar o efeito da aplicação de antagonista glutamatérgico na resposta nociceptiva observada de animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial;

e. Determinar os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em gânglio trigeminal, nervo trigêmeo, soro, tronco encefálico e córtex pré-frontal de animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo teve caráter experimental, os ratos foram expostos à cirurgia orofacial para o desenvolvimento de dor neuropática orofacial. Os testes comportamentais foram realizados em diferentes etapas ao longo do estudo, proporcionando subsídios para uma avaliação temporal dos efeitos da dor neuropática. Anteriormente à indução da dor neuropática foram realizadas as medidas basais e os testes foram repetidos no sétimo e décimo quarto dia pós-operatório (estabelecimento da dor neuropática), quinze, trinta e sessenta minutos após a administração dos fármacos.

5.2 LOCAL DA PESQUISA

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nas Unidades de Experimentação Animal (UEA) e Análise Molecular e Proteínas (UAMP) do HCPA.

5.3 ANIMAIS

Foram utilizados 112 ratos Wistar machos provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde /UFRGS, entre 55 e 65 dias de idade ($\geq 250\text{g}$) ao início do tratamento.

Os animais foram alojados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em caixas-moradia, confeccionadas em polipropileno, medindo 49x34x16cm, com assoalho recoberto de serragem e com número mínimo de três e máximo de quatro animais por caixa. Ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e ração Nuvital®. Foram realizados todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto e obedecem aos Princípios Internacionais

Orientadores para a Pesquisa Envolvendo Animais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Edition Published 2011*), assim como a Lei 11794/08 de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA). Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética e uso de animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocolo GPPG/HCPA: 14-0604) e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo n. 29310).

5.4 TAMANHO DA AMOSTRA

Foram alocados 08 animais por grupo para o experimento comportamental, com base em estudos prévios da literatura utilizando os mesmos materiais e métodos propostos nesse projeto (Torres et al., 2003, Medeiros et al., 2011). Para as análises bioquímicas foram utilizados 8 animais por grupo, sendo essa proporção de animais necessária para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 90% (Torres et al, 2002a, 2002b, 2003).

5.5 FÁRMACOS

Maleato de dizolcipina (MK-801, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um antagonista de receptores NMDA (antagonista glutamatérgico), será utilizado na dose de 0,25mg/Kg (Da Silva et al., 2005).

Diazepam, 2 mg/kg (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA; (Santana et al., 2014), agonista benzodiazepínico.

Fenobarbital, 100 mg/kg (Bahareh Amin, Hossein Hosseinzadeh, 2012), agonista gabaérgico.

Morfina, 5,0 mg/kg (D'Amato et al., 1999; Torres et al., 2003), agonista μ opioidérgico.

Como anestésicos será utilizada cetamina 50 mg/kg, xilazina 5 mg/kg e para manutenção anestésica o isoflurano 2-3% (Cristália, SP, Brazil), anestésico inalatório.

Todos os fármacos foram dissolvidos em solução salina 0,9% NaCl. A administração dos fármacos foi realizada intraperitonealmente (i.p.) por profissional treinado e 15, 30 e 60 minutos após a injeção foram realizadas as avaliações pelo teste de Von Frey eletrônico.

5.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente os animais foram divididos em três grupos de acordo com o modelo experimental de dor:

- 1) Grupo Controle Total (CT):** não sofreu manipulação.
- 2) Grupo Sham (S):** os animais foram submetidos à manipulação cirúrgica, porém sem constrição do nervo.
- 3) Grupo Dor (D):** os animais foram submetidos ao modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial, por constrição do nervo infra-orbitário.

Após o estabelecimento do modelo de dor os animais foram novamente divididos em nove grupos. Para o protocolo 1, no qual avaliamos as vias gabaérgica e glutamatérgica, a divisão dos grupos ficou:

PROTOCOLO 1

- 1. Controle Total Veículo (CTV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);
- 2. Sham Veículo (SV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);
- 3. Sham +Agonista benzodiazepínico (SBz):** foi administrado diazepam i.p.;
- 4. Sham +Antagonista glutamatérgico (SGlu):** foi administrado MK-801 i.p.
- 5. Dor Veículo (DV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);
- 6. Dor + Agonista benzodiazepínico (DBz):** foi administrado diazepam i.p.;
- 7. Dor +Antagonista glutamatérgico (DGlu):** foi administrado MK-801 i.p.;

Para o protocolo 2, no qual avaliamos as vias gabaérgica e opioidérgica, a divisão dos grupos ficou da seguinte forma:

PROTOCOLO 2

{ **Controle Total Veículo (CTV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);
{ **Sham Veículo (SV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);

- 1. Sham + Agonista gabaérgico (SGa):** foi administrado fenobarbital i.p.;
- 2. Sham + Agonista opioidérgico (SOp):** foi administrado morfina i.p.
- 3. Dor Veículo (DV):** foi administrado veículo i.p. (solução salina 0,9%);
- 4. Dor + Agonista gabaérgico (DGa):** foi administrado fenobarbital i.p.;
- 5. Dor + Agonista opioidérgico (DOp):** foi administrado morfina i.p.;

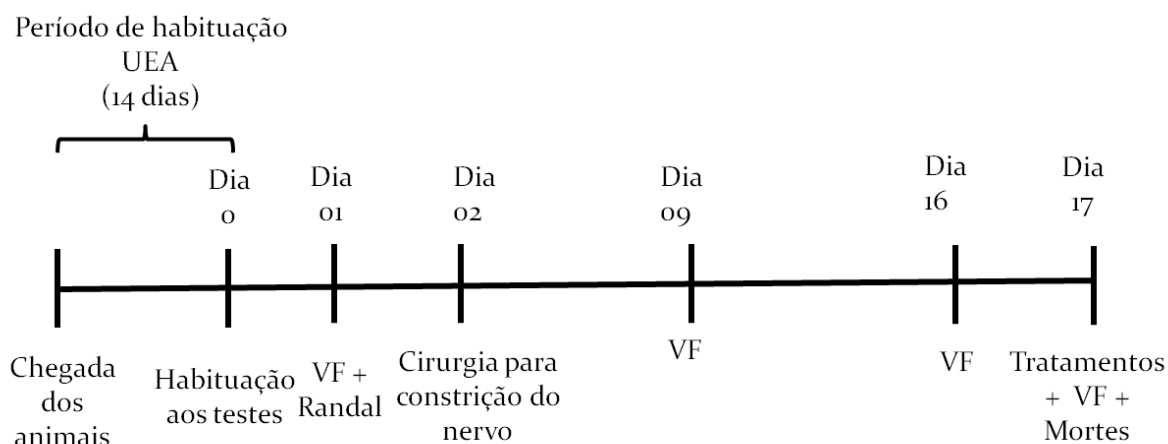


Figura 3. Fluxograma do estudo.

5.7 CIRURGIA

O modelo de dor utilizado foi constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) adaptado do proposto por Imamura em 1997 (Yoshiki Imamura Y., Kawamoto H., Nakanishi O., 1997). Sendo o nervo infraorbitário um ramo do trigêmeo, este modelo simula a neuralgia trigeminal secundária. Inicialmente, os ratos foram anestesiados com cetamina (50mg/kgi.p.) + xilasina (5mg/kgi.p.) para indução e isoflurano (2% inalatório) para manutenção. Acesso cirúrgico se deu por uma incisão intraoral na altura do primeiro molar superior que se estendeu ao longo do fundo de sulco por cerca de 1cm no sentido anterior. Os tecidos foram

dissecados e o nervo infraorbitário, exposto. Foram então realizadas duas ligaduras com fio Vicryl 4-0, mantendo 2mm de distância entre cada uma. Após a realização das ligaduras, a incisão foi suturada com fio Vicryl 5-0. Os animais foram mantidos em incubadora aquecida até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo sham foram submetidos ao mesmo procedimento de anestesia, acesso cirúrgico e sutura, porém sem a constrição do feixe nervoso. O acesso intrabucal foi realizado para que vibrissas do animal permanecessem intactas e por promover uma agressão menos lesiva ao animal quando comparado com o acesso pelo crânio. Após a cirurgia, foi administrado cloridrato de tramadol (5mg/kg i.p.) em intervalos de 12 horas nas primeiras 48 horas para alívio da dor, minimizando o desconforto dos animais.



Figura 4. Exposição do nervo infraorbitário.

Fonte: autor

5.8 TESTE COMPORTAMENTAL

O teste comportamental utilizado foi Von Frey facial eletrônico. O teste baseia-se na pressão máxima em gramas (g) necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao contato com sua pele, conforme descrito por Fruhstorfer e colaboradores(2001). Este teste avalia a sensibilidade hiperalgésica mecânica e consiste na aplicação de pressão de um bastão

metálico com uma ponta plástica sobre a área a ser testada, no caso, vibrissas. A pressão gerada é marcada no visor do aparelho mostrando assim o limiar de sensibilidade mecânica do animal. Esta é feita até que o rato faça um movimento aversivo de retirada ou tentativa de morder a ponteira. O teste comportamental foi realizado em diferentes tempos ao longo do estudo, possibilitando uma avaliação temporal dos efeitos da dor neuropática e do tratamento com os fármacos. Anteriormente à indução da dor neuropática foram realizadas as medidas basais e os testes foram repetidos no sétimo e décimo quarto dia pós-operatório, sendo que neste último em três momentos distintos: 15 30 e 60 minutos após a aplicação dos fármacos.

Para que seja mantido o cegamento dos pesquisadores nos testes comportamentais houve a participação de um terceiro pesquisador, que realizou a numeração das caixas anteriormente aos testes, sem a participação do pesquisador responsável pela avaliação comportamental. Portanto, não podendo ser identificados os animais dos grupos controle, dor ou sham.

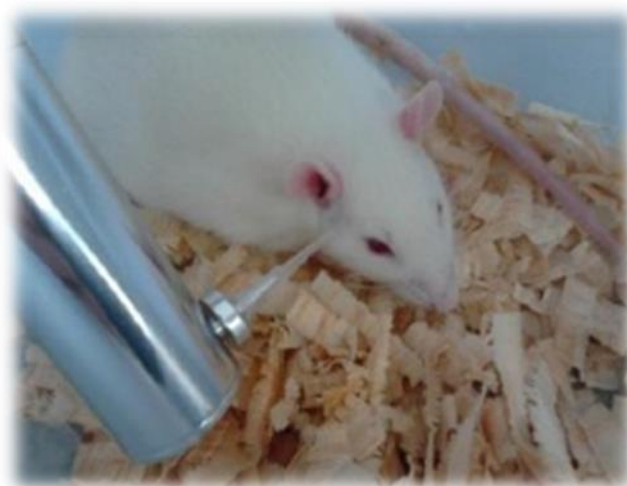


Figura 5. Teste de von Frey eletrônico facial.

Fonte: autor

5.9 MORTE DE ANIMAIS

Uma hora após a administração dos fármacos e a última avaliação comportamental os grupos controle (controle total, dor salina e sham salina) foram mortos por decapitação sem uso de anestésico. Este método foi utilizado pois este estudo utilizou estruturas cerebrais para a

verificação de níveis de BDNF que podem ser alterados pela utilização de anestesia na morte desses animais (Bickler & Fahlman, 2006; Lu et al., 2006). Os métodos farmacológicos interferem com a finalidade dos experimentos, que é observar neuroquimicamente os efeitos do tratamento no sistema nervoso central. Qualquer que fosse o fármaco utilizado para a morte, esse afetaria a fisiologia do animal de alguma maneira. Os barbitúricos, anestésicos gerais mais utilizados, são potentes hipnóticos, que produzem depressão dose-dependente do SNC. Devido ao objetivo do trabalho, que era a preservação da fisiologia do cérebro para posterior análise, precisamos utilizar a eutanásia por guilhotinamento (Bickler & Fahlman, 2006; Lu et al., 2006). Além do que, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor (Holson, 1992; van Rijn et al., 2011). Os pesquisadores têm experiência nesta forma de eutanásia, sendo utilizado equipamento específico para esse fim e foram obedecidas as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), contidas na Resolução Normativa no 13 de 20 de setembro de 2013. O sangue do tronco foi retirado para centrifugação em tubos plásticos por 5 minutos em 3000 X g a temperatura ambiente. O soro foi congelado a -80°C para posterior análise. Foram dissecados o nervo infraorbitário, o tronco encefálico, o córtex frontal e o gânglio trigeminal e armazenados imediatamente em freezer -80°C.

Considerando a questão ética os animais que não foram utilizados para retirada de material biológico foram mortos por overdose de anestésico.

5.10 DOSAGEM DE FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

O BDNF foi quantificado em córtex cerebral, tronco encefálico, gânglio trigeminal e ramo oftálmico do nervo trigêmeo. As mensurações foram realizadas por técnica de ELISA, utilizando kits comerciais.

5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos em média \pm EPM e foi considerada diferença significativa quando valor de $P < 0,05$. Os testes comportamentais foram analisados por Equações Estimativas Generalizadas (GEE, do inglês *Generalizing Estimation Equations*), os dados bioquímicos foram avaliados por ANOVA de uma via seguida de teste de *student Newman-Keuls*. Todos os dados foram analisados pelo programa SPSS versão 20.0 para Windows.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

O modelo utilizado para indução da neuralgia trigeminal foi eficaz em reduzir o limiar de dor dos animais avaliados pelo teste de *von Frey* facial. No décimo quarto dia após a cirurgia para indução da neuralgia trigeminal os animais submetidos à constrição do nervo apresentaram o limiar de retirada da face significativamente menor que os animais dos grupos controle e sham. A análise estatística (GEE) mostrou interação entre as variáveis independentes, tempo x grupo Wald $\chi^2 = 18,25; 4, P < 0,05$ (Figura 6).

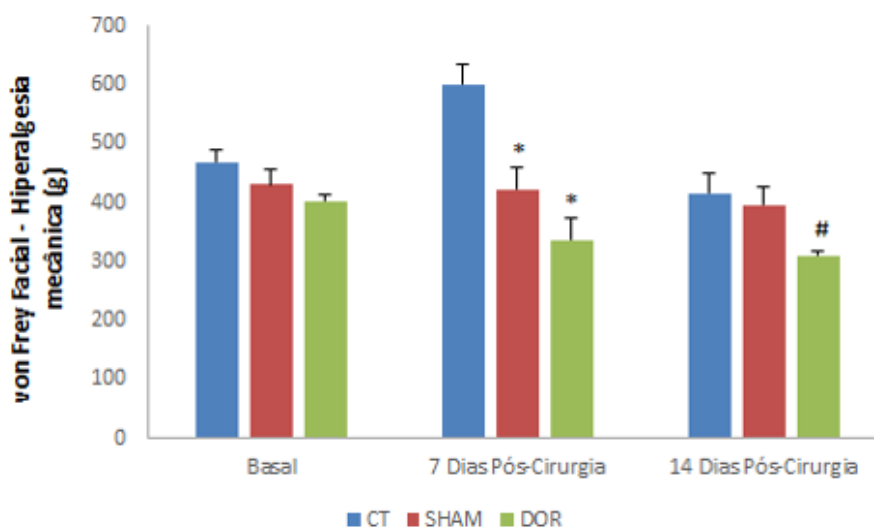


Figura 6. Hiperalgesia mecânica avaliada no teste de *Von Frey* pré fármacos. Dados expressos em Média \pm EPM(N=64). *diferença significativa em relação aos demais grupos CT sete dias após a indução do modelo; #diferença significativa em relação aos grupos CT e Sham 14 dias após a indução do modelo. GEE: Wald $\chi^2 = 18,25; 4, P < 0,05$.

6.1.1 Protocolo 1 (Benzodiazepínico/GLUTA)

O protocolo 1 avaliou a funcionalidade dos receptores benzodiazepínicos e glutamatérgicos por meio da injeção de diazepam e de maleato de dizolcipina (MK-801), respectivamente. A análise estatística mostrou interação entre as variáveis independentes, tempo x grupo (Wald $\chi^2=172,36;18$, $P<0,01$). Os animais do grupo dor que receberam agonista benzodiazepínico (diazepam) apresentaram aumento no limiar nociceptivo a partir de 15 minutos após a administração e este resultado permaneceu por até 60 minutos. Os animais do grupo dor que receberam antagonista glutamatérgico (MK-801) apresentaram aumento no limiar de retirada da face somente na avaliação realizada 60 minutos após a administração do fármaco (Figura 7).

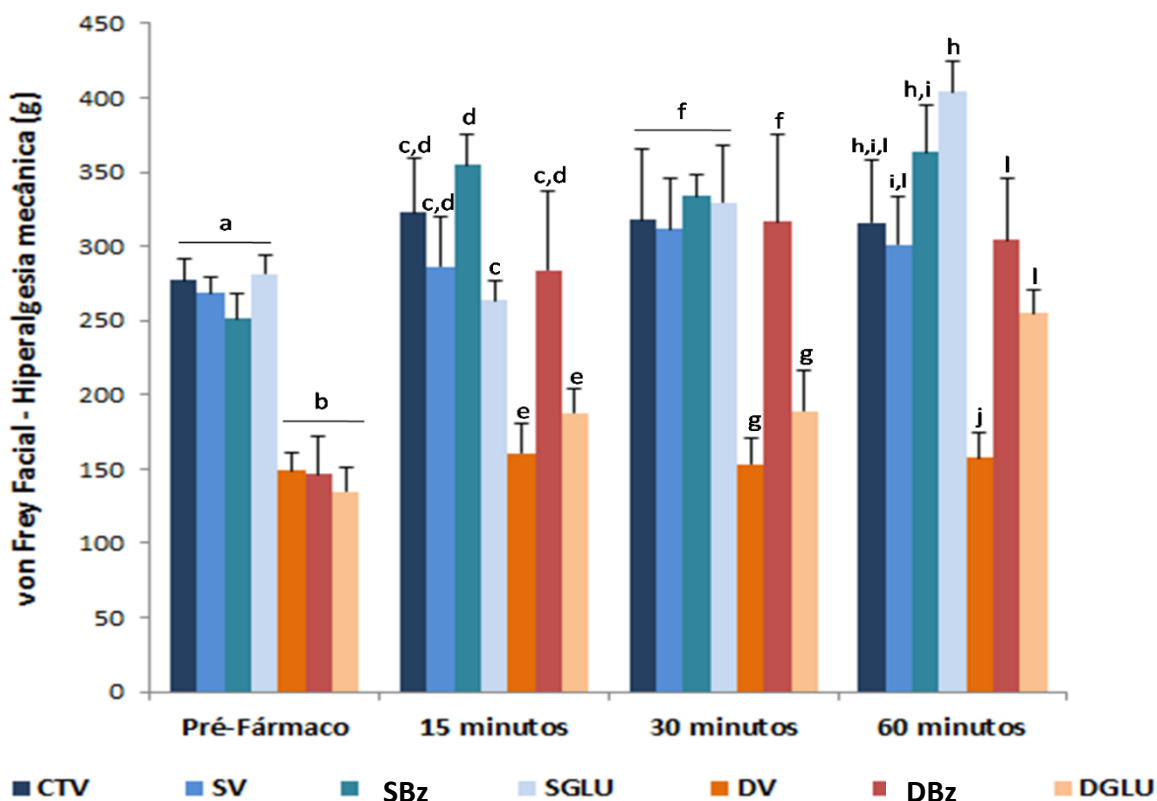


Figura 7. Hiperalgesia mecânica avaliada no teste de *Von Frey* no protocolo 1.

Dados expressos em Média±EPM(N=64). Grupos: Controle Total + Veículo (CTV), Sham+Veículo (SV), Sham+Diazepam (SBz), Sham+MK-801 (SGLU), Dor+veículo (DV), Dor+Diazepam (DBz), Dor+MK-801 (DGLU). Interação tempo x grupo (Wald $\chi^2=172,36;18$, $P<0,01$). Letras iguais: sem diferenças estatísticas, letras diferentes: diferenças estatisticamente significativas.

6.1.2 Protocolo 2 (GABA/OPIOIDE)

O protocolo 2 também avaliou a funcionalidade dos receptores gabaérgicos e opioidérgicos por meio da injeção de fenobarbital e morfina, respectivamente. A análise estatística mostrou interação entre as variáveis tempo x grupo (Wald $\chi^2=657,53;18$, $P<0,01$). Os animais apresentaram aumento no limiar nociceptivo a partir de 15 minutos após a administração de fenobarbital e este resultado permaneceu por até 60 minutos. Por outro lado, os animais que receberam morfina apresentaram um aumento no limiar nociceptivo significativamente maior que os animais que receberam fenobarbital, no entanto ambos os fármacos reverteram a hiperalgesia induzida pela exposição ao modelo de dor (Figura 8).

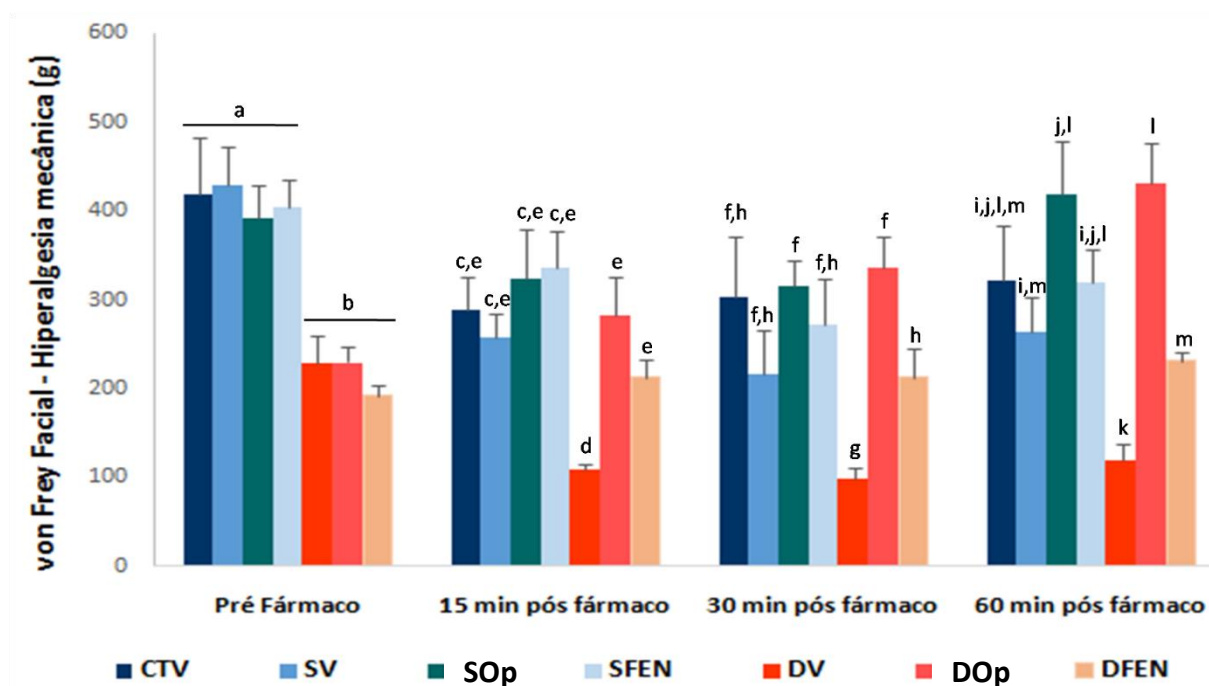


Figura 8. Hiperalgesia mecânica avaliada no teste de *Von Frey* no protocolo 2.

Dados expressos em Média+EPM(N=64). Grupos: Controle Total + Veículo (CTV), Sham+Veículo (SV), Sham+Morfina (SOp), Sham+Fenobarbital (SFEN), Dor+veículo (DV), Dor+Morfina (DOp), Dor+Fenobarbital (DFEN). Interação tempo x grupo (Wald $\chi^2=657,53;18$, $P<0,01$). Letras iguais: sem diferenças estatísticas, letras diferentes: diferenças estatisticamente significativas.

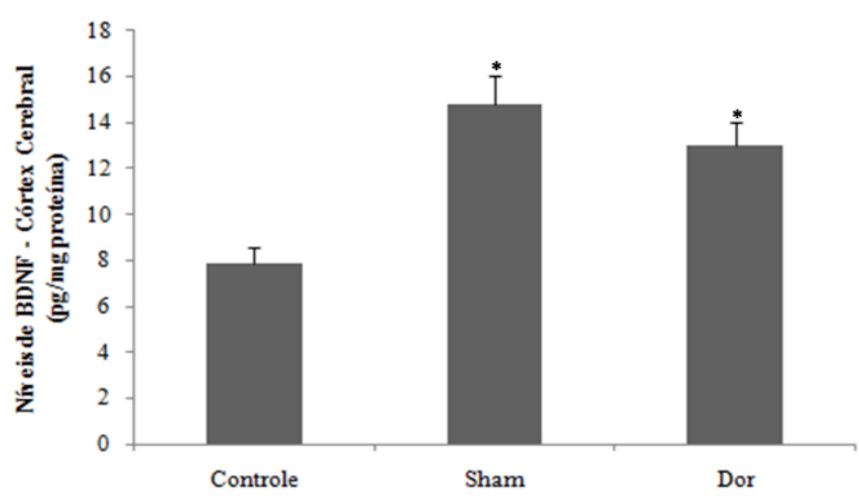
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.2.1 Níveis de BDNF

Este estudo avaliou os níveis periféricos (soro, nervo trigêmeo (ramo maxilar e gânglio trigeminal) e centrais de BDNF (tronco encefálico e córtex cerebral).

Em córtex e tronco encefálico foi observado aumento nos níveis desta neurotrofina tanto nos animais submetidos ao modelo de neuralgia trigeminal quanto aos que foram expostos apenas a cirurgia sham (ANOVA de uma via/SNK ($F_{(2,22)}=13,46$; $F_{(2,25)}=6,08$, $P<0,05$, respectivamente – Figura 9 painéis A e B).

Painel A



Painel B

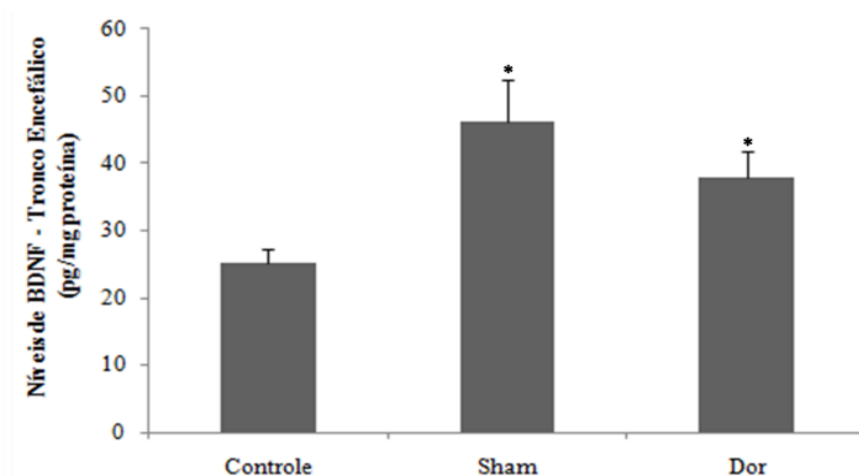


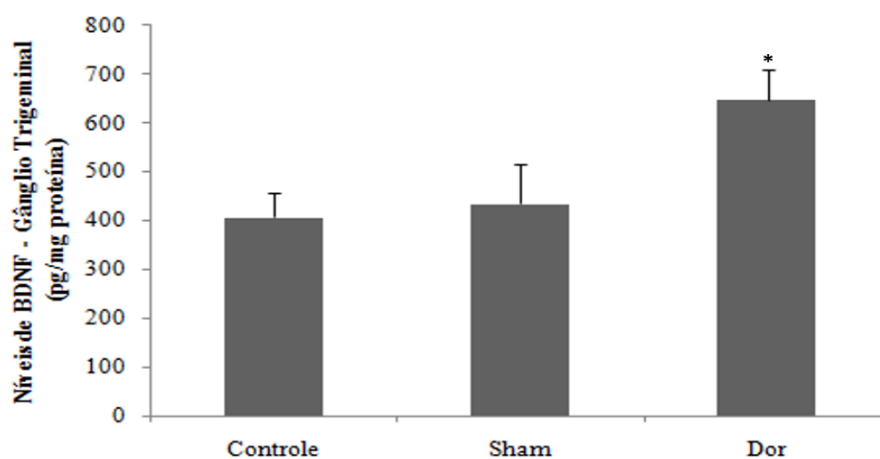
Figura 9. Níveis Centrais de BDNF.

Dados expressos em Média±EPM (N=23-26).

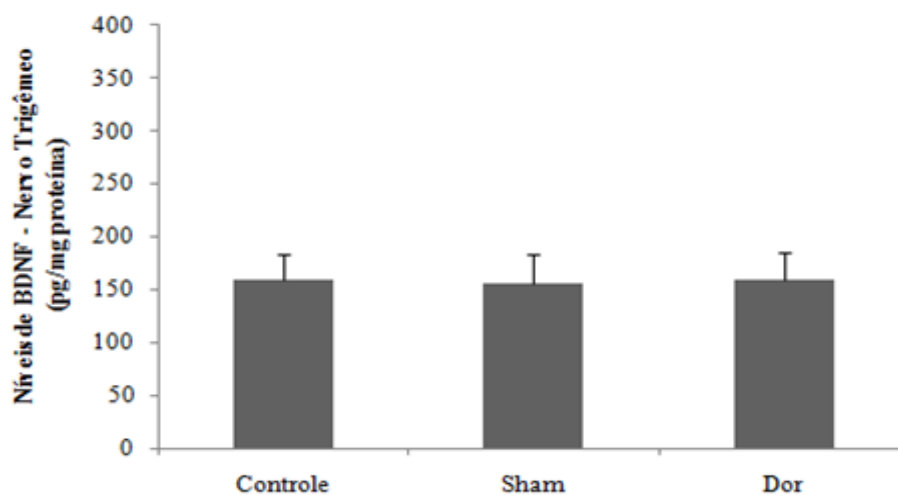
PAINEL A: nível de BDNF em córtex cerebral: * diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via/SNK, $F_{(2,22)}=13,46$, $P<0,05$). **PAINEL B: nível de BDNF em tronco encefálico:** diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via/SNK, $F_{(2,25)}=6,08$, $P<0,05$).

Em nível periférico foi observado aumento nos níveis de BDNF em gânglio trigeminal nos animais submetidos ao modelo de neuralgia trigeminal ANOVA de uma via/SNK ($F_{(2,22)}=4,09$; $P<0,05$). Em soro e nervo trigêmeo não foi observada diferença nos níveis de BDNF entre os grupos (ANOVA de uma via, $P>0,05$). (Figura 10, Painéis A,B,C).

Painel A



Painel B



PAINEL C

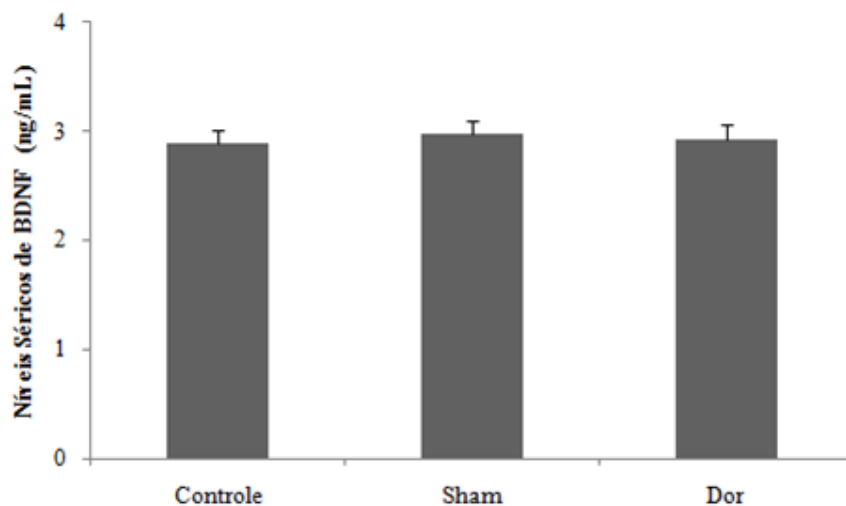


Figura 10 Níveis periféricos de BDNF

Dados expressos em Média±EPM (N=23). **PAINEL A: nível de BDNF em gânglio trigeminal:*** diferença significativa em relação aos grupos controle e sham (ANOVA de uma via/SNK, $F_{(2,22)}=4,09$; $P<0,05$). **PAINEL B e C: nível de BDNF nervo trigêmeo e soro respectivamente.** ANOVA de uma via, $P>0,05$.

7 DISCUSSÃO

Este é um estudo inovador que busca por meio de um modelo animal de neuralgia trigeminal esclarecer a participação das vias de modulação da dor (gabaérgica, glutamatérgica e opioidérgica) neste modelo de dor neuropática. Muitos fármacos têm como alvos receptores envolvidos nestas vias, no entanto há poucos estudos que investigam o real papel e as possíveis alterações nestas vias em quadros de dor neuropática.

Inicialmente nós demonstramos que o modelo utilizado reduziu o limiar nociceptivo dos animais submetidos à constrição do nervo trigêmeo (ramo infraorbitário), demonstrando que o modelo cirúrgico de neuralgia trigeminal empregado foi efetivo em induzir dor neuropática a partir do 14º dia pós-cirúrgico. A sensibilidade mecânica foi avaliada por meio da resposta nociceptiva (hiperalgesia mecânica) ao teste de *Von Frey* facial (eletrônico) em diferentes períodos visando estabelecer o momento a partir do qual a dor neuropática se instala, dissociando-a da interferência da dor inflamatória decorrente do procedimento cirúrgico.

Este resultado contraria dados da literatura que afirmam que, em modelos animais, a dor neuropática se estabelece poucos dias após a constrição de um nervo. Rifell e colaboradores (2016) afirmam que três dias após a constrição do nervo isquiático há uma redução no limiar mecânico no teste de *Von Frey* eletrônico e no limiar térmico avaliado no teste da placa quente. Por outro lado, outro estudo demonstrou que o estabelecimento de dor neuropática orofacial por constrição do infraorbitário pode se estender por até oito semanas (Kernisant et al., 2008). Em nosso estudo, avaliamos o limiar mecânico no sétimo e no décimo quarto dia pós-cirúrgico e observamos que no sétimo dia os animais do grupo cirurgia sham, que não foram submetidos à constrição do nervo, ainda apresentavam redução no limiar nociceptivo indicando presença de dor inflamatória decorrente do procedimento cirúrgico. No décimo quarto dia apenas os animais dos grupos submetidos à constrição apresentavam sinais de diminuição do limiar nociceptivo denotando a instalação da dor neuropática.

A neuralgia trigeminal é um quadro de dor orofacial intensa e debilitante em que há uma modificação na transmissão das informações nociceptivas, gerando um quadro de sensibilização central. Este processo é mediado por glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, e seus receptores ionotrópicos, que agem como canais de cátions: que podem ser do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os de cainato (receptores de cainato). E receptores metabotrópicos que são acoplados a proteínas G, e modificam a resposta dos canais de membrana e as concentrações de segundos mensageiros como o cAMP. Existem inúmeras evidências na literatura demonstrando que o bloqueio de receptores NMDA é capaz de reduzir a hipernocicepção associada à dor neuropática, tanto em modelos experimentais como na clínica. Além disso, substância P, BDNF e neurocinina A, que são liberadas juntamente com o glutamato, também contribuem para o processo de sensibilização central, pois a ativação dos seus receptores induz fosforilação de receptores NMDA, aumentando sua atividade. Também tem sido demonstrado que a lesão de nervos periféricos induz a apoptose seletiva de interneurônios gabaérgicos, resultando em redução da síntese do aminoácido inibitório GABA, com conseqüente perda do tônus inibitório na transmissão das informações nociceptivas. Ainda neste sentido, outro mecanismo que contribui para a dor neuropática é a redução da eficácia do sistema opioide na medula espinhal, que parece ser resultado tanto do aumento da expressão de mediadores considerados “anti-opioides”, bem como na redução dos receptores opioides presentes nas terminações de fibras aferentes primárias (Cruccu G. et al., 2006).

Já é sabido que os anticonvulsivantes agem por meio de diferentes mecanismos, incluindo alterações na condutância de sódio e cálcio, aumento dos níveis de GABA, redução nos níveis de glutamato e outros mecanismos ainda desconhecidos (Tremont-Lukats, I., Megeff C., Backonja M., 2000). A ativação de várias vias de sinalização intracelulares

modula substancialmente a plasticidade sináptica nos neurônios centrais e a modulação da dor crônica (Zhuo M., 2006).

Os resultados obtidos na presente dissertação demonstram que os receptores das vias gabaérgica, glutamatérgica e opioidérgica estão funcionantes, pois ao injetar os agonistas (benzodiazepínico, gabaérgico e opioidérgico) e o antagonista glutamatérgico foi observado um aumento no limiar nociceptivo alcançando os níveis dos animais controle. Demonstramos que a administração tanto de um agonista benzodiazepínico (diazepam), que é um facilitador da ação do GABA endógeno em seu receptor, ou de um agonista gabaérgico (fenobarbital), abre diretamente o canal GABA A, foi observado efeito analgésico, com aumento do limiar nociceptivo 15 minutos após a administração apenas nos animais com dor neuropática. No entanto os efeitos observados com a administração de fenobarbital, nos animais submetidos ao modelo de NT, a analgesia foi menos intensa e durante menor tempo. Estes resultados sugerem que não há alteração na funcionalidade dos receptores, mas podemos sugerir que haja uma alteração na liberação dos neurotransmissores nos animais submetidos ao modelo de NT.

Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a administração de um antagonista glutamatérgico induz aumento no limiar nociceptivo no grupo com constrição do nervo trigeminal somente em 60 min após a administração do fármaco em relação ao grupo que recebeu agonista benzodiazepínico e apresentou efeito analgésico após 15 min da administração do fármaco. Um estudo de Weifang et al. (2014) demonstrou aumento significativo da transmissão glutamatérgica atribuído ao aumento da liberação de glutamato pré-sináptico e aumento da condutância dos receptores de glutamato pós-sinápticos, nos neurônios do córtex cingulado anterior em ratos com dor neuropática diabética. Salientando que os animais dos grupos controles e sham estes fármacos não alteraram significativamente a resposta nociceptiva. Os receptores de glutamato dos neurônios sensoriais primários são exportados para terminais na pele, músculos e articulações (Kung LH et al., 2013 , Lee J, Ro

J., 2007), com grande proporção de fibras não mielinizadas. Notavelmente, 47% dos axônios periféricos sem mielina são imunopositivos para NMDA e 28% para cainato (Du, Zhou, Carlton, 2006). Em nosso estudo, a resposta hiperalgésica foi revertida mais precocemente pelo agonista benzodiazepínico do que pelo antagonista glutamatérgico. Esta diferença temporal pode ser decorrente da localização periférica dos receptores glutamatérgicos em fibras não mielinizadas, justificando o atraso na indução de analgesia. Ainda no estudo de Gong et al., (2014) destaca-se que lesões em nervo periférico levam a mudanças nas propriedades elétricas nos neurônios sensoriais de primeira ordem e que estas mudanças, na maior parte, envolvem neurônios de pequeno diâmetro. O bloqueio de NMDA, AMPA e cainato, nos tecidos periféricos atenua o comportamento nociceptivo em modelos inflamatórios e neuropáticos (Chen H., 2010; Du J., 2008; Julio-Pieper M., 2011). Estudos recentes demonstraram que os efeitos nociceptivos da transmissão glutamatérgica na periferia estão centrados no gânglio da raiz dorsal que mostrou aumento da expressão de glutamato após lesão do nervo periférico (Gong K. et al., 2014; Laursen et al., 2014).

A neurotransmissão excitatória mediada por glutamato é equilibrada pelas ações inibidoras de GABA. Uma neurotransmissão inibitória lenta, prolongada é largamente mediada por GABA B, um receptor metabotrópico amplamente expresso no sistema nervoso central e que desempenha um papel importante em muitas doenças neurológicas e na dor crônica. Estes receptores GABA B são localizados em fendas pós-sinápticas onde induzem uma inibição pela ativação de canais de K^+ , hiperpolarizando a célula pós sináptica, ou na região pré-sináptica onde suprimem a liberação de neurotransmissores inibindo canais de Ca^{++} (Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M., 2004). Os receptores não estão localizados somente nas sinapses sensíveis a GABA, mas também são expressos abundantemente em sinapses glutamatérgicas, controlando sua atividade em regiões pré e pós-sinápticas (Lacey C. et al., 2005).

Há evidências de que a ativação sustentada de receptores de glutamato, por sua vez pode afetar receptores GABA. Tratamento de neurônios corticais em cultura com glutamato resultou na perda de GABA B na superfície celular (Vargas K. et al., 2008), e excitotoxicidade induzida por NMDA em fatias de hipocampo que conduziu a um aumento nos níveis de GABA B1 e diminuiu GABA B2 - subtipos do receptor GABA B - (Cimarosti H., Kantamneni S., 2009). Estes resultados sugerem que a atividade glutamatérgica sustentada pode regular a expressão de receptores GABA B, que por sua vez afeta a excitabilidade de sinapses glutamatérgica.

Os receptores GABA B são predominantemente reciclados de volta para a membrana plasmática e degradados nos lisossomas. Um aumento excessivo nesta degradação seria um mecanismo poderoso de *down-regulation* de GABA B (Maier et al., 2010). No estudo de Maier et al. (2010) testou-se a hipótese de que uma sustentada ativação dos receptores de glutamato pode afetar os níveis de GABA B regulando a sua taxa de reciclagem e degradação lisossomal. O glutamato, por meio dos receptores AMPA e NMDA reduz a reciclagem constitutiva e aumenta a degradação lisossômica de GABA B (Maier et al. 2010).

Quanto aos receptores GABA A parece que sua modulação compensa a perda de inibição sináptica no corno dorsal da medula que contribui significativamente para as dores neuropáticas. Estes dados foram mostrados no estudo de Knabl et al., (2008), no qual a injeção intratecal de diazepam reduziu a hiperalgesia inflamatória induzida pelo calor, e a sensibilização mecânica, bem como lesão por constrição crônica de nervo, o que sugere que quando aplicado localmente o diazepam pode inibir dor neuropática. Chen et al., (2016) Adicionalmente demonstraram que uma única injeção intraperitoneal de diazepam inibia significativamente a alodinia mecânica e hiperalgesia térmica estabelecida durante pelo menos 3 semanas. Uma possibilidade para o diazepam ter um efeito tão duradouro é que ele, provavelmente induziu uma persistente síntese de neurotransmissores, alterando, assim, o ambiente sináptico.

Existem dois tipos de receptores para o diazepam, o receptor de benzodiazepínico central (CBR) e a proteína translocadora (T spo). CBR está presente exclusivamente no sistema nervoso central (SNC) sendo localizado em neurônios. Benzodiazepínicos se ligam a um domínio que regula fluxo de cloreto facilitando a ligação do GABA endógeno ao seu receptor GABA A (Chen S. et al., (2016). O agonista CBR, pode estimular a biossíntese de neuroesteroides por meio da ativação de CBR (Rego D. et al., 2001). T spo, como é nomeado o receptor periférico de benzodiazepínico, está presente em muitos tecidos e também pode promover a síntese de neuroesteroides, incluindo pregnenolona, progesterona, e alopregnanolona que desempenham papéis importantes na modulação da dor (Wei X., 2013).

Vários mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos inibidores de neuroesteroides na dor neuropática. Relatos anteriores demonstraram que t spo e seus ligantes endógenos estão presentes em células de Schwann no sistema nervoso periférico, o que facilitaria a remielinização dos nervos e regeneração via síntese de neuroesteroide, assim, resultando em um longo prazo de proteção do nervo e alívio da dor neuropática (Wei X., 2013, Loggia M. et al., 2015).

Nosso estudo testou também a viabilidade dos receptores opioidérgicos por meio da administração de morfina. O controle da dor neuropática com uso de opioides não é a primeira escolha, contudo pode haver resultados favoráveis quando utilizados em associação com fármacos adjuvantes, tais como antidepressivos e anticonvulsivantes (Miyazaki e Yamamoto, 2012). Morfina é um fármaco analgésico largamente utilizado, no entanto pacientes com dor neuropática podem ser resistentes ou menos sensíveis aos agonistas opioides sendo necessárias dosagens mais elevadas de agentes opioidérgicos para evocar os mesmos efeitos observados no alívio de outras condições dolorosas (Yekkirala, Kalyuzhny, Portoghese, 2009; Woojin et al., 2016), fenômeno conhecido como tolerância.

Os resultados obtidos nesta dissertação sugerem que apesar de os receptores das vias testadas apresentarem funcionalidade adequada, há mecanismos alterados na condução da

informação dolorosa nos animais submetidos ao modelo de dor neuropática. Nós sugerimos que estas alterações podem estar relacionadas à regulação nos níveis de BDNF centrais uma vez que há um aumento dos níveis centrais desta neurotrofina nos animais submetidos ao modelo de constrição do nervo. Este efeito nos níveis de BDNF gera importantes alterações na sobrevivência, diferenciação neuronal e na plasticidade sináptica. No estudo de Zhang e colaboradores (2000), anticorpos anti-BDNF administrados em ratos com dor neuropática induziram redução dramática no número de axônios mielinizados e diminuição no processo de regeneração de axônios. Isto indica que o BDNF desempenha um papel chave na reparação de nervos periféricos após a lesão. Outro estudo, afirma que o BDNF administrado e o liberado da microglia produziram alodinia tátil por meio da alteração do gradiente transmembrana em neurônios espinhais. Estes resultados reforçam a hipótese de que o BDNF tem importante papel na mediação de danos gerados por neuropatia periférica . É importante salientar que evidências anatômicas e funcionais suportam o papel do BDNF na geração de dor crônica por meio de receptores TrkB localizados em aferentes nociceptivos primários, em neurônios pós-sinápticos e células gliais. O BDNF está envolvido na fosforilação de proteínas reguladoras de genes, desta forma alterando a expressão gênica e desencadeando sensibilização central em longo prazo (Golan, 2015).

No presente estudo, curiosamente o BDNF aumentou também no córtex e tronco encefálico de animais submetidos à cirurgia sham, mas é importante salientar que estudo prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou índices aumentados de BDNF em tronco encefálico de ratos submetidos a um modelo de dor crônica inflamatória orofacial (Scarabelot et al., 2016). Corroborando estes dados, o estudo de Ghen (Ghen et al.2010) mostrou significativo aumento na expressão de TrkB no CDME do primeiro ao sétimo dia, atingindo o pico nos primeiros 2 dias após a lesão do nervo. Estas alterações sugerem que a ligação BDNF/TrkB modula a via de sinalização em medula espinhal estando, desta forma, envolvido na iniciação de dor neuropática.

A potenciação mediada por BDNF na transmissão excitatória no CDME parece estar associada à ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA pós-sináptico (Garraway et al., 2003; Merighi et al., 2008b). Prévio estudo mostrou que receptores de NMDA-2B na medula espinhal desempenham papel crucial na dor neuropática, no desenvolvimento do processo de sensibilização central por meio da indução da potenciação de longa duração (LTP do inglês *long term potentiation*) (Qu et al., 2009). Outros estudos indicam também que o receptor de NMDA-2B é um provável alvo de BDNF para indução da plasticidade sináptica (Di et al., 2001; Kim et al., 2006; Caldeira et al., 2007b).

BDNF induz fosforilação de subunidades NR1 e NR2B do receptor de NMDA em hipocampo e córtex cerebral (Lin et al., 1999), resultando no aumento da atividade do receptor NMDA (Kim et al., 2006; Caldeira et al., 2007b). O bloqueio da subunidade NR2B previne o aumento da neurotransmissão glutamatérgica induzida por BDNF. Logo, o receptor NMDA-2B está diretamente ligado aos efeitos do BDNF sobre a plasticidade sináptica em longo prazo em processos de aprendizado e memória (Alder et al., 2005; Bramham e Messaoudi, 2005) e ao desenvolvimento de sensibilização central e dor persistente (Zhou et al., 2008; Merighi et al., 2008). Nós sugerimos que estes mecanismos estejam envolvidos na sustentação da dor persistente após 14 dias da ligação do nervo em nosso modelo.

8 CONCLUSÃO

Em resumo este estudo demonstrou que todos os fármacos administrados reduziram a resposta nociceptiva no modelo de neuralgia trigeminal, sugerindo que há funcionalidade dos receptores testados. É possível que outras alterações na ativação das vias ou na liberação dos neurotransmissores possam estar envolvidas na fisiopatogenia deste quadro de dor neuropática orofacial. Nós avaliamos os níveis de BDNF e observamos que há um aumento desta neurotrofina nos animais submetidos ao modelo de dor sugerindo que este importante neuromodulador está envolvido em eventos neuroplásticos nestas vias resultando em alterações na funcionalidade das mesmas.

Estes foram resultados contribuem para aumentar o conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos da neuralgia trigeminal. Estudos futuros envolvendo avaliação dos níveis de neurotransmissores e a expressão dos respectivos receptores de neurotransmissores são necessários para que possamos afirmar com segurança em que nível destas vias podem estar ocorrendo modificações que levam a redução dos limiares nociceptivos.

REFERÊNCIAS

1. Allsop M., Twiddy M., Grant H., Czoski-Murray C., Mon-Williams M., Mushtaq F., Phillips N., Zakrzewska J. Pavitt S. Diagnosis, medication, and surgical management for patients with trigeminal neuralgia: a qualitative study. *Acta Neurochir*, 2015; 157:1925 – 1933.
2. Aronoff G. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. *Med Clin N Am* 100, 2016; 31 –42, 2016.
3. Attal N., Cruccu G, Haanpaa M., et al. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol*, 2006; 13:1153-1169.
4. Bahareh A., Hossein H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Fitoterapia*, 2012; 83: 888–895.
5. Basbaum A., Jessel T. The perception of Pain. In: Kandel E., Schwartz J., Jessell T. *Principles of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000; 472-491.
6. Bear M., Connors B., Paradiso M. *Neuroscience. Exploring the Brain*: New York: Willians and Wilkins Publishers, 1996; 340-345.
7. Benes L., Shiratori K., Gurschi M., et al. Is preoperative high-resolution magnetic resonance imaging accurate in predicting neurovascular compression in patients with trigeminal neuralgia? A single-blind study. *Neurosurg Ver*, 2005; 28: 131–136.
8. Bennett M., Smith B., Torrance N, Lee A. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. *Pain*, 2006: 122:289-94.
9. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., and Gassmann, M. *Physiol. Rev.*, 2004: 84; 835–867.
10. Bostock H, Campero M, Serra J, Ochoa J. Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients. *Brain*, 2005; 128:2154-63.

11. Caldeira M., Melo C., Pereira D., Carvalho R., Carvalho A., Duarte C. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, 2007b; 35: 208–219.
12. Cha J., Kim S., Kim H., et al. Trigeminal neuralgia: Assessment with T2 Vista and Flair Vista fusion imaging. *Eur Radiol.*, 2011; 21: 2633–2639.
13. Chen H., Qu F., He X., Kang S., Liao D., et al. Differential roles of peripheral metabotropic glutamate receptors in bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats. *J. Pain*, 2010; 11: 321–329.
14. Chen S., Zang Y., Zheng W., Wei X., Liu X. Inhibition of Neuropathic Pain by a Single Intraperitoneal Injection of Diazepam in the Rat: Possible Role of Neurosteroids. *Chinese Journal of Physiology*, 2016; 59(1): 9-20.
15. Chudler E., Bonica J. Supraspinal mechanism of pain and nociception. In: Loeser J., Butler S., Chapman C., Turk D., eds. *Bonicas Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001: 153 – 179.
16. Cimarosti H., Kantamneni S., Henley, J. M. *Neuropharmacology*, 2009; 56: 1088–1096.
17. Constandil L., Aguilera R., Goich M., Hernandez A., Alvarez P., Infante C., Pelissier T. Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Research Bulletin*, 2011; 86: 454– 459.
18. Costigan M., Scholz J., Woolf C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 2009; 32: 1–32.
19. Cruccu G., Biasiotta A., Galeotti F., et al. Diagnosis of trigeminal neuralgia: a new appraisal based on clinical and neurophysiological findings. In: Cruccu G., Hallett M., eds. *Brainstem Function and Dysfunction*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 2006:171-186.
20. Cruccu G., Gronseth G., Alksne J., et al. AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *Eur J Neurol*, 2008; 15:1013 e 28.

21. D'Amato F., Mazzacane E., Capone F., Pavone F. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice. *Dev. Brain Res.*, 1999; 117: 15-20.
22. Di L., Gardon F., Finardi A., Pagliardini S., Cattabeni F., Battaglia G., Missale C. NMDA receptor subunits are phosphorylated by activation of neurotrophin receptors in PSD of rat spinal cord. *Neuroreport*, 2001; 12: 1301–1305.
23. Devor M, Amir R., Rappaport Z., Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. *Clin J Pain*, 2002; 18: 4-13.
24. Do-Rego J., Mensah A., Beaujean D., Leprince J., Tonon M., Luu-The V., Pelletier G., Vaudry H. The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J. Neurochem*, 2001; 76: 128-138.
25. Du J., Zhou S., Carlton S. Group II metabotropic glutamate receptor activation attenuates peripheral sensitization in inflammatory states. *Neuroscience*, 2008; 154: 754–766.
26. Du J., Zhou S., Carlton S. Kainate-induced excitation and sensitization of nociceptors in normal and inflamed rat glabrous skin. *Neuroscience*, 2006; 137: 999–1013.
27. Dieleman J., Kerklaan J., Huygen F., et al. Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain*, 2008; 137: 681 - 688.
28. D'Amato F., Mazzacane E., Capone F., Pavone F. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice. *Dev. Brain Res.* 1999; 117: 15-20.
29. Edlich R., Winters K., Britt L., Long W. Trigeminal Neuralgia: Journal of Long-Term Effects of Medical Implants. Federation of Neurological Societies. *Neurology*, 2006; 71:1183 - 1190.
30. Ferreira M., Perla A. Dores crônicas Orofaciais. In: Wannamacher L., Ferreira MBC, eds. *Farmacologia Clínica para Dentistas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007: 231-249.
31. Finnerup N., Otto M., McQuay H., et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal. *Pain*, 2005; 118: 289-305.

32. Garcia-Recio M. e Gascón P. Biological e pharmacological aspects of the NK1-receptor. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 495704, 14 pages.
33. Garraway S., Petruska, J., Mendell L. BDNF sensitizes the response of lamina II neurons to high threshold primary afferent inputs. *Eur. J. Neurosci.*, 2003; 18: 2467–2476.
34. Gaskell H., Derry S., Stannard C., Moore R. Oxycodone for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016; Issue 7. Art. No.: CD010692. DOI: 10.1002/14651858.CD010692.pub3.
35. Gong K., Kung L., Magni G., Bhargava A., Jasmin L. Increased Response to Glutamate in Small Diameter Dorsal Root Ganglion Neurons after Sciatic Nerve Injury. *PLoS ONE*, 2014; 9(4): e95491. doi:10.1371/journal.pone.0095491.
36. Gong K., Kung L., Magni G., Bhargava A., Jasmin L. Increased Response to Glutamate in Small Diameter Dorsal Root Ganglion Neurons after Sciatic Nerve Injury. *PLOS ONE*, www.plosone.org, April 2014, Volume 9, Issue 4, e95491.
37. Gronseth G, Cruccu G, Alksne J, et al. Practice parameter: the diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence -based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (IHS). *The International Classification of Headache Disorders*, 3rd edition (beta version), 2008; 33: 629 -808.
38. Gutstein H., Akil H. Opioid Analgesics. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw – Hill; 2001: 569 – 619.
39. Hans C., Hansen M. Treatment of chronic pain with antiepileptic drugs: a new era. *Southern Medicine Journal*, 1999; 92(7): 642-649.
40. Imamura Y., Kawamoto H., Nakanishi O. Characterization of heat-hyperalgesia in experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*, 1997; 116: 97 -103.
41. J. Sandkuhler, Understanding LTP in pain pathways, *Molecular Pain* 3, 2007.

42. Jensen S. Pathophysiology of pain: from theory to clinical evidence. *European Journal of Pain Supplements*, 2008; 2: 13–17.
43. Julio-Pieper M., Flor P., Dinan T., Cryan J. Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues. *Pharmacol Rev.*, 2011; 63: 35–58.
44. Klaumann, P., Wouk A., Sillas T. Pathophysiology of pain. *Archives of Veterinary Science*, 2008; v. 13, n.1, p.1-12.
45. Keast J., Stephensen T. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J Comp Neurol*, 2000; 424: 577–587.
46. Kernisant M, Gear R, Jasmin L, Vit J, Ohara T. Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in the Rat using modified syringe needle. *J Neurosci Methods*. 2008, July 15; 172(1): 43–47.
47. Khan M, Smith MT. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules*, 2015; 20: 10657-10688.
48. Kim Y., Choi H., Colwell C. Brain-derived neurotrophic factor regulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2006; 84: 1512–1520.
49. Knabl J., Witschi R., Hösl K., Reinold H., Zeilhofer UB, Ahmadi S, Brockhaus J, Sergejeva M, Hess A, Brune K, Fritschy JM, Rudolph U, Möhler H, Zeilhofer HU. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature*, 2008 Jan; 17, 451(7176):330-4. doi: 10.1038/nature06493.
50. Kryzanowska A., Avedaño C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain and Behavior*, 2012; 2(5): 678-697.
51. Kung L., Gong K, Adedoyin M, Ng J., Bhargava A., et al. Evidence for glutamate as a neuroglial transmitter within sensory ganglia. *PLoS One* 8, 2013: e68312.

52. Lacey C., Boyes J., Gerlach O., Chen L., Magill P., Bolam J. *Neuroscience*, 2005; 136: 1083–1095.
53. Latremoliere A. e Woolf C. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain*, 2009 September; 10(9): 895–92.
54. Laursen J., Cairns B., Dong X., Kumar U., Somvanshi R., et al. Glutamate dysregulation in the trigeminal ganglion: a novel mechanism for peripheral sensitization of the craniofacial region. *Neuroscience*, 2014; 256: 23–35.
55. Leclercq D., Thiebaut J., Héran F. Trigeminal neuralgia. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 2013; 94: 993—1001.
56. Lee J., Ro J. Differential regulation of glutamate receptors in trigeminal ganglia following masseter inflammation. *Neuroscience Lett*, 2007; 421: 91–95.
57. Lent, R. Cem Bilhões de Neurônios. Atheneu, 2ª edição, 2010; 165-173.
58. Leung S., Cahill C. TNF- α and neuropathic pain - a review. *Journal of Neuroinflammation*, 2010; 7:27.
59. Loggia M., Chonde D., Akeju O., Arabasz G., Catana C., Edwards R., Hill E., Hsu S., Izquierdo-Garcia D., Ji R., Riley M., Wasan A., Zurcher N., Albrecht D., Vangel M., Rosen B., Napadow V., Hooker J. Evidence for brain glial activation in chronic pain patients. *Brain*, 2015; 138: 604-615.
60. Love S., Coakham H. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis [published correction appears in *Brain*. 2002;125(pt 3):687]. *Brain*, 2001; 124: 2347-2360.
61. Mailis A., Papagapiou M. Profile of patients admitted to the pain facility of a university affiliated acute care hospital. *Pain Clinic*, 1993; 6: 71-82.
62. Maier P., Marin I., Grampp T., Sommer A., Benke D. Sustained Glutamate Receptor Activation Down-regulates GABAB Receptors by Shifting the Balance from Recycling to Lysosomal Degradation September 7, 2010, DOI 10.1074/jbc. M110.142406. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; v 285, n. 46: 35606–35614.

63. Martinez J., Macedo A., Pinheiro D. Perfil clínico e demográfico dos pacientes com dor músculo-esquelética crônica acompanhados nos três níveis de atendimento de saúde de Sorocaba. *Acta Fisiatrica*, 2004;11:67-71.
64. McLaughlin M., Janetta P., Clyde B., Subach B., Comey C., Resnick D. Microvascular decompression of cranial nerves: lessons learned after 4400. *Neurosurg* 1999; 90: 1 -8.
65. Merighi A., Salio C., Ghirri A., Lossi L., Ferrini F., Betelli C., Bardoni R. BDNF as a pain modulator. *Prog. Neurobiol.*, 2008b; 85: 297–317.
66. Merskey, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms prepared by the International Association for the Study of Pain, 1994; 2nd ed. Seattle: IASP Press.
67. Messlinger K., Dostrovsky J., Strassman A. Anatomy and Physiology and Head Pain. In: Olsen J., Goasby P., Ramadan N., Tfelt-Hansen P., Welch K., 2006; 3 ed. 95 – 109.
68. Milan M. Descending control of Pain. *Progress in Neurobiology*, 2002; 66: 355-474.
69. Miyazaki R., Yamamoto T. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. *Anesth Analg.* 2012; v. 115, n. 1, p:182-8.
70. Morgan G., Mikhail M. Pain Management. In: Morgan GE, Mikhail MS, eds. *Clinical Anesthesiology*. Stamford: Appleton e Lange, 1996; 2eds: 274-316.
71. Ouyang W., Rutz S., Crellin N., Valdez P., Hymowitz S. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 2011; 29: 71 -109.
72. Qu X., Cai J., Li M., Chi Y., Liao F., Liu F., Wan Y., Han J., Xing G. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp. Neurol*, 2009; 215: 298–307.

73. Rieffel A., Souza J., Santos M., Horst A., Scheid T., Kolberg C., Belló-Klein A, Partata A. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Research Bulletin*, 2016; 121: 169–177.
74. Ritter M, Friedman A. Trigeminal neuralgia. A debilitating pain syndrome. *Adv Nurse Pract.*, 2009; 17: 51–52.
75. Russo C., Brose W. Chronic Pain. *Annu. Rev. Medicine*, 1998; 49:123 – 133.
76. Sabalys G., Juodzbaly G., Wang H. Aetiology and Pathogenesis of Trigeminal Neuralgia: a Comprehensive Review. *J Oral Maxillofac Res.*, 2012; 3: 2 – 4.
77. Scarabelot VL., Medeiros LF., Oliveira C., Adachi LN., de Macedo IC., Cioato SG., de Freitas JS, de Souza A, Quevedo A, Caumo W, Torres IL. Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. *Inflammation*. 2016; Jul 5.
78. Schestatsky P. Definição, Diagnóstico e Tratamento da Dor Neuropática. *Rev HCPA*, 2008; 28(3) : 177-87.
79. Serra J., Campero M., Bostock H., Ochoa J. Two types of C nociceptors in human skin and their behavior in areas of capsaicin-induced secondary hyperalgesia. *J Neurophysiol*, 2004; 91: 2770-81.
80. Sessle B., Lavigne G., Lund J., Dubner R. *Dor Orofacial* ,2010; ed. Quintessence, 2ª ed.
81. Smith AG, Singleton JR. Impaired glucose tolerance and neuropathy. *Neurologist*. 2008;14:23-9.
82. Siqueira S., Teixeira M., Siqueira J. Clinical Characteristics of patients with trigeminal neuralgia referred to neurosurgery. *Eur. Journal Dent*, 2001; 3(3): 207-212.
83. Staud R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res. Ther.*, 2006; 8: 208–214.
84. Staud R., Rodriguez, M. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol*, 2006; 2: 90–98.

85. Terman G., Bonica J., Spinal Mechanisms and their modulation. In: Loeser J., Butler S., Chapman C., Turk D. Bonicas Management of Pain. 3 ed. Philadelphia: Lippincontt Willians and Wilkins, 2001; 73-152.
86. Torrance N., Smith B., Bennett M., Lee A. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain*, 2006; 7:281-9.
87. Torres IL, Cucco SN, Bassani M, Duarte MS, Silveira PP, Vasconcellos AP, Tabajara AS, Dantas G, Fontella FU, Dalmaz C, Ferreira MB. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats-effect of morphine administration. *Neurosci Res.*, 2003 Mar; 45(3): 277-83.
88. Tremont-Lukats I., Megeff C., Backonja M. Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes: Mechanisms of action and place in therapy. *Drugs*, 2000; v. 60, p. 1029-1052.
89. Vargas K., Terunuma M., Tello J., Pangalos M., Moss S., Couve A. *J. Biol. Chem*, 2008; 283: 24641–24648.
90. Weifang L., Wang P., Hua L., Upregulation of glutamatergic transmission in anterior cingulate cortex in the diabetic rats with neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 2014; 568: 29–34.
91. Wei X., Wei X., Chen F., Zang Y., Xin W., Pang R., Chen Y., Wang J., Li Y., Shen K., Zhou L., Liu, X. The upregulation of translocator protein (18 kDa) promotes recovery from neuropathic pain in rats. *J. Neurosci.*, 2013; 33: 1540-1551.
92. Wilkins M., Li X., Smart T. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 34745–34752.
93. Woojin K., Min Joon K., Donghyun G., Byung-Il M., Heung S., Sun K. Combined Effects of Bee Venom Acupuncture and Morphine on Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain in Mice. *Toxins (Basel)*, 2016 Feb; 8(2): 33.
94. Woolf C., Mannion R. Neuropathic pain, aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*, 1999; 353:1959–1964.

95. Woolf C., Salter M. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 2000; 288:1765–1768.
96. Yekkirala A., Kalyuzhny A., Portoghese P. Standard opioid agonists activate heteromeric opioid receptors: Evidence for morphine and [d-ala²-mephe⁴-glyo¹⁵] enkephalin as selective μ - δ agonists. *ACS Chem. Neurosci.*, 2009; 1: 146–154.
97. Zakrzewska J., *Insights: facts and stories behind trigeminal neuralgia*. Trigeminal Neuralgia Association, Gainesville, 2006.
98. Zakrzewska J., Linskey M., Trigeminal neuralgia. *Clin Evid (Online)* 2009; 2009:1207.
99. Zakrzewska J., McMillan R. Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. *Postgraduate Medical Journal* 2011; 87:410 – 6.
100. Zhang J., Luo X., Xian C., Liu Z., Zhou X. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur. J. Neurosci*, 2000; 12: 4171–4180.
101. Zhuo M., Molecular mechanisms of pain in the anterior cingulate cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 2006; 84: 927–933.

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 140604

Data da Versão do Projeto: 18/03/2015

Pesquisadores:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

FABRÍCIO FINAMOR OLIVEIRA

VANESSA LEAL SCARABELOT

LICIANE FERNANDES MEDEIROS

ANDRESSA DE SOUZA

Título: INVESTIGAÇÃO DA FISIOPATOGENIA DE MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 22 de abril de 2015.

Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA

