

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

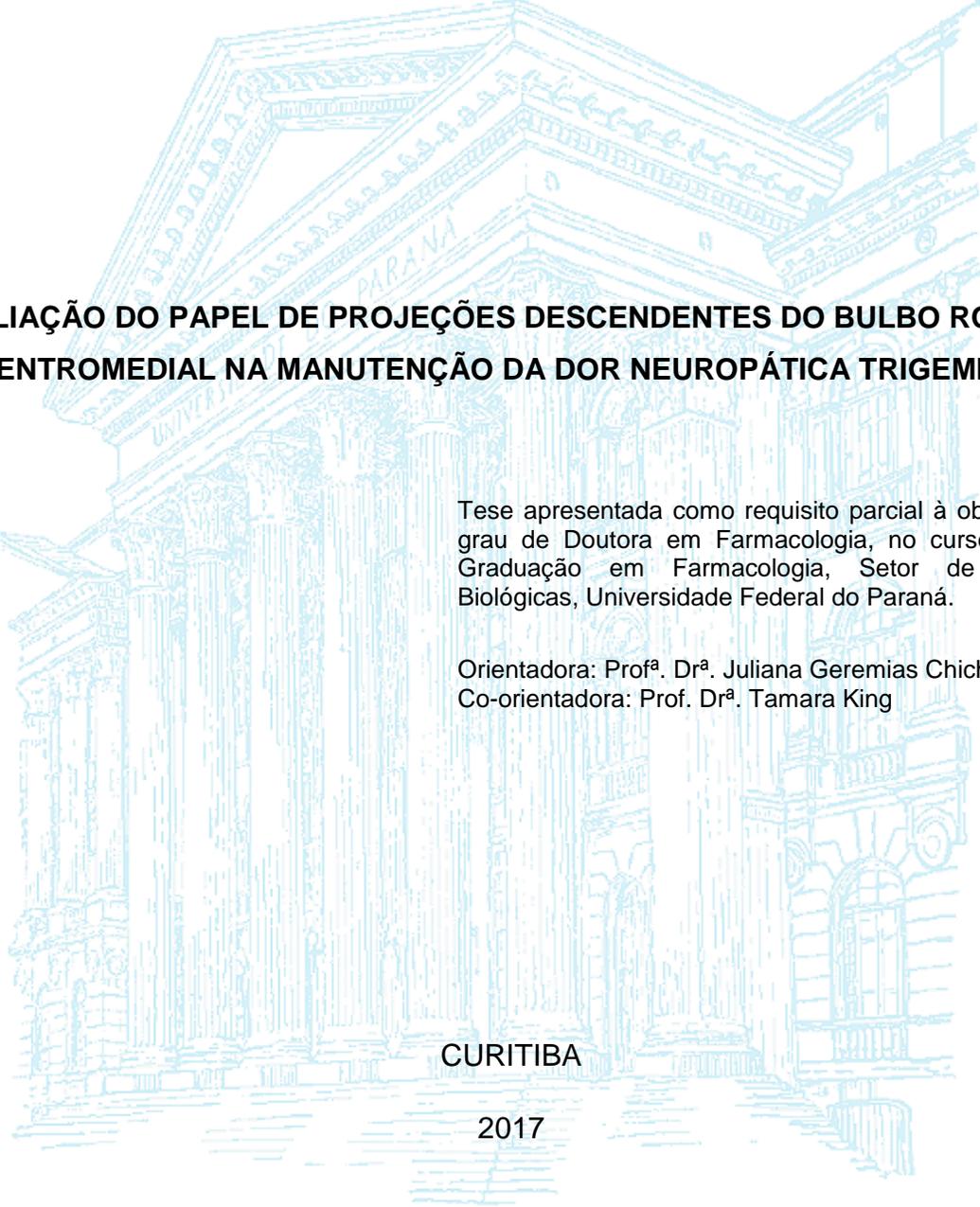
CARINA FERNANDA MATTEDI NONES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROJEÇÕES DESCENDENTES DO BULBO ROSTRAL
VENTROMEDIAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**

CURITIBA

2017

CARINA FERNANDA MATTEDI NONES



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROJEÇÕES DESCENDENTES DO BULBO ROSTRAL
VENTROMEDIAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Farmacologia, no curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Tamara King

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nones, Carina Fernanda Mattedi

Avaliação do papel de projeções descendentes do bulbo rostral ventromedial na manutenção da dor neuropática trigeminal./ Carina Fernanda Mattedi Nones. – Curitiba, 2017.

99 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Tamara King

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Hiperalgesia. 2. Dor intratável. 3. Nervo trigêmeo. I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias. III. King, Tamara. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.0472



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

ATA Nº

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de Março de dois mil e dezessete às 08:30 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **CARINA FERNANDA MATTEDI NONES** para a Defesa Pública de sua tese intitulada **AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROJEÇÕES DESCENDENTES DO BULBO ROSTRAL VENTROMEDIAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR), ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF (UNIBRASIL), LUANA FISCHER (UFPR), ELCIO JULIATO PIOVESAN (UFPR), ALEXANDRA ACCO (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

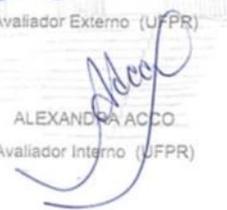
Curitiba, 29 de Março de 2017.


JULIANA GEREMIAS CHICHORRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF
Avaliador Externo (UNIBRASIL)


LUANA FISCHER
Avaliador Externo (UFPR)


ELCIO JULIATO PIOVESAN
Avaliador Externo (UFPR)


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CARINA FERNANDA MATTEDI NONES** intitulada: **AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PROJEÇÕES DESCENDENTES DO BULBO ROSTRAL VENTROMEDIAL NA MANUTENÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 29 de Março de 2017.


JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF
Avaliador Externo (UNIBRASIL)


LUANA FISCHER
Avaliador Externo (UFPR)


ELCIO JULIANO PIOVESAN
Avaliador Externo (UFPR)


ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Hortêncio e Ondina, pelo amor, dedicação, esforço, incentivo e exemplo que sempre demonstraram para mim e pelo apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar os meus caminhos, me dar força, saúde e disposição;

À minha orientadora Dra. Juliana Geremias Chichorro, pela oportunidade, confiança e valiosa orientação;

À Dra. Tamara King pela co-orientação, ajuda técnica e importantes discussões;

Aos membros da banca examinadora Dr. Élcio Piovesan, Dra. Luana Fischer, Dra. Adriana de Oliveira Christoff e Dra. Alexandra Acco, bem como à Dra. Ana Cláudia Boareto e Dra. Ana Paula Segantine, por terem aceito o convite e se disponibilizado a contribuir com o trabalho;

À querida amiga Dra. Rafaela Franco Claudino, pela parceria, intensa participação nos experimentos e discussões e pelo exemplo de pessoa que é para mim;

Ao amigo Dr. Luiz Eduardo Nunes Ferreira, pela amizade, participação no trabalho e apoio ao projeto;

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia e ao biotério da UFPR;

Aos colegas do laboratório de Farmacologia da dor pelos momentos de descontração e colaboração;

Ao Rodrigo, por estar o tempo todo ao meu lado, incondicionalmente, sempre me fazendo acreditar que era possível;

Aos meus meninos, Artur e Bruno, pela alegria de ser mãe e por me ajudarem a ser uma pessoa melhor;

À minha querida e amada família;

Aos animais que deram a vida sem direito de escolha;

À CAPES pelo suporte financeiro.

“Todo mundo é capaz de dominar a dor, exceto quem a sente”
William Shakespeare

RESUMO

Em diversos modelos de dor crônica, tem sido demonstrado que projeções descendentes provenientes do Bulbo Rostral Ventromedial (RVM, do inglês *Rostral Ventromedial Medulla*) contribuem para a manutenção de diversos aspectos da dor persistente em períodos mais tardios após a indução da dor. O modelo de constrição do nervo infraorbital (CION, do inglês *Constriction of the Infraorbital Nerve*) permite avaliar alterações sensoriais na face relacionadas à dor neuropática trigeminal. Este modelo induz hiperalgesia térmica logo nos primeiros dias, mas de curta duração, e hiperalgesia mecânica com início mais tardio, mas duração prolongada, sugerindo que diferentes mecanismos participem do desenvolvimento destas alterações sensoriais. Considerando tais observações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a participação do RVM no início e manutenção da dor neuropática trigeminal. Ratos machos *Wistar* foram submetidos à cirurgia para implante de cânulas no RVM e após 7 dias foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo. Nos dias 5 ou 15 pós-CION, os animais receberam lidocaína (sistêmica ou no RVM), tiveram a hiperalgesia ao calor ou mecânica avaliada e foram submetidos ao teste de Preferência Condicionada de Lugar (CPP, do inglês *Conditioned Place Preference*). O teste de CPP foi utilizado para investigar a presença de dor tônica pós-CION e a influência de vias facilitatórias descendentes nas alterações sensoriais observadas pós-CION. A lidocaína sistêmica bloqueou a hiperalgesia térmica e mecânica, mas não induziu CPP após a CION. Quando administrada no RVM, a lidocaína não influenciou a hiperalgesia térmica ou induziu CPP 5 dias pós-CION, mas bloqueou a hiperalgesia mecânica e induziu CPP 15 dias pós-CION. Estes resultados sugerem que vias descendentes a partir do RVM podem mediar a dor tônica e evocada em uma fase tardia, mas não inicial, no modelo de dor neuropática trigeminal. Considerando estas diferenças observadas na ação da lidocaína sistêmica e intra-RVM na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo, bem como no teste de CPP em diferentes *time-points*, pode-se sugerir que as alterações sensoriais iniciais após a constrição dependem de estruturas periféricas, enquanto as alterações mais tardias possivelmente refletem a presença de sensibilização central e são mantidas por projeções facilitatórias descendentes a partir do RVM. Estes dados sugerem que a investigação destas vias facilitatórias da dor a partir do RVM pode fornecer um novo alvo molecular para melhorar o tratamento da dor persistente associada à dor neuropática trigeminal.

Palavras-chave: dor neuropática trigeminal, Bulbo Rostral Ventromedial, hiperalgesia térmica, hiperalgesia mecânica, Preferência Condicionada de Lugar.

ABSTRACT

It has been reported that descending projections from the rostroventromedial medulla (RVM) are responsible for the maintenance of several aspects of persistent pain in latter periods after pain induction. The infraorbital nerve constriction (CION) is a well-established model to study facial sensory changes related to trigeminal neuropathic pain. CION induces early thermal, but late mechanical hyperalgesia, suggesting their mediation by different mechanisms. Thus, this study aims to evaluate RVM participation to the initiation and maintenance of trigeminal neuropathic pain. Male Wistar rats were subject to implantation of RVM cannulas and 7 days later to CION or sham surgery. At 5 or 15 days post-surgery, rats received lidocaine (systemically or into the RVM) followed by assessment of heat or mechanical hypersensitivity and assessment in the conditioned place preference (CPP) test. The CPP test was performed to investigate tonic pain post CION and the influence of descending facilitatory pain pathways in sensory changes induced by the surgery. Systemic lidocaine blocked heat and mechanical hypersensitivity, but did not induce CPP on early and late periods after CION. RVM lidocaine did not influence heat hypersensitivity or induced CPP in the early post-surgery period, but it blocked CION-induced mechanical hypersensitivity and induced CPP in the late time point. Descending pain pathways from the RVM mediate ongoing and evoked pain later, but not early following CION. The present study demonstrates that descending pain pathways from RVM could mediate late, but not early sensory changes after CION. Considering the differences in lidocaine action on thermal and mechanical hyperalgesia induced by CION, as well as in the CPP test from different time-points, the present study could speculate that early sensory changes after CION depend on peripheral trigeminal input, but late sensory changes possibly reflect the presence of central sensitization and are maintained by descending facilitatory projections from the RVM. These observations suggest that targeting pain facilitatory pathways within the RVM may provide novel molecular targets for improving treatment of persistent pain associated with trigeminal neuropathic pain.

Keywords: trigeminal neuropathic pain, rostroventromedial medulla, thermal hyperalgesia, mechanical hyperalgesia, conditioned place preference.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A TEORIA DO PORTÃO	25
FIGURA 2– MODULAÇÃO DA DOR.....	28
FIGURA 3 – AÇÃO DE AGONISTAS μ OPIOIDES EM CÉLULAS ON E OFF DO RVM	33
FIGURA 4 – DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA AO CALOR E MECÂNICA INDUZIDA PELA CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	36
FIGURA 5 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL PÓS-CION.....	56
FIGURA 6 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION.....	57
FIGURA 7 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL	59
FIGURA 8 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION.....	61
FIGURA 9 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL PÓS-CION.....	63

FIGURA 10 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION..... 65

FIGURA 11 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL 67

FIGURA 12 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION..... 69

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA AO CALOR E NO TESTE DE CPP	49
ESQUEMA 2 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-RVM COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA AO CALOR E NO TESTE DE CPP	50
ESQUEMA 3 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO TESTE DE CPP	51
ESQUEMA 4 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-RVM COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO TESTE DE CPP	52
ESQUEMA 5 – INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA AO CALOR E MECÂNICA INDUZIDA PELA CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO E NO TESTE DE CPP EM DIFERENTES TIME-POINTS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5 hidroxitriptamina
CCK	Colecistocinina
CION	<i>Constriction of the Infraorbital Nerve</i> – Constrição do Nervo Infraorbital
CPP	<i>Conditioned Place Preference</i> – Preferência Condicionada de Lugar
DLF	<i>Dorsolateral funiculus</i> – Funículo Dorsolateral
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
IHS	<i>International Headache Society</i> – Sociedade Internacional para o Estudo das Cefaleias
LC	Locus Ceruleus
NA	Noradrenalina
PAG	<i>Periaqueductal Grey</i> – Substância Cinzenta Periaqueductal
RTX	Resiniferotoxina
RVM	<i>Rostral Ventromedial Medulla</i> – Bulbo Rostral Ventromedial
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> – Erro Padrão da Média
TN	<i>Trigeminal Neuralgia</i> – Neuralgia do trigêmeo
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i> – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
VLF	<i>Ventrolateral Funiculus</i> – Funículo Ventrolateral
WDR	<i>Wide Dynamic Range</i> – Ampla Faixa Dinâmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 NEURALGIA DO TRIGÊMEO	17
1.1.1 Classificação e Fisiopatologia	17
1.1.2 Diagnóstico	19
1.1.3 Controle Farmacológico	20
1.2 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL	22
1.3 MODULAÇÃO ENDÓGENA DA DOR.....	24
1.3.1 RVM e dor	31
1.4 MODELOS ANIMAIS.....	34
1.4.1 Constrição do nervo infraorbital (CION, do inglês <i>Constriction of the Infraorbital Nerve</i>)	34
1.4.2 Preferência Condicionada de Lugar (CPP, do inglês <i>Conditioned Place Preference</i>)	36
2 HIPÓTESE	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAIS.....	41
4.1.1 Animais	41
4.1.2 Drogas.....	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Procedimentos cirúrgicos	42

4.2.1.1 Canulação do RVM	42
4.2.1.2 Constrição do nervo infraorbital.....	43
4.2.2 Administração de drogas.....	44
4.2.2.1 Injeções no RVM	44
4.2.2.2 Injeções sistêmicas	45
4.2.3 Testes comportamentais	45
4.2.3.1 Avaliação da Hiperalgisia ao calor	45
4.2.3.2 Avaliação da Hiperalgisia mecânica.....	45
4.2.3.3 Teste de CPP	46
4.2.3.4 Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>)	48
4.2.4 Protocolos experimentais	49
4.2.5 Verificação dos tecidos	53
4.2.6 Análise estatística	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION.....	55
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION.....	58
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION	62
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION	66
5.5 RESUMO DOS RESULTADOS.....	70
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	80

REFERÊNCIAS..... 81

ANEXO..... 93

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEURALGIA DO TRIGÊMEO

1.1.1 Classificação e Fisiopatologia

Os primeiros relatos de Neuralgia do Trigêmeo (TN – do inglês *Trigeminal Neuralgia*) foram registrados a milhares de anos. Aretaeus (150 d.c.) ficou conhecido por ser o primeiro pesquisador a descrever dores de cabeça hemicranianas paroxísticas, acompanhadas por espasmos faciais e desmaios (Eboli *et al.*, 2009). Uma descrição mais detalhada foi registrada no ano de 1671, por Johannes Bausch, que sofria de dor na forma de choque no lado direito da face e se tornou incapaz de falar ou comer, o que o levou à desnutrição. Alguns anos mais tarde, em 1677, John Locke, um famoso médico e filósofo, descreveu com detalhes, em uma série de cartas, a condição dolorosa de uma paciente (Pearce, 2003). Desde então vários pesquisadores têm contribuído para o entendimento e caracterização desta patologia.

Apesar de ser uma condição rara, com prevalência entre 0,01 e 0,3% na população em geral (Iasp, 2013), a TN é muito debilitante e reduz significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Montano *et al.*, 2015), sendo relatada como causadora de dor extremamente intensa (Leocádio *et al.*, 2014). Esta patologia apresenta taxa de incidência de aproximadamente 12,5 a cada 100.000 por ano (Koopman *et al.*, 2009).

A TN ocorre com maior frequência em mulheres (3:1) e pode surgir pela primeira vez em qualquer idade, porém na grande maioria dos casos ocorre entre os 37 e 67 anos (De Toledo *et al.*, 2016). Segundo a última classificação da Sociedade Internacional para o Estudo das Cefaleias (IHS, do inglês *International Headache Society*), ainda na versão beta, a TN é definida como dor recorrente, unilateral, tipo choque elétrico, breve, de início e fim abruptos, e limitada ao território de distribuição de uma ou mais ramificações do nervo trigêmeo, podendo ser iniciada por estímulos inócuos. A TN pode surgir sem causa aparente e pode haver ou não, adicionalmente, dor facial persistente de intensidade moderada (Headache Classification Committee of the International Headache, beta

version, 2013).

O ramo do trigêmeo mais associado a estes sintomas pode variar de acordo com o paciente. No entanto, a ramificação mais afetada é a maxilar (35%), seguida pela mandibular (29%) e pela associação destas duas ramificações (19%). O ramo oftálmico é afetado em apenas 4% e as três divisões juntas em 1% dos pacientes (Edlich *et al.*, 2006).

Considerando que uma porção importante dos pacientes com TN reportam dor espontânea além dos ataques de dor (Ichida *et al.*, 2015; Younis *et al.*, 2016), a IHS propôs na sua mais recente classificação uma divisão da TN clássica em 2 formas: 1) TN clássica puramente paroxística e 2) TN clássica com dor facial persistente (Headache Classification Committee of the International Headache, beta version, 2013). Entretanto, os potenciais mecanismos envolvidos na dor persistente ainda são desconhecidos.

A causa mais aceita da TN está associada à compressão da raiz do nervo trigêmeo próximo do tronco cerebral (zona de entrada da raiz) por um vaso sanguíneo, normalmente a artéria cerebelar superior (Marinkovic *et al.*, 2009), o que leva a compressão mecânica das fibras e demielinização secundária (Obermann *et al.*, 2011), provavelmente mediada por danos isquêmicos microvasculares (Marinkovic *et al.*, 2007). Estas alterações reduzem o limiar de excitabilidade destas fibras e promovem propagação inapropriada de impulsos nervosos para as fibras adjacentes (Marinkovic *et al.*, 2007). Pode ocorrer a chamada transmissão efática, onde a passagem de um impulso através de um axônio provoca uma mudança na excitabilidade da membrana de outro axônio (Kamermans e Fahrenfort, 2004). Assim, os sinais táteis transmitidos por fibras mielinizadas A β , por exemplo, podem ativar diretamente fibras A δ , resultando em descargas de alta frequência e ataques paroxísticos de dor, característicos da TN. Depois de poucos segundos, estes disparos param espontaneamente e são seguidos por um breve período de inatividade, que lembra o período refratário observado clinicamente (Forssell *et al.*, 2007).

O alívio da dor em cerca de 90% dos pacientes após a cirurgia de descompressão do nervo é um forte indicador da relevância deste mecanismo. No entanto, a recorrência de dor ocorre em cerca de 30% dos pacientes 5 anos após a realização deste

procedimento (Gronseth *et al.*, 2008).

Evidências indicam que alterações periféricas, especialmente na zona de compressão, contribuem para a geração dos ataques de dor na TN. Nesse sentido, o estudo de Siqueira e colaboradores demonstrou um aumento na expressão de canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.3 em amostras de tecido gengival de pacientes com TN e discutiu este achado como um correlato patofisiológico da TN (Siqueira *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos indicam o envolvimento de fatores centrais, sugerindo uma facilitação central e hiperexcitabilidade do sistema trigeminal, mantida por mecanismos periféricos e centrais (Obermann *et al.*, 2007). O estudo de Obermann e colaboradores avaliou pacientes com TN e observou que, após estimulação isolada nos três ramos do nervo trigêmeo, os mesmos reportaram dor em ambos os lados da face, sintomático e não sintomático. Isto pode ser reflexo de um mecanismo de adaptação supraespinal associado ao desenvolvimento da dor crônica (Obermann *et al.*, 2008).

A sensibilização dos neurônios de segunda ordem de ampla faixa dinâmica (WDR, do inglês *Wide Dynamic Range*) na lâmina V do corno dorsal tem sido discutida como um mecanismo patofisiológico adicional para a TN. Considerando que estes neurônios recebem informações convergentes de fibras táteis e nociceptivas, a sensibilização dos mesmos pode facilitar a transmissão nociceptiva e promover a percepção da dor em resposta a estímulos táteis (Obermann *et al.*, 2011).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da TN depende de uma descrição criteriosa, por parte do paciente, dos ataques de dor. Muitas vezes a comunicação entre pacientes, médicos e pesquisadores é dificultada por uma inconsistência terminológica, o que dificulta a avaliação dos critérios diagnósticos, os quais devem considerar o fenótipo clínico e a etiologia da TN (Cruccu *et al.*, 2016).

De acordo com a IHS, o diagnóstico de TN pode ser feito quando pelo menos três ataques de dor facial unilateral ocorrem de acordo com os seguintes critérios:

envolvimento de uma ou mais divisões do nervo trigêmeo, sem irradiação além da distribuição trigeminal, e dor com pelo menos 3 das seguintes características: a) recorrência de ataques paroxísticos com duração de alguns segundos até 2 min; b) intensidade severa; c) dor semelhante a choque elétrico, tiro ou facada; d) dor iniciada por estímulos inócuos. Importante ainda são características como falta de déficit neurológico não relacionado à TN e dor evidente não atribuída à outra desordem (Montano *et al.*, 2015).

1.1.3 Controle Farmacológico

A abordagem inicial para o tratamento da TN é sempre não invasiva, farmacológica, e geralmente ocorre sob a forma de monoterapia. A terapia combinada ou associação com diferentes classes de fármacos analgésicos pode ser planejada quando não há resposta ao tratamento inicial (Cheshire, 2007).

Para aproximadamente 75% dos pacientes com TN a dor pode ser controlada com tratamento farmacológico (Obermann, 2010). O alívio da dor é reportado inicialmente em cerca de 80%, que reduz a menos de 50% com o passar do tempo. O tratamento cirúrgico pode ser uma opção para esta proporção de pacientes que não são responsivos à terapia medicamentosa (Hitchon *et al.*, 2016).

As drogas anticonvulsivantes são as mais utilizadas para o controle da dor em pacientes com TN. Carbamazepina e oxcarbazepina são considerados fármacos de primeira linha no tratamento da TN. Embora ainda seja necessária comprovação de que ambas tenham a mesma eficácia no alívio da dor, a oxcarbazepina apresenta um perfil de segurança mais favorável, devido às suas características farmacocinéticas. Como fármacos de segunda linha estão o baclofeno e a lamotrigina (apresentam nível C de evidência, cuja literatura compreende apenas relatos de casos, sem estudos clínicos controlados) (Cruccu *et al.*, 2008). O efeito analgésico destas drogas em pacientes com TN foi descrito pela primeira vez na década de 40 (Bergouignan, 1970) e este achado foi confirmado por diferentes estudos clínicos alguns anos mais tarde (Campbell *et al.*, 1966;

Killian e Fromm, 1968; Lindstrom e Lindblom, 1987; Lechin *et al.*, 1989). Atualmente, a carbamazepina é o único tratamento aprovado pela agência norte americana FDA (*Food and Drug Administration*) para a TN (FDA, 2016), sendo a droga de escolha para o tratamento e apresentando uma redução da dor em 70% dos casos (Ambrosio *et al.*, 2002; Van Kleef *et al.*, 2009; Zakrzewska, 2013).

O efeito da carbamazepina pode ser relacionado ao bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem, o que resulta na estabilização de membranas neurais hiperexcitadas, inibição de disparos repetitivos ou redução da propagação de impulsos sinápticos (Cheshire, 2007; Al-Quliti, 2015).

A dose recomendada é de 200 a 1200 mg/dia e a efetividade do tratamento da dor em pacientes com TN foi demonstrada em diferentes estudos (Campbell *et al.*, 1966; Rockliff e Davis, 1966; Zakrzewska e Linskey, 2014; Al-Quliti, 2015). Pacientes reportam redução na frequência e intensidade dos paroxismos dolorosos e melhora na dor espontânea e ataques de dor por estimulação das zonas de gatilho (Campbell *et al.*, 1966). No entanto, o tratamento contínuo com carbamazepina, bem como com outras drogas anticonvulsivantes, pode resultar em uma série de efeitos adversos como sonolência, tontura, ataxia, diplopia, visão turva, náusea, boca seca, constipação e diarreia (Cheshire, 2007; Attal *et al.*, 2010; Al-Quliti, 2015). Além disso, muitos pacientes submetidos a doses repetidas de carbamazepina podem ficar refratários à medicação (Attal *et al.*, 2010). Este efeito possivelmente está relacionado à ação indutora do sistema citocromo P450, o que resulta em uma redução da eficácia do tratamento pelo aumento do metabolismo ao longo do tempo (Cabrera *et al.*, 2009). Estes dados justificam a necessidade de estudos que caracterizam os mecanismos que medeiam a TN e exploram novas estratégias para o tratamento.

Uma opção alternativa para o tratamento de crises agudas de dor da TN é o bloqueio nervoso, realizado através da administração de um anestésico local, como a lidocaína, o que pode aliviar a dor temporariamente (Kanai *et al.*, 2006; Zakrzewska e Linskey, 2014). O bloqueio nervoso com anestésicos locais pode ainda ser associado com o tratamento sistêmico com carbamazepina. Esta associação permite o uso de doses menores de carbamazepina e, conseqüentemente, menor incidência de efeitos adversos

(Lemos *et al.*, 2010). Os anestésicos locais atuam através do bloqueio de canais de sódio, inibindo assim, o fluxo de íons e a consequente propagação dos potenciais de ação (Wolfe e Butterworth, 2011; Ogle e Mahjoubi, 2012).

Importante ainda considerar que a TN pode apresentar períodos de remissão, os quais são bastante variáveis e tendem a diminuir com o passar do tempo e os ataques de dor muitas vezes são mais duradouros (Zakrzewska e Linskey, 2014).

Tal contexto denota a importância do conhecimento das características anatômicas do sistema sensorial trigeminal, bem como de suas peculiaridades na transmissão nociceptiva.

1.2 SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL

A face e a cavidade oral são inervadas pelo nervo trigêmeo ou V par craniano, cuja função é principalmente sensorial. O nervo trigêmeo é composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular. O ramo oftálmico é puramente sensorial e inerva a porção frontal do crânio, órbita ocular, mucosas sinusais e cavidade nasal. O ramo maxilar inerva o lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O ramo mandibular inerva estruturas como lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua (Waite e Ashwell, 2004). Os dois primeiros ramos do nervo trigêmeo são sensoriais, enquanto que o ramo mandibular apresenta além de ramos sensoriais, ramos motores que inervam os músculos responsáveis pela mastigação (Fried *et al.*, 2001).

Os neurônios que integram esses diferentes ramos do nervo trigêmeo apresentam uma morfologia pseudounipolar, caracterizada por um único axônio que se divide em um ramo periférico e um ramo central (Thalakoti *et al.*, 2007). As mesmas características da inervação fornecida pelo nervo trigêmeo em humanos são observadas em ratos, bem como as mesmas ramificações periféricas principais (Benoliel e Eliav, 2008).

As fibras responsáveis pela inervação periférica orofacial podem ser divididas em $A\alpha/A\beta$, $A\delta$ e C, as quais são responsáveis por detectar estímulos inócuos ou nocivos. São assim divididas por apresentarem diâmetros/calibres, velocidade de condução axonal e envolvimento na transmissão de informação de modalidades sensoriais diferentes (Sessle, 2000; Lazarov, 2002). As fibras $A\alpha$ e $A\beta$, responsáveis pela detecção de estímulos táteis e proprioceptivos, são altamente mielinizadas, calibrosas e apresentam elevada velocidade de condução (40-120 m/s). As fibras com terminações livres e responsivas a estímulos nocivos são chamadas de nociceptores e classificadas em fibras $A\delta$ e C. As fibras $A\delta$ possuem calibre e velocidade de condução intermediários (5-35 m/s); enquanto que as fibras não mielinizadas, ou fibras C, são de pequeno calibre e apresentam baixa velocidade de condução (0,5-2 m/s) (Dubner e Bennett, 1983).

Os corpos celulares da maior parte dessas fibras sensoriais encontram-se no gânglio do trigêmeo, também denominado de gânglio semilunar ou gânglio de Gasser; enquanto que os corpos celulares das fibras motoras localizam-se no tronco cerebral, mais especificamente no núcleo motor (Sessle, 2000; Davies *et al.*, 2010).

Os neurônios periféricos que possuem seus corpos celulares no gânglio do trigêmeo atravessam o tronco cerebral ao nível da ponte, e se projetam para um complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo (Sessle, 2006). Este complexo pode ser dividido em núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal. O núcleo sensorial principal funciona como uma estação de retransmissão dos impulsos táteis das diversas regiões orofaciais. Os neurônios que fazem sinapse no núcleo do trato espinhal participam principalmente da transmissão dos estímulos periféricos nocivos para os neurônios de segunda ordem (Sessle, 2000).

O núcleo do trato espinhal é subdividido em três diferentes subnúcleos, da parte rostral para a caudal: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis* (Sessle, 2000; 2006). Estes subnúcleos possuem a capacidade de intercomunicação, pois neurônios de um subnúcleo podem projetar-se para os outros subnúcleos (Sessle, 2006).

O subnúcleo *caudalis* é uma das estruturas do tronco encefálico de grande importância para o processo nociceptivo orofacial, devido à peculiaridade anatômica e neuronal. Ele é o único subnúcleo que apresenta divisão laminar, assim como a medula

espinhal. Sua principal função é o processamento da maioria das informações nocivas provenientes das regiões orofaciais, pois é neste subnúcleo, mais especificamente nas lâminas I, II, V e VI, que ocorrem as projeções da maioria das fibras A δ e C, responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos (Sessle, 2000; 2006). Além disso, este subnúcleo apresenta grande concentração de mediadores químicos (como substância P e glutamato) e receptores relacionados com a transmissão nociceptiva, bem como de mediadores químicos, como serotonina ou 5 hidroxitriptamina (5-HT), encefalina e ácido gama-aminobutírico (GABA), envolvidos na modulação da dor (Sessle, 2005).

Os neurônios de segunda ordem, presentes no núcleo do trato espinhal, quando ativados, são responsáveis pela transmissão das informações nociceptivas para diferentes regiões do sistema nervoso central (Sessle, 2006). O tálamo é uma das principais estruturas centrais envolvidas na condução dos estímulos nociceptivos. A partir dele, neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex cerebral resultando no processamento dos aspectos cognitivos e afetivos da dor (Julius e Basbaum, 2001).

A transmissão dos estímulos nociceptivos pode ser modulada por vias descendentes de origem no tronco cerebral, em diferentes estruturas que, através de conexões entre si e diferentes neurotransmissores, inibem ou facilitam a transmissão nociceptiva (Malcangio e Bowery, 1996; Julius e Basbaum, 2001).

1.3 MODULAÇÃO ENDÓGENA DA DOR

Uma sequência de ideias e observações desde o início do século XIX tem contribuído para a definição dos conceitos sobre a natureza e os mecanismos envolvidos na modulação da dor (Perl, 2007). A teoria do Portão, publicada em 1965, propôs um mecanismo para o controle endógeno da dor (FIGURA 1). Ela é baseada na modulação da transmissão nociceptiva através de interneurônios inibitórios localizados no corno dorsal da medula espinhal, os quais, quando ativados, diminuem a condução de estímulos nociceptivos para o sistema nervoso central (Moayedi e Davis, 2013).

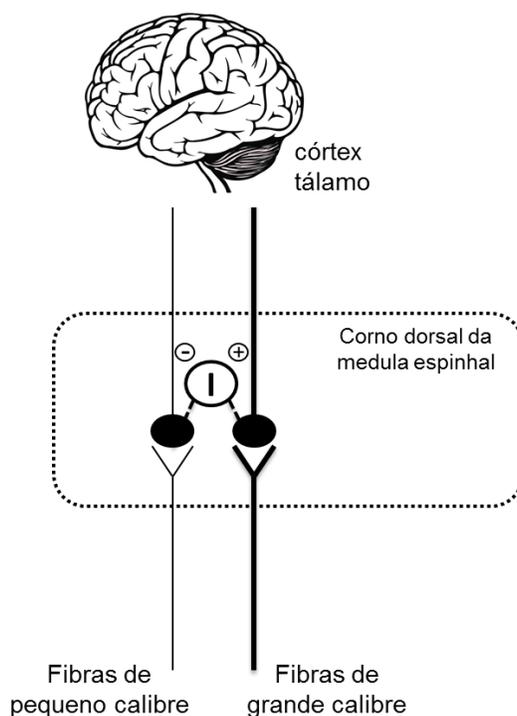


FIGURA 1 – A TEORIA DO PORTÃO

Fibras nociceptivas primárias de pequeno e grande calibre realizam sinapses com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal e a informação é conduzida para regiões do sistema nervoso central, como tálamo e córtex. Quando fibras de grande calibre são ativadas ocorre ativação de interneurônios inibitórios, que atuam na diminuição da transmissão do estímulo. Quando há ativação de fibras de pequeno calibre os interneurônios inibitórios são inibidos, permitindo a transmissão do estímulo doloroso. A indicação "I" representa um interneurônio inibitório.

Na época em que a Teoria do Portão foi publicada dificilmente se suspeitaria da existência de diferentes mecanismos envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva. Atualmente sabe-se que várias classes de neurônios, fibras aferentes primárias e vias descendentes a partir do cérebro exercem uma importante influência modulatória na transmissão nociceptiva. Diferentes mecanismos podem reforçar ou impedir a passagem desta informação (Millan, 2002). A modulação da dor pode iniciar a partir da ativação de regiões cerebrais que tem a capacidade de modular os *inputs* nociceptivos, aumentando ou diminuindo a experiência da dor (De Felice e Ossipov, 2016).

Neste sentido, o estudo das vias descendentes e os mecanismos de inibição e facilitação descendentes devem ser considerados (Millan, 2002). Inúmeros fatores,

incluindo o estado emocional, atenção, distração e memórias de momentos dolorosos passados podem interferir nestes circuitos modulatórios e alterar a experiência sensorial da dor (De Felice e Ossipov, 2016). Não existe separação anatômica para os processos de inibição e facilitação descendentes e a estimulação de uma única estrutura supraespinhal pode, por diferentes mecanismos, ativar simultaneamente ambos os processos (Millan, 2002).

É importante considerar a relação das vias descendentes com fibras aferentes primárias e outros elementos neuronais no corno dorsal. As fibras aferentes primárias C e A δ apresentam projeções para as lâminas I/II, V/VI e X do corno dorsal, enquanto que as fibras A β apresentam projeções para as lâminas III-VI. Ambos os tipos de fibras podem estimular diretamente neurônios de projeção, os quais retransmitem a informação para o cérebro, ou indiretamente estimulam outros neurônios, via interneurônios excitatórios. As fibras aferentes primárias podem ainda ativar interneurônios inibitórios, os quais interagem com neurônios de projeção, interneurônios excitatórios ou ainda com os próprios terminais. As vias descendentes podem, assim, modular a nocicepção através de uma interação de diferentes elementos no corno dorsal: os terminais das fibras aferentes primárias, os neurônios de projeção, interneurônios excitatórios e inibitórios e terminais de outras vias descendentes (Millan, 1999).

As vias que medeiam a inibição descendente reduzem a liberação de mediadores pró-nociceptivos a partir de fibras aferentes primárias (ação pré-sináptica) e, direta ou indiretamente (via interneurônios inibitórios) reduzem a excitação de neurônios de projeção (ação pós-sináptica). Isto indica uma influência inibitória das vias descendentes sobre a atividade neuronal. Quando a inibição descendente ocorre via interneurônios inibitórios uma influência facilitatória é evocada pelo envolvimento de um neurotransmissor alternativo ou pela ação do mesmo neurotransmissor mediada por diferentes receptores (Millan, 2002). Sabe-se da existência de diferentes receptores para um único neurotransmissor, os quais modificam diferencialmente a atividade neuronal. Um exemplo de neurotransmissor com esta ação bidirecional facilitatória e supressora é a 5-HT, que apresenta diferentes subtipos de receptores, alguns dos quais identificados como excitatórios, outros como inibitórios (Barnes e Sharp, 1999).

As vias de projeção descendente acessam o corno dorsal da medula espinhal via Funículo Dorsolateral (DLF, do inglês *Dorsolateral funiculus*) e Funículo Ventrolateral (VLF, do inglês *Ventrolateral funiculus*) e estas estruturas estão envolvidas com mecanismos de inibição e facilitação.

Diferentes estruturas cerebrais estão envolvidas com o processamento da dor (FIGURA 2). Muitas destas regiões apresentam funções neurológicas, como cognição, emoção e motivação. De fato, o contexto emocional, a expectativa ou a atenção participam da experiência dolorosa e podem inibir ou facilitar a dor. Entre estas estruturas estão o córtex cingulado anterior, ínsula, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *Periaqueductal Grey*) e Bulbo Rostral Ventromedial (RVM, do inglês *Rostral Ventromedial Medulla*) (Ossipov *et al.*, 2010; De Felice e Ossipov, 2016).

Este circuito modulatório descendente é considerado importante em diferentes contextos, incluindo estados de dor crônica e na ação de drogas analgésicas, como de opioides por exemplo. Acredita-se que a ação de algumas destas drogas ocorra através deste circuito ou por mimetizar as consequências da ativação do mesmo ao nível da medula espinhal (Ossipov *et al.*, 2010).

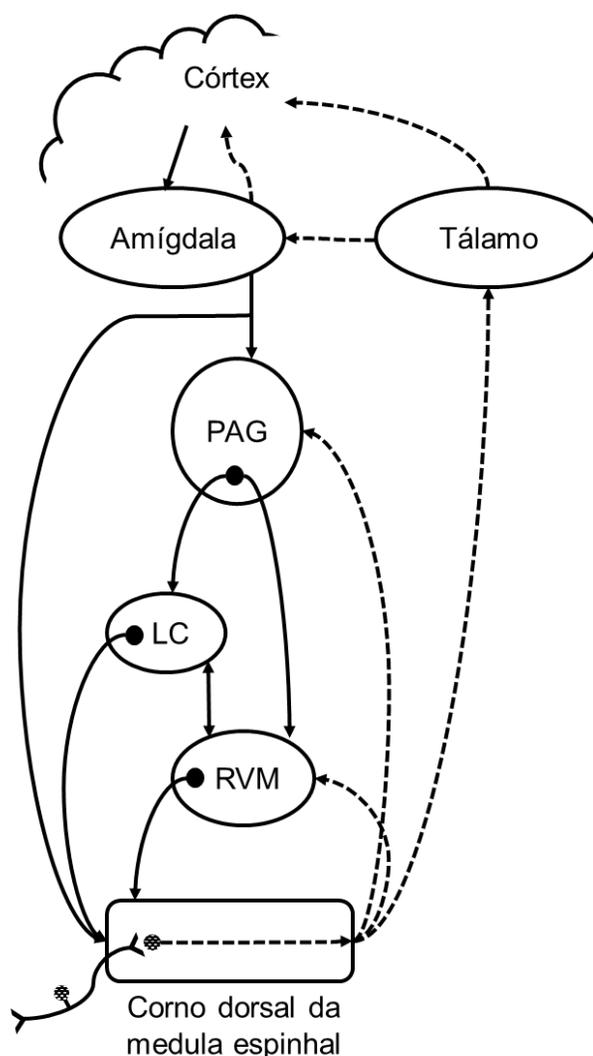


FIGURA 2– MODULAÇÃO DA DOR

Aferentes primários fazem sinapse no corno dorsal da medula espinhal e fibras de projeção ascendem contralateralmente até o tálamo e regiões como PAG e RVM. Projeções rostrais a partir do tálamo incluem áreas corticais e amígdala. A amígdala também recebe *inputs* nociceptivos a partir do córtex. A modulação descendente da dor é mediada através de projeções para a PAG, que também recebe *inputs* de outros sítios, e tem conexão com o RVM, bem como com outros núcleos que emitem projeções descendentes à medula espinhal, via DLF. O LC recebe projeções da PAG, tem conexão com o RVM e apresenta projeções descendentes inibitórias noradrenérgicas para o corno dorsal da medula espinhal. Vias ascendentes (linhas pontilhadas) e descendentes (linhas contínuas) estão representadas esquematicamente. DLF – Funículo Dorsolateral; LC – Locus Ceruleus; PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal; RVM – Bulbo Rostral Ventromedial.

A PAG foi uma das primeiras estruturas identificadas na modulação da dor. No clássico estudo de Reynolds, a estimulação elétrica desta região permitiu a realização de cirurgia abdominal em ratos sem a utilização de anestésicos, demonstrando seu importante papel na modulação da dor (Reynolds, 1969). A ativação da PAG,

eletricamente ou pela administração de opioides, produz antinocicepção e analgesia em modelos animais e humanos, respectivamente (Hosobuchi *et al.*, 1977; Fields, 2000). A PAG está estrategicamente localizada para modular tanto *inputs* nociceptivos como a percepção da dor, pela interação com projeções ascendentes e descendentes de inúmeras estruturas centrais (Ossipov *et al.*, 2014; De Felice e Ossipov, 2016). Esta estrutura recebe direta e indiretamente projeções nociceptivas do corno dorsal e é reciprocamente interconectada com o hipotálamo e outras estruturas, incluindo córtex frontal e amígdala, regiões importantes no controle da emoção, ansiedade e medo. Além disso, conexões diretas da PAG com neurônios do RVM são importantes no controle descendente (Millan, 2002). Estudos em ratos demonstraram que a ativação de neurônios da PAG resulta na ativação de neurônios do RVM e inibição de comportamentos relacionados à dor (Behbehani e Fields, 1979). Parte das projeções da PAG também está ligada ao tegmento pontino dorsolateral, que é uma porção da ponte, estrutura do tronco encefálico, também envolvida na função descendente inibitória. Enquanto o RVM emite projeções diretamente para o corno dorsal, o tegmento pontino dorsolateral emite projeções ao longo da medula, que por fim, também alcançam o corno dorsal (Fields, 2000; Benarroch, 2008; Kwon *et al.*, 2014).

A importância da amígdala no controle de emoção, estresse e ansiedade sugere que este pode ser um sítio onde estes parâmetros são integrados com o processamento da dor (De Felice e Ossipov, 2016). Estudos de imagem demonstraram ativação da amígdala durante a aplicação de estímulos nocivos, bem como interações desta estrutura com áreas corticais e com a PAG (Bingel *et al.*, 2007; Bingel e Tracey, 2008).

Sabe-se ainda que a modulação da dor é mediada por vias monoaminérgicas descendentes que podem inibir ou facilitar a transmissão da informação nociceptiva ao nível do corno dorsal. 5-HT e noradrenalina (NA) são importantes monoaminas que exercem, via diferentes subtipos de receptores, uma modulação da liberação de neurotransmissores a partir de aferentes nociceptivos e da excitabilidade neuronal no corno dorsal (Benarroch, 2008). A ativação de vias descendentes serotoninérgicas ou noradrenérgicas geralmente produz efeitos antinociceptivos. No entanto, é importante considerar que efeitos pró-nociceptivos também podem ser observados dependendo do

subtipo de receptor ativado, sítio de ação no corno dorsal (fibras aferentes primárias ou neurônios de projeção) e interação entre fibras descendentes com outros neurônios na medula espinhal (Yoshimura e Furue, 2006). Estes sistemas monoaminérgicos estão envolvidos nos mecanismos de diferentes tipos de dor, como inflamatória e neuropática (Ren e Dubner, 2002).

A via serotoninérgica PAG-RVM tem sido considerada o sistema de modulação endógena primário da dor e alvo da analgesia opioide supraespinhal (Mason, 2005). Atuando em diferentes tipos de receptores, a 5-HT exerce efeitos modulatórios na transmissão nociceptiva no corno dorsal. Neurônios serotoninérgicos centrais podem facilitar ou não a transmissão nociceptiva, de acordo com o receptor envolvido. Diferentes estudos sugerem que a ativação de receptores 5HT₁ e 5HT₇ apresenta um efeito antinociceptivo, enquanto que a ativação de receptores 5HT₂ e 5HT₃ apresenta um efeito pró-nociceptivo (Benarroch, 2008; De Felice e Ossipov, 2016). No entanto, é importante considerar que o RVM é formado por um grupo heterogêneo de neurônios, serotoninérgicos e não-serotoninérgicos, que estão envolvidos não somente na modulação da dor, mas também no controle de outras funções autonômicas e homeostáticas (Mason *et al.*, 2007).

A NA também está envolvida no controle intrínseco da dor e as principais fontes centrais são os núcleos no tronco cerebral, denominados de A1 a A7 (Pertovaara, 2006). Considerando que a PAG e o corno dorsal não contem neurônios noradrenérgicos, as projeções a partir da PAG possivelmente ativam, direta ou indiretamente, neurônios de projeção noradrenérgicos (Bajic e Proudfit, 1999). Na medula espinhal a inervação noradrenérgica tem origem a partir de diferentes grupos celulares no tegmento pontino, incluindo os grupos A5, A6 (LC, Locus Ceruleus) e A7 (Benarroch, 2008). Estas estruturas estão conectadas com vários outros núcleos relacionados com comportamentos de dor e recebem projeções da PAG (Bajic e Proudfit, 1999). O LC representa o maior sítio de corpos celulares noradrenérgicos do cérebro e a inibição de respostas nociceptivas induzidas pela estimulação desta região pode ser bloqueada por lesão no VLF, mas não no DLF, indicando que o VLF medeia o efeito antinociceptivo noradrenérgico descendente a partir do LC (Pertovaara, 2006). Na medula espinhal, a

NA liberada a partir de vias descendentes tem efeito supressor da dor pela ação inibitória sobre receptores $\alpha 2A$ em terminais centrais de aferentes primários (inibição pré-sináptica), pela ação direta sobre neurônios de transmissão da dor (inibição pós-sináptica) e pela ativação de interneurônios inibitórios mediada por receptores $\alpha 1$ (Benarroch, 2008). O efeito modulatório em níveis supraespinhais pode variar de acordo com o sítio, o tipo de receptor envolvido, a duração da dor e a condição patofisiológica (Pertovaara, 2006).

A participação de vias descendentes e grupos de células noradrenérgicas na potencialização da dor crônica foi demonstrada em modelos de dor inflamatória (Howorth *et al.*, 2009) e neuropática (Ma e Eisenach, 2003; Hayashida *et al.*, 2008), mas com graus variáveis, dependendo da condição de dor (Porreca *et al.*, 2002).

As conexões excitatórias entre PAG e RVM envolvem diferentes tipos de neurônios, como glutamatérgicos e serotoninérgicos. As conexões inibitórias ocorrem em menor número e envolvem principalmente neurônios GABAérgicos. A redução deste controle GABAérgico, com opioides e canabinóides por exemplo, contribui para a indução de analgesia destas drogas a partir da PAG (Millan, 2002).

1.3.1 RVM e dor

O RVM é um sítio importante para a modulação descendente da transmissão nociceptiva (Fields *et al.*, 1983; Heinricher *et al.*, 1989), podendo participar na inibição bem como na facilitação da dor (Ossipov *et al.*, 2010). Esta estrutura compreende o núcleo magno da rafe, o núcleo reticular gigantocelular pars alfa e o núcleo paragigantocelular lateral (Fields *et al.*, 1991) e recebe projeções de diferentes regiões além da PAG, como tálamo e LC, sendo considerada uma via comum final na modulação descendente, com projeções para o corno dorsal e o subnúcleo *caudalis* (Ossipov *et al.*, 2010; Akerman *et al.*, 2011).

A participação do RVM na modulação da dor foi demonstrada nos estudos de Fields e colaboradores, nos quais a atividade dos neurônios do RVM foi relacionada com

o comportamento de ratos levemente anestesiados expostos a um calor nocivo no teste do *tail-flick*. Estes estudos identificaram uma população de neurônios do RVM que aumentam os disparos antes do reflexo nociceptivo, as chamadas *on-cells*, e outra população de neurônios que estão tonicamente ativadas e reduzem os disparos antes do reflexo, as chamadas *off-cells* (Fields *et al.*, 1983; Heinricher *et al.*, 1989). Esta dicotomia na função neuronal é consistente com a modulação bidirecional da dor e as características eletrofisiológicas das células *on* e *off* são consistentes com as funções pró e antinociceptivas, respectivamente (Ossipov *et al.*, 2010). Outra população de neurônios, as chamadas células neutras, foram inicialmente caracterizadas pela ausência de resposta ao estímulo térmico nocivo aplicado na cauda. Entretanto, estas células respondem a estímulos nocivos de diferentes intensidades aplicados em outros pontos, e podem representar subtipos de células *on* ou de células *off* (Ellrich *et al.*, 2000).

É importante considerar a participação de diferentes neurotransmissores neste processo de modulação da dor a partir do RVM. Considerando que neurônios do RVM representam uma importante fonte de projeções serotoninérgicas para o corno dorsal, o estudo de Potrebic e colaboradores identificou neurônios do RVM pelas respostas à aplicação de um estímulo nocivo cutâneo e análises de imunocitoquímica mostraram que apenas as células neutras apresentaram imunoreatividade para 5-HT. Este achado sugere que as células neutras serotoninérgicas estão envolvidas na modulação da transmissão nociceptiva espinhal (Potrebic *et al.*, 1994). Apesar disso, as células *on* e *off* podem ser moduladas por células neutras (Foo e Mason, 2003). Sabe-se que cerca de 20% dos neurônios do RVM com projeção para o corno dorsal são serotoninérgicos, enquanto os remanescentes são provavelmente GABAérgicos ou glicinérgicos (Kato *et al.*, 2006). Isto demonstra a complexidade da influência das células do RVM na modulação da dor.

As células *on* expressam receptores μ opioides e as células *off*, apesar de não expressarem estes receptores, sofrem uma ação indireta pela ativação dos mesmos. Isto ocorre porque as células *off* são inibidas por fibras GABAérgicas que expressam receptores μ . Sendo assim, a liberação endógena de opioides ou a administração de agonistas μ inibem diretamente as células *on* e ativam indiretamente as células *off*,

através de uma desinibição GABAérgica (Fields, 2004) (FIGURA 3). Isto explica a analgesia induzida pelo tratamento intra-RVM com antagonistas GABA, como a bicuculina, cuja ação é normalmente pró-nociceptiva (Heinricher e Tortorici, 1994).

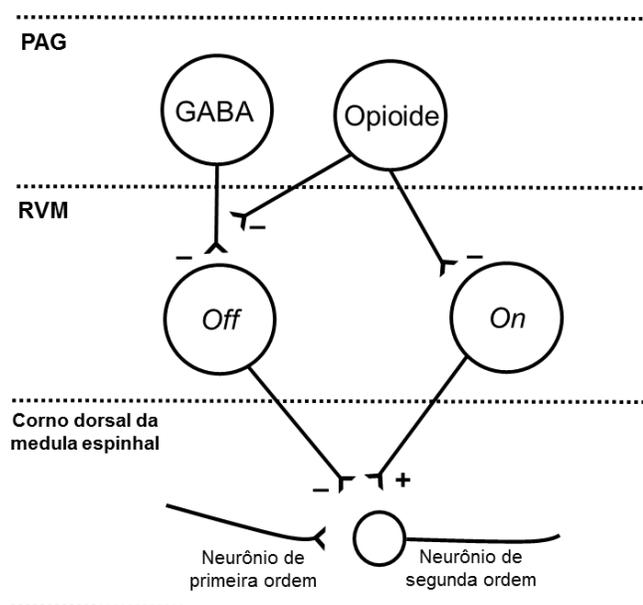


FIGURA 3 – AÇÃO DE AGONISTAS μ OPIOIDES EM CÉLULAS ON E OFF DO RVM

Os receptores μ estão localizados em terminais de células GABAérgicas e em regiões somatodendríticas das células *on*. Agonistas μ produzem um efeito anti-nociceptivo pela inibição direta de células *on* ou desinibição de células *off*.

As células *on* também expressam receptores de colecistocinina 2 (CCK2), os quais estão colocalizados com os receptores μ opioides. A administração intra-RVM de CCK aumenta a atividade de células *on* (Heinricher e Neubert, 2004) e induz hiperalgesia (Kovelowski *et al.*, 2000). Considerando estados de dor persistente, normalmente associados a mecanismos facilitatórios descendentes, a inibição de neurônios com perfil sugestivo de células *on* pode bloquear comportamentos relacionados à dor (Kovelowski *et al.*, 2000; King *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

O estudo de Kaplan e Fields investigou a participação do RVM na hiperalgesia induzida em um modelo de abstinência à opioide e demonstrou que a inativação desta estrutura com lidocaína é capaz de reduzir a hiperalgesia, mostrando que o RVM pode

participar da facilitação da transmissão nociceptiva nesse modelo (Kaplan e Fields, 1991). Além disso, considerando que neste modelo a atividade das células *off* está relativamente reduzida e das células *on* aumentada (Bederson *et al.*, 1990), os resultados de Kaplan e Fields sugerem que a redução da hiperalgesia pelo bloqueio do RVM ocorre em função da inativação de células *on* (Kaplan e Fields, 1991). Da mesma forma, a injeção de formalina na pata traseira de ratos foi capaz de induzir nocicepção e aumentar os disparos das células *on* do RVM (Vanegas e Schaible, 2004).

Considerando que a modulação descendente inibe a dor aguda, tem sido sugerido que um desequilíbrio entre ações inibitórias e facilitatórias ocorre durante situações de dor crônica com um ganho na facilitação descendente da dor (Porreca *et al.*, 2002). Em condições de dor crônica, parece ocorrer uma redução da inibição e um aumento da facilitação descendente, aumentando a transmissão nociceptiva na medula espinhal (Tracey e Mantyh, 2007).

Outros estudos demonstraram que as vias modulatórias descendentes da dor a partir do RVM são também importantes na mediação da dor tônica induzida pela lesão de nervo (King *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). Dada a importância deste sistema para o controle endógeno da dor e sua influência sobre diferentes tipos de dor, o presente estudo investigou a participação destas projeções no início e manutenção da dor neuropática (evocada e tônica) de origem trigeminal. Para isso, foram utilizados os modelos animais de constrição do nervo infraorbital e de preferência condicionada de lugar, descritos a seguir.

1.4 MODELOS ANIMAIS

1.4.1 Constrição do nervo infraorbital (CION, do inglês *Constriction of the Infraorbital Nerve*)

Vos e Maciewicz desenvolveram um modelo para o estudo da TN, o qual consiste na constrição do nervo infraorbital de ratos. Neste modelo o acesso à porção infraorbital do nervo trigêmeo ocorre lateralmente à borda da órbita ocular, formada pelos ossos

maxilar, frontal, lacrimal e zigomático (Vos *et al.*, 1994). Em 2006, o método foi modificado por Chichorro e colaboradores. A alteração proposta permite que o acesso ao ramo infraorbital do nervo seja realizado através de uma incisão na pele e afastamento dos músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior (Chichorro *et al.*, 2006 [b]).

O modelo reproduz importantes aspectos da TN e estudos pré-clínicos utilizando este modelo têm usado avaliações comportamentais que consistem principalmente na retirada da cabeça quando o estímulo é aplicado na área do ramo infraorbital, uma medida de dor evocada. Além disso, a CION produz um aumento do *grooming facial* no lado ipsilateral, potencialmente refletindo comportamentos relacionados à dor (Vos e Maciewicz, 1991; Vos *et al.*, 1994).

Após a cirurgia os animais apresentam sinais de dor que incluem hiperalgesia mecânica (Vos e Maciewicz, 1991; Vos *et al.*, 1994), térmica (Imamura *et al.*, 1997; Chichorro *et al.*, 2006 [b]; Chichorro *et al.*, 2009) e inflamatória (Anderson *et al.*, 2003). As hiperalgesias mecânica e térmica apresentam diferentes decursos temporais. O desenvolvimento de hiperalgesia térmica inicia aproximadamente 2 dias depois da CION, enquanto que a hiperalgesia mecânica inicia cerca de 10 dias após a cirurgia, (Vos *et al.*, 1994; Imamura *et al.*, 1997; Chichorro *et al.*, 2006 [b]; Chichorro *et al.*, 2009), como representado na figura 4.

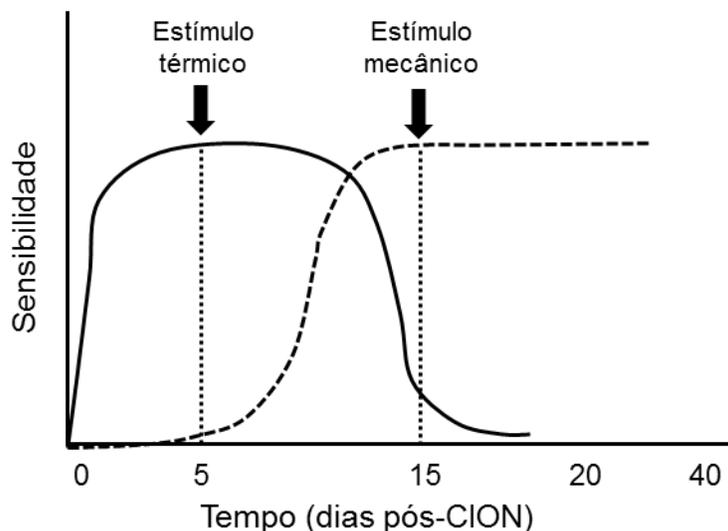


FIGURA 4 – DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA AO CALOR E MECÂNICA INDUZIDA PELA CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A curva com linha contínua representa o decurso temporal da hiperalgesia ao calor e a curva pontilhada representa o decurso temporal da hiperalgesia mecânica. As linhas pontilhadas representam os picos de hiperalgesia para os estímulos avaliados. Figura adaptada (Chichorro, 2006).

1.4.2 Preferência Condicionada de Lugar (CPP, do inglês *Conditioned Place Preference*)

A dor crônica persistente que ocorre na ausência de um estímulo externo é um aspecto da dor neuropática difícil de investigar na fase pré-clínica (King *et al.*, 2009; Navratilova *et al.*, 2013). Com o intuito de avaliar esta dor, foi desenvolvido um método no qual os aspectos motivacionais da dor crônica tônica são avaliados. A dor apresenta componentes sensoriais e afetivos e produz uma forte motivação para buscar alívio. O alívio de um estado tônico aversivo é recompensador, servindo como um reforço negativo que pode ser usado para moldar o comportamento. Estes conceitos serviram como base para estudos que demonstraram que o alívio da dor produz CPP para um contexto distinto (King *et al.*, 2009; King *et al.*, 2011; Okun *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2011; Okun *et al.*, 2012).

O teste de CPP tem sido usado para o estudo da dor em diferentes modelos animais. O estudo de De Felice e colaboradores utilizou este teste para avaliação da dor cefálica e observou que a administração de lidocaína intra-RVM produziu CPP em

animais que apresentavam alodinia cutânea após tratamento com mediadores inflamatórios na dura-máter. Além disso, a administração de um antagonista dopaminérgico no núcleo accumbens foi capaz de inibir CPP nestes animais, o que mostra que o alívio da dor ativa vias dopaminérgicas de recompensa (De Felice *et al.*, 2013). Havelin e colaboradores reportaram que o tratamento intra-RVM com lidocaína induz CPP, indicando que o bloqueio da facilitação descendente produz alívio da dor no modelo de osteoartrite avançada (Havelin *et al.*, 2016). Outro estudo investigou o efeito do bloqueio do RVM e reportou a presença de CPP em animais submetidos à cirurgia de ligadura de nervo espinhal 60 dias após a lesão, sugerindo dor espontânea de longa duração nestes animais (Wang *et al.*, 2013).

No presente estudo, o teste de CPP foi utilizado para revelar a presença de dor tônica no modelo de TN induzido pela constrição do ramo infraorbital e determinar o papel do sistema modulatório descendente da dor a partir do RVM nesse aspecto.

2 HIPÓTESE

O bloqueio do RVM é capaz de atenuar a hiperalgesia mecânica orofacial e a dor tônica 15 dias pós-CION, mas não altera a hiperalgesia ao calor ou a dor tônica 5 dias após a indução da dor neuropática trigeminal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de projeções periféricas e centrais descendentes a partir do RVM na geração e na manutenção da dor evocada e tônica em um modelo de dor neuropática trigeminal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar o efeito do tratamento sistêmico com lidocaína na hiperalgesia térmica 5 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento sistêmico com lidocaína no teste de CPP 5 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína na hiperalgesia térmica 5 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína no teste de CPP 5 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento sistêmico com lidocaína na hiperalgesia mecânica 15 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento sistêmico com lidocaína no teste de CPP 15 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína na hiperalgesia mecânica 15 dias após CION;
- avaliar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína no teste de CPP 15 dias após CION;
- avaliar o efeito dos tratamentos sistêmico e intra-RVM com lidocaína na hiperalgesia mecânica 15 dias após CION nos animais constrictos não hiperalgésicos neste período;

- avaliar o efeito dos tratamentos sistêmico e intra-RVM com lidocaína no teste de CPP 15 dias após CION nos animais constrictos não hiperalgésicos neste período;
- avaliar o efeito do tratamento sistêmico com lidocaína na atividade locomotora de animais naïve.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 200-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso à ração e água. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de 4 animais por caixa. Os animais submetidos à cirurgia para implante da cânula no RVM foram mantidos isoladamente após a cirurgia. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo, em sala silenciosa e com temperatura controlada. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR, autorização número 805), e executados em conformidade com as diretrizes éticas, incluindo as políticas e recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (Zimmermann, 1983), regulamentos brasileiros para o bem-estar animal e Resoluções Normativas e Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os esforços foram feitos para melhorar o bem-estar e minimizar o número de animais utilizados.

4.1.2 Drogas

Foram empregadas as seguintes drogas, reagentes e soluções:

- Acrílico autopolimerizante líquido (Jet Acrílico autopolimerizante®, Clássico Artigos Odontológicos Indústria Brasileira, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil);
- Azul de toluidina (Labsynth, Diadema, SP, Brasil);

- Cloridrato de Bupivacaína (Neocaina®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil);
- Cloridrato de Cetamina (Quetamina®, Vetrnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda, Louveira, SP, Brasil);
- Cloridrato de Lidocaína (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA);
- Cloridrato de Xilazina (Xilasin®, Syntec Tecnologia Farmacêutica Aplicada à Medicina Veterinária, Santana de Parnaíba, SP, Brasil);
- Formaldeído (Formaldeido 37% Comercial, Labsynth, Diadema, SP, Brasil);
- Oxitetraciclina (Terramicina LA®, Pfizer, Itapevi, SP, Brasil);
- Peróxido de Hidrogênio (Água oxigenada – Solução de Peróxido de Hidrogênio 3%, Rioquímica Indústria Farmacêutica, São José do Rio Preto, SP, Brasil);
- Resina acrílica autopolimerizante pó (Jet Acrílico autopolimerizante®, Clássico Artigos Odontológicos Indústria Brasileira, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil);
- Sacarose (Neon Comercial, Vila Prudente, SP, Brasil);
- Solução salina estéril 0,9% (EquiPLEX Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil);
- Tiopental (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procedimentos cirúrgicos

4.2.1.1 Canulação do RVM

A canulação bilateral do RVM foi realizada como descrito por Burgess e colaboradores (2002). Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com quetamina e xilazina (90 e 10 mg/Kg, respectivamente) e, após tricotomia da região superior da cabeça, foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., Illinois, EUA) e tiveram a cabeça fixada com auxílio de barras auriculares. A região da incisão foi

anestesiada com bupivacaína associada a vasoconstritor (Neocaína 0,5% - Cloridrato de Bupivacaína com epinefrina 1:200.000) afim de minimizar o sangramento local. Foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo a região da calota craniana, e o tecido subcutâneo restante foi removido com peróxido de hidrogênio para permitir a melhor visualização das suturas. Com a torre do equipamento em angulação zero (posição vertical), duas cânulas guia (26-Gauge) separadas por 1,2 mm (Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA) foram direcionadas para as porções laterais do RMV, de acordo com as seguintes coordenadas: ântero-posterior (AP) - 11,0 mm a partir do bregma, lateral (L) \pm 0,6 mm, dorso-ventral (DV) - 8,5 mm a partir da base do crânio. Após a superfície óssea estar completamente seca, com auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, foram feitas 3 trepanações na calota craniana, uma na parte anterior de cada osso parietal e uma no osso frontal, nas quais foram fixados 3 pequenos parafusos de aço inoxidável. Na sequência, foi realizada uma trepanação na região indicada pelas coordenadas descritas e, após o correto posicionamento das cânulas, as mesmas foram cimentadas com resina acrílica autopolimerizável (Jet, Campo Limpo Paulista, SP, BR). Ao término do procedimento, os animais foram tratados com oxitetraciclina (480 mg/Kg, i.m.) e acompanhados até completa recuperação. Os testes comportamentais ou cirurgias subsequentes iniciaram com, no mínimo, 7 dias de intervalo.

4.2.1.2 Constrição do nervo infraorbital

A constrição do nervo infraorbital foi realizada segundo o método inicialmente descrito por Vos e colaboradores (1994), com algumas modificações (Chichorro, 2006). Os animais foram previamente anestesiados via intraperitoneal com quetamina e xilazina (90 e 10 mg/Kg, respectivamente) e, após tricotomia da região direita da face, foi realizada assepsia da mesma com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito do animal, cerca de 3 mm posterior a área de inserção das vibrissas. Foram afastados os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse

exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi então dissecado dos tecidos adjacentes com auxílio de uma pinça cirúrgica e, em seguida, foram feitas duas amarras frouxas com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso, separadas por aproximadamente 2 mm. A sutura dos tecidos foi feita por pontos separados utilizando o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém o feixe nervoso foi somente exposto. Ao término da cirurgia os animais foram avaliados até a completa recuperação da anestesia. Os testes comportamentais subsequentes iniciaram com, no mínimo, 4 dias de intervalo.

4.2.2 Administração de drogas

4.2.2.1 Injeções no RVM

Para a realização das injeções no RVM os animais foram contidos e receberam em cada uma das cânulas 0,5 μ L de uma solução de lidocaína 4% dissolvida em veículo (salina) ou veículo (salina, 0,5 μ L). A injeção foi realizada com o auxílio de uma cânula injetora dupla de 33-Gauge (Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA), com comprimento adicional de 1 mm em relação ao comprimento das cânulas para garantir o acesso da droga ao tecido e prevenir o refluxo da mesma pelas cânulas. O injetor foi acoplado, com auxílio de um cateter de polietileno, a uma seringa (Hamilton, 25 μ L) e a mesma foi conectada a um injetor (Stoelting Co, Wood Dale, IL, EUA), o qual foi programado para dispensar a solução com fluxo de 0,5 μ L/min. Após a injeção, o injetor permaneceu acoplado às cânulas por 1 min adicional e, na sequência, foi lentamente removido.

4.2.2.2 Injeções sistêmicas

As injeções sistêmicas foram realizadas em áreas dorsolaterais interescapulares pela via subcutânea e os animais receberam uma solução de lidocaína dissolvida em veículo (salina), na dose de 10 mg/Kg, ou veículo (salina, 1 mL/Kg).

4.2.3 Testes comportamentais

4.2.3.1 Avaliação da Hiperalgisia ao calor

Para a avaliação da hiperalgisia ao calor, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante, com temperatura aproximada de 50 °C, foi posicionada a cerca de 1 cm da área de inserção das vibrissas, do lado direito da face. Com auxílio de um cronômetro foi registrado o tempo de reação, em s, para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (Chichorro *et al.*, 2009). Foram selecionados para os experimentos apenas animais que apresentaram estas respostas entre 9 e 20 s a partir da aplicação do estímulo nas avaliações basais. O tempo de corte de 20 s foi estipulado para evitar danos teciduais. Para avaliação da hiperalgisia ao calor após a cirurgia de constrição, o estímulo foi aplicado antes do tratamento com lidocaína e em intervalos de 30 min até 120 ou 180 min.

4.2.3.2 Avaliação da Hiperalgisia mecânica

Para a avaliação da hiperalgisia mecânica, os animais foram habituados em caixas de observação por pelo menos 2 h. Em seguida, foi feita a aplicação em ordem crescente de 8 filamentos de von Frey (*Semmes-Weinstein Monofilaments*, Stoelting, USA – 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na região de inserção das vibrissas, no lado direito da face. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas, com um intervalo

de aproximadamente 30 s entre cada aplicação. O limiar de resposta dos animais a este estímulo foi considerado como sendo a força, em g, exercida pelo filamento que evocou por 2 vezes comportamentos como retirada rápida da cabeça, *grooming* facial ou reações de ataque/escape. Somente os animais que não apresentaram estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g (Christensen *et al.*, 1999; Chichorro *et al.*, 2006 [a]). Para avaliação da hiperalgesia mecânica após a cirurgia de constrição, o estímulo foi aplicado antes dos tratamentos e em intervalos de 30 min até 120 min.

4.2.3.3 Teste de CPP

O protocolo para a execução deste teste foi realizado de acordo com o descrito por King (King *et al.*, 2009). O aparato é formado por 3 diferentes compartimentos de madeira, com 2 divisórias móveis, que podem ser substituídas por divisórias com aberturas (10 x 7 cm) para permitir o livre acesso dos animais. O compartimento central “neutro” (A x L x P – 31 x 10 x 25 cm) é de cor preta e permaneceu iluminado (luz branca, 13 watts) durante a execução de todos os experimentos, podendo estar com divisórias fechadas ou abertas (para permitir o acesso aos outros dois compartimentos). Os dois compartimentos de condicionamento (31 x 36,5 x 25 cm) apresentam diferentes pistas visuais e táteis. Um compartimento é de cor preta, com piso em madeira lisa e as paredes laterais possuem listras brancas horizontais. O outro compartimento é de cor preta, com piso em vidro transparente texturizado e as paredes laterais apresentam listras brancas verticais. Os experimentos foram realizados em 3 fases: pré-condicionamento, condicionamento e teste. No primeiro dia (pré-condicionamento), os animais foram colocados individualmente na câmara neutra e permaneceram com livre acesso entre as 2 câmaras de condicionamento durante 15 min. O tempo que cada animal permaneceu em cada uma das câmaras foi analisado para verificar a inexistência de preferência pré-condicionamento. Animais que permaneceram mais do que 720 s ou menos do que 180 s em uma única câmara nesta fase foram excluídos dos experimentos. Finalizada a fase

de pré-condicionamento, os dados foram contrabalanceados, considerando cada grupo isoladamente. Para tal, considerou-se o tempo (em s) de permanência dos animais constrictos em cada uma das câmaras no pré-condicionamento e a definição das câmaras para o condicionamento foi sendo feita de tal forma que as médias dos tempos de permanência nesta etapa nas câmaras pareadas com salina e com lidocaína ficassem o mais próximas possível. O mesmo procedimento foi feito para os tempos de pré-condicionamento dos animais do grupo sham. Os animais foram então designados às respectivas câmaras para pareamento com lidocaína e veículo. No segundo dia (condicionamento), para a realização dos experimentos com administração intra-RVM, durante o período da manhã, os animais receberam veículo e foram imediatamente colocados na câmara designada por 30 min. Quatro horas mais tarde, os animais receberam lidocaína e foram imediatamente colocados na câmara oposta por 30 min. O condicionamento para o protocolo que contemplou injeções sistêmicas foi realizado 30 min após as injeções. No terceiro dia (teste), os animais foram colocados na câmara neutra e permaneceram no aparato por 15 min, com livre acesso às 2 câmaras. O tempo de permanência de cada animal foi analisado para determinar se o tratamento foi capaz de produzir CPP. Um aumento no tempo de permanência, no dia teste, na câmara pareada com lidocaína comparado ao tempo de permanência nesta mesma câmara no pré-condicionamento indica CPP. A diferença de escore foi calculada subtraindo o tempo de permanência na câmara pareada com lidocaína no pré-condicionamento do tempo de permanência no pós-condicionamento. Um escore positivo indica preferência.

Este protocolo foi usado em dois diferentes tempos após a cirurgia de constrição, iniciando nos dias 4 ou 14 após a cirurgia, e foi conduzido com injeções de lidocaína sistêmica e no RVM. Os experimentos foram conduzidos em uma sala de baixa iluminação e o comportamento dos animais foi registrado com auxílio de uma câmera de vídeo, posicionada acima do aparato, acoplada a um computador. Ao final de cada sessão, os animais retornaram para suas caixas e o aparato foi higienizado com papel toalha embebido em água.

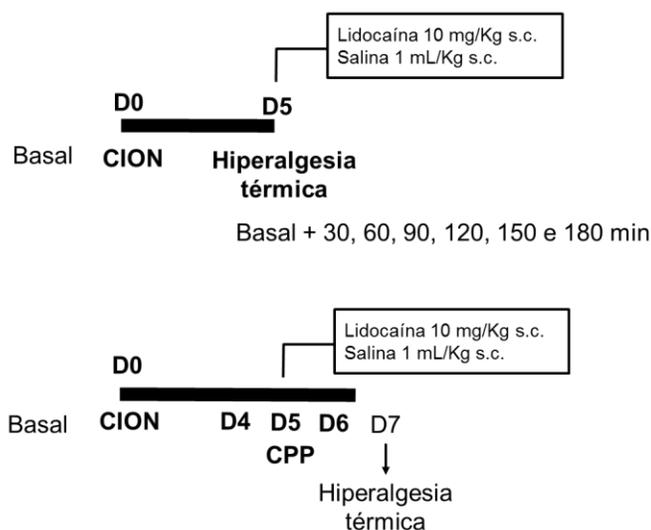
4.2.3.4 Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

A atividade locomotora dos animais foi avaliada no teste de campo aberto (Chioca *et al.*, 2008), cujo aparato consiste em uma arena quadrangular (30x60x60 cm), com piso dividido em 9 quadrantes iguais. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena e o comportamento dos animais foi registrado durante 5 min com auxílio de uma câmera de vídeo, posicionada acima do aparato, acoplada a um computador. Foi avaliado o número de quadrantes cruzados, considerando como um cruzamento a passagem do animal com as duas patas traseiras para o próximo quadrante. O número de cruzamentos no campo aberto foi usado como um índice primário da atividade locomotora. Ao final de cada sessão, o aparato foi higienizado com papel toalha embebido em água.

4.2.4 Protocolos experimentais

Em cada experimento foram utilizados grupos diferentes de animais e os mesmos foram randomizados para os grupos de tratamento, de acordo com o tempo de avaliação pós-CION. Em um primeiro momento foi investigado o efeito do tratamento com lidocaína sistêmica na hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo infraorbital 5 dias pós-cirurgia. Foram obtidas respostas basais ao estímulo térmico pré-cirurgia e 5 dias após a cirurgia os animais foram novamente submetidos ao estímulo e na sequência os receberam lidocaína (10 mg/Kg) ou veículo (salina, 1 mL/Kg) pela via subcutânea. Após a administração, a hiperalgesia térmica foi avaliada em intervalos de 30 min até 180 min. Para investigar a presença de dor tônica induzida pela constrição o teste de CPP foi realizado, com início no dia 4 pós-CION e condicionamento no dia 5, com lidocaína e salina administradas pela via sistêmica. Neste grupo, a hiperalgesia ao calor foi avaliada antes da cirurgia e após o término do CPP, no dia 7 (ESQUEMA 1).

TRATAMENTO SISTÊMICO – 5 dias pós-CION

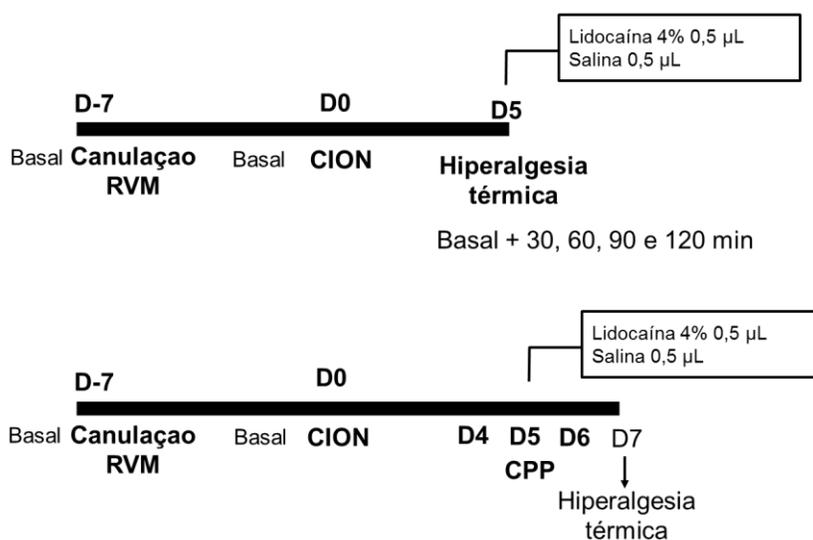


ESQUEMA 1 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA AO CALOR E NO TESTE DE CPP

O símbolo D indica “dia”. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar.

Para investigar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína foram obtidas respostas basais ao estímulo térmico e os animais foram submetidos à cirurgia para implante das cânulas na região do RVM. Respeitando um intervalo de 7 dias para recuperação dos animais, os mesmos foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo. A latência para resposta ao estímulo foi previamente avaliada para confirmar a ausência de influência da primeira cirurgia nas respostas subsequentes. No dia 5 pós-CION a hiperalgesia térmica foi avaliada e os animais receberam o tratamento intra-RVM com lidocaína (4%, 0,5 μ L) ou veículo (salina, 0,5 μ L) e após a administração a hiperalgesia foi avaliada em intervalos de 30 min até 120 min. Para investigar a presença de dor tônica induzida pela constrição, o teste de CPP foi realizado, com início no dia 4 pós-CION e condicionamento no dia 5, com lidocaína e salina administradas intra-RVM. Neste grupo, a hiperalgesia ao calor ainda foi avaliada após o término do CPP, no dia 7 (ESQUEMA 2).

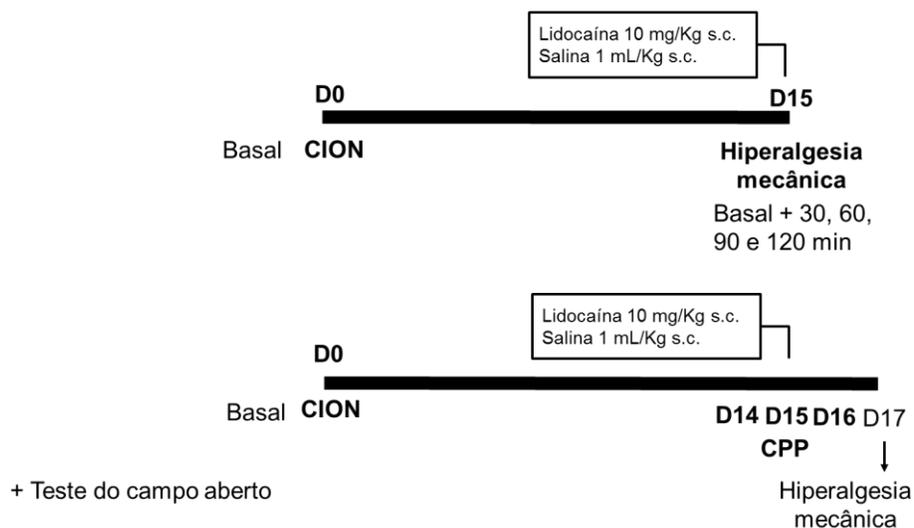
TRATAMENTO INTRA-RVM – 5 dias pós-CION



ESQUEMA 2 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-RVM COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA AO CALOR E NO TESTE DE CPP
O símbolo D indica “dia”. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial.

O protocolo seguinte investigou inicialmente o efeito do tratamento com lidocaína sistêmica na hiperalgesia mecânica induzida pela constrição 15 dias pós-cirurgia. Os animais selecionados no teste do von Frey (com limiar de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g) foram submetidos à cirurgia de constrição e 15 dias após a cirurgia a hiperalgesia mecânica foi avaliada. Na sequência, os animais receberam lidocaína (10 mg/Kg) ou veículo (salina, 1 mL/Kg) pela via subcutânea e, após a administração, a hiperalgesia mecânica foi avaliada em intervalos de 30 min até 120 min. Para investigar a presença de dor tônica induzida pela constrição, o teste de CPP foi realizado, com início no dia 14 pós-CION e condicionamento no dia 15, com lidocaína e salina administradas pela via sistêmica. Neste grupo, a hiperalgesia ao calor foi avaliada antes da cirurgia e após o término do CPP, no dia 17. Um grupo de animais naïve recebeu lidocaína (10 mg/Kg, s.c.) ou veículo (salina, 1 mL/Kg) e foi submetido ao teste do campo aberto 30 min após o tratamento para avaliação da atividade locomotora (ESQUEMA 3).

TRATAMENTO SISTÊMICO – 15 dias pós-CION

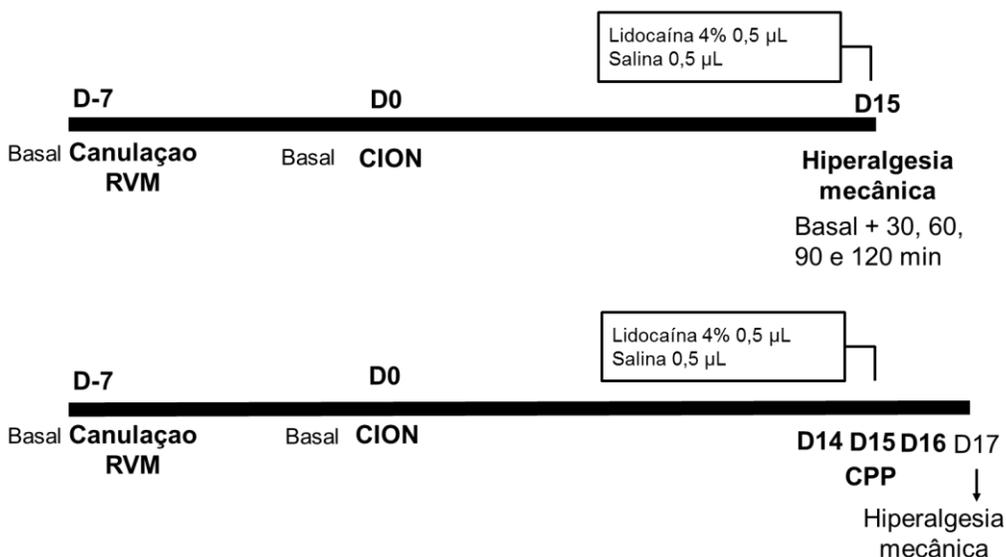


ESQUEMA 3 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO TESTE DE CPP

O símbolo D indica "dia". CION – Constrição do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar.

Por fim, para investigar o efeito do tratamento intra-RVM com lidocaína na hiperalgesia mecânica e no teste do CPP 15 dias pós-CION os animais foram selecionados no teste do von Frey e os mesmos foram submetidos à cirurgia para implante das cânulas na região do RVM. Respeitando um intervalo de 7 dias para recuperação dos animais, os mesmos foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo, sendo que antes da realização da segunda cirurgia os animais foram submetidos ao teste do von Frey, como no protocolo anterior que contemplou canulação do RVM. No dia 15 pós-CION a hiperalgesia mecânica foi avaliada e os animais receberam o tratamento intra-RVM com lidocaína (4%, 0,5 µL) ou veículo (salina, 0,5 µL) e após a administração a hiperalgesia foi avaliada em intervalos de 30 min até 120 min. Para investigar a presença de dor tônica induzida pela constrição o teste de CPP foi realizado, com início no dia 14 pós-CION e condicionamento no dia 15, com lidocaína e salina administradas intra-RVM. Neste grupo, a hiperalgesia ao calor ainda foi avaliada após o término do CPP, no dia 17 (ESQUEMA 4).

TRATAMENTO INTRA-RVM – 15 dias pós-CION



ESQUEMA 4 – PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO INTRA-RVM COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E NO TESTE DE CPP

O símbolo D indica “dia”. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial.

4.2.5 Verificação dos tecidos

Após os testes comportamentais com os animais submetidos à cirurgia de canulação do RVM, a fim de avaliar a posição das cânulas, os animais foram contidos e receberam em cada uma das cânulas 0,5 μL de uma solução de azul de toluidina a 1%. A injeção foi realizada com o auxílio de uma cânula injetora dupla de 33-Gauge (Plastics One Inc, Roanoke, VA, EUA), com comprimento adicional de 1 mm em relação ao comprimento das cânulas. O injetor foi acoplado, com auxílio de um cateter de polietileno, a uma seringa (Hamilton 25 μL) e a mesma foi conectada a um injetor (Stoelting Co, Wood Dale, IL, EUA), o qual foi programado para dispensar a solução com fluxo de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após a injeção, o injetor permaneceu acoplado às cânulas por 1 min adicional e, na sequência, foi lentamente removido. Os animais foram eutanasiados por anestesia profunda com lidocaína (4 mg/Kg, i.p.) seguida de uma injeção de tiopental (100 mg/Kg, i.p.) e os cérebros foram removidos e fixados em solução de formaldeído à 10% por 24 h. Depois disso, os tecidos foram imersos em solução de sacarose a 20% por adicionais 72 h. Os tecidos passaram por emblocamento em *Tissue Tek* (OCT Compound), foram cortados em criostato em secções de 40 μm de espessura e analisados com auxílio de um microscópio óptico, de acordo com o atlas de Paxinos (Paxinos G, 1986). Os dados de todos os animais foram avaliados, separados e interpretados de acordo com o posicionamento das cânulas. Animais com o posicionamento incorreto das cânulas foram denominados “*off sets*”.

4.2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M., do inglês *Standard Error of the Mean*). Análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas foi empregada para analisar os dados da estimulação térmica e mecânica, sendo o tratamento considerado o fator independente e os diferentes tempos de comportamentos nociceptivos avaliados considerados as medidas repetidas. Em caso de diferenças significativas no fator independente e/ou na interação entre o fator

independente e os fatores repetidos, análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls foi aplicado. Os dados referentes aos experimentos de CPP foram analisados por ANOVA de duas vias (câmaras versus tratamento) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para comparação entre os tempos de pré e pós condicionamento na câmara pareada com lidocaína. Na câmara pareada com lidocaína foi utilizada a diferença de escore (tempo teste – tempo pré-condicionamento) para avaliar diferenças entre os grupos CION e Sham usando teste t de *Student*. Esse mesmo teste estatístico foi empregado para avaliação dos dados referentes ao experimento do Campo Aberto. Em todas as análises, valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION

A latência basal para resposta à aplicação de calor na face não diferiu entre o grupo controle ($11,2 \pm 0,6$ s) em relação ao grupo de animais constrictos ($11,5 \pm 0,9$ s). Cinco dias após a cirurgia de constrição, a latência para resposta dos animais constrictos reduziu 45,4 % em relação ao grupo controle, com tempos de reação de $6,0 \pm 0,5$ e $11,0 \pm 0,6$ s, respectivamente, caracterizando o desenvolvimento da hiperalgésia ao calor (FIGURA 5).

Animais constrictos que receberam tratamento sistêmico via subcutânea com lidocaína na dose de 10 mg/Kg no quinto dia pós-CION exibiram um aumento da latência para a resposta à aplicação do calor na face. O efeito anti-hiperalgésico da lidocaína foi detectado 60 min após sua administração e persistiu até o tempo de 120 min. Este tratamento não alterou a latência basal para a resposta dos animais do grupo Sham (FIGURA 5).

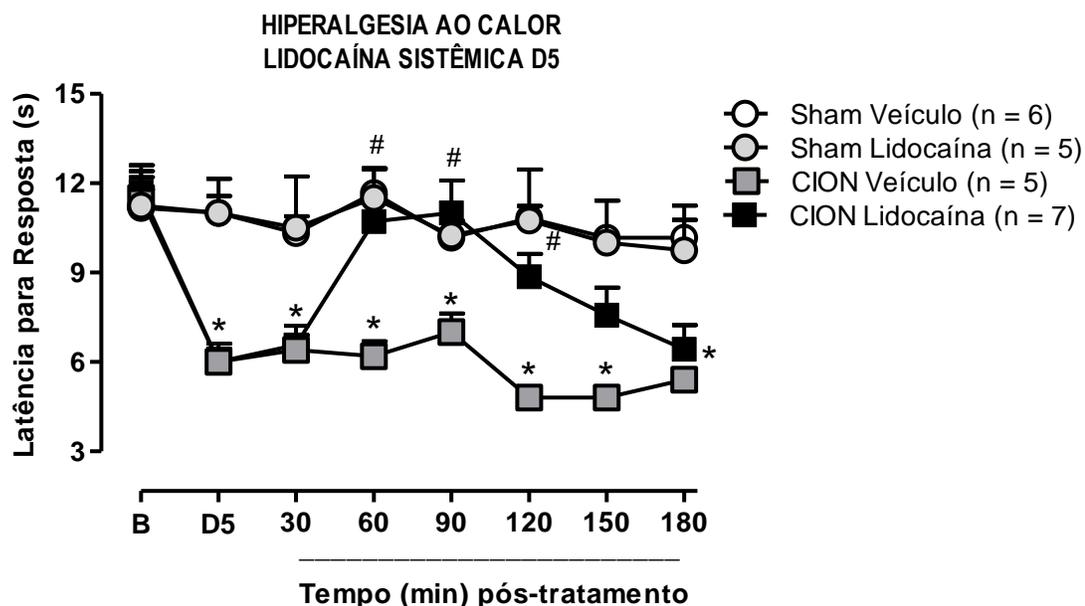


FIGURA 5 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL PÓS-CION

No dia 5 pós-CION os animais receberam lidocaína (10 mg/Kg, s.c.) ou veículo (salina, 1 mL/Kg, s.c.) e a hiperalgesia térmica foi avaliada antes e em intervalos de 30 min até 180 min após os tratamentos. * indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham Veículo. # indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo CION Veículo. As barras indicam o Erro Padrão da Média. B – responsividade basal, antes da cirurgia; D5 – responsividade basal no dia 5 pós-CION. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No teste de CPP não houve diferença entre os tempos de pré e pós-condicionamento nas câmaras pareadas lidocaína, independente do grupo. Os animais do grupo Sham apresentaram tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína nos dias de pré e pós-condicionamento de $357,3 \pm 41,3$ e $354,7 \pm 52,3$ s, respectivamente. Para os animais do grupo CION, os tempos foram de $388,7 \pm 32,6$ e $390,8 \pm 33,2$ s, respectivamente. Estes dados mostram que os tempos de pré e pós-condicionamento na câmara pareada com lidocaína foram equivalentes para ambos os grupos, indicando ausência de CPP (FIGURA 6A).

A diferença de escore permite uma comparação entre os grupos e, neste experimento, foi de $-2,7 \pm 46,6$ s e $2,1 \pm 35,1$ s para os grupos Sham e CION, respectivamente, indicando ausência de CPP para ambos os grupos (FIGURA 6B).

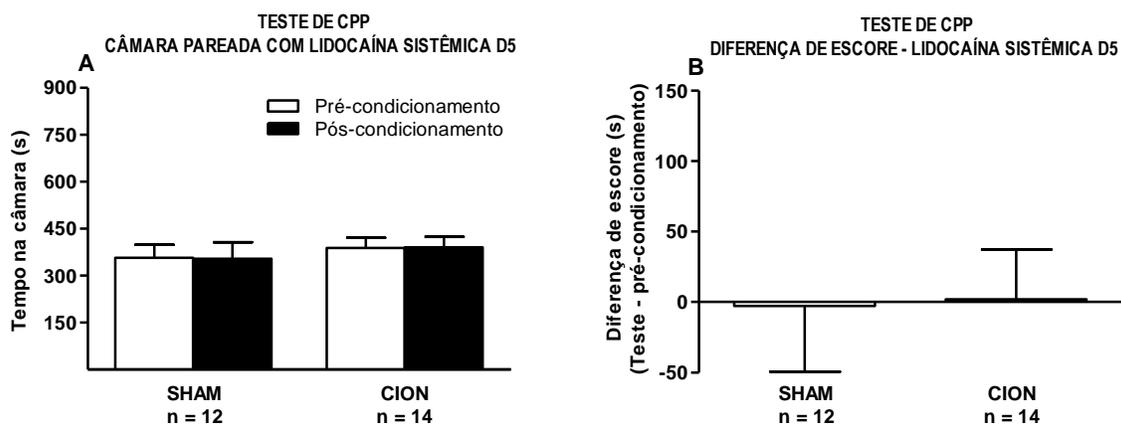


FIGURA 6 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION

Nos dias 4, 5 e 6 pós-CION, os animais foram submetidos ao teste de CPP, sendo que receberam pela via sistêmica lidocaína (10 mg/Kg) e veículo (salina, 1 mL/Kg) no condicionamento (dia 5). O painel A indica os tempos de permanência nas câmaras pareadas com lidocaína no pré e pós-condicionamento. O painel B representa a diferença de escores (pré e pós-condicionamento). As barras indicam o Erro Padrão da Média. D5 – dia 5 pós-CION. CION – Constricção do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Bonferroni (painel A); Teste *t* de Student (painel B).

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION

As injeções no RVM foram realizadas como descrito anteriormente. Para os experimentos envolvendo a avaliação da hiperalgesia térmica, de um total de 97 animais submetidos à cirurgia de canulação, 58 estavam com as cânulas bem posicionadas, representando 59,8%. A figura 7A apresenta o mapa de canulação do RVM representativo para estes experimentos, sendo que os círculos fechados representam o correto posicionamento das cânulas, enquanto os círculos abertos indicam uma canulação incorreta (FIGURA 7A).

A latência basal para resposta à aplicação de calor na face foi avaliada antes da cirurgia para canulação do RVM e antes da cirurgia de constrição. A latência basal verificada no primeiro momento do grupo controle foi de $10,3 \pm 0,6$ s, enquanto que para os animais submetidos à cirurgia de constrição foi de $10,2 \pm 0,5$ s. Sete dias após a cirurgia de canulação, a latência basal para resposta dos animais do grupo Sham foi de $10,7 \pm 0,8$ s, enquanto que para os animais CION foi de $11,1 \pm 0,5$ s. Estes dados indicam que a cirurgia para canulação do RVM não alterou o limiar basal de resposta para o estímulo térmico em ambos os grupos. Cinco dias após a cirurgia de constrição, a latência para resposta dos animais constritos reduziu 36,3% em relação ao grupo controle, com tempos de reação de $6,5 \pm 0,3$ e $10,2 \pm 0,6$ s, respectivamente, caracterizando o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor. O tratamento com lidocaína no RVM não foi capaz de reverter a hiperalgesia ao calor induzida pelo CION e não modificou o limiar de resposta do grupo Sham (FIGURA 7B).

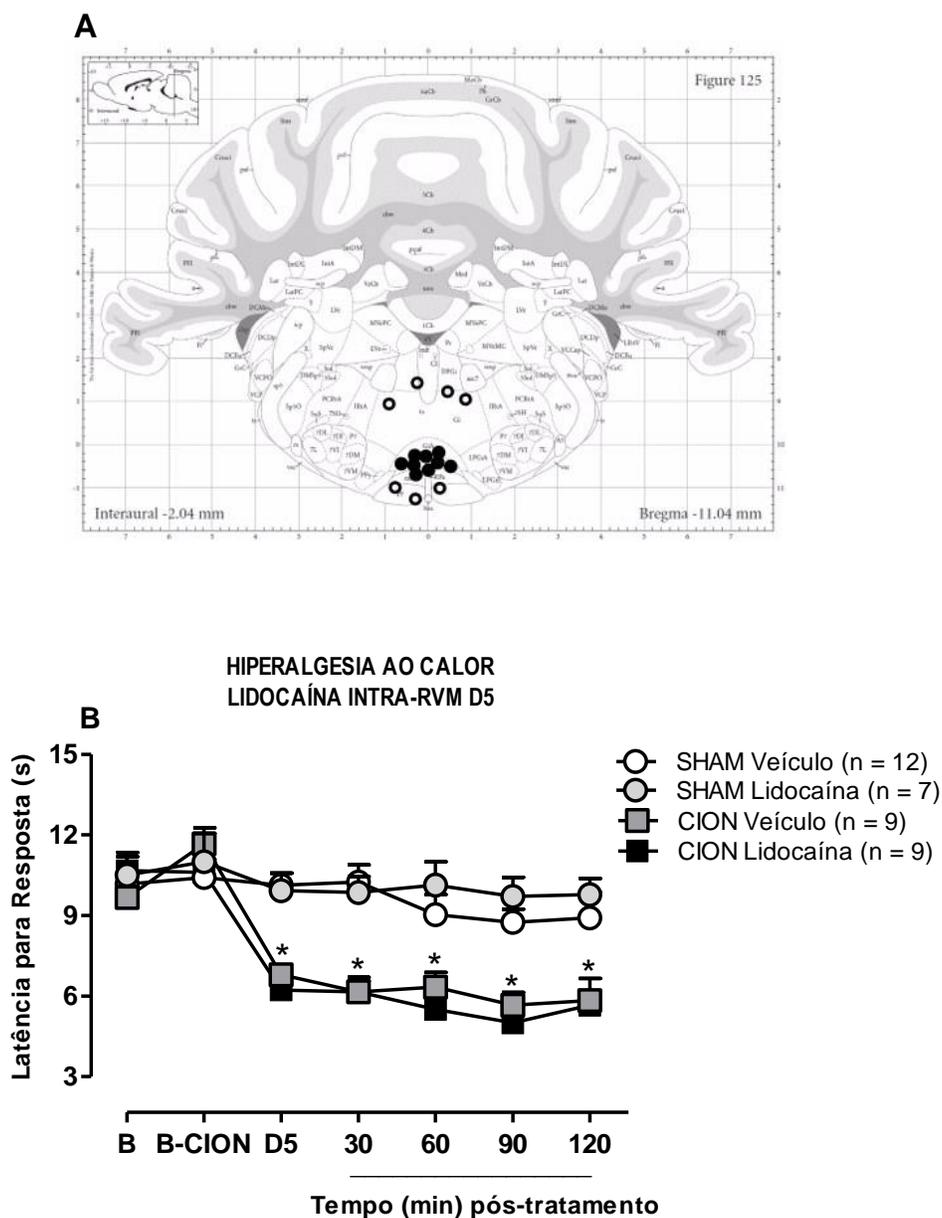


FIGURA 7 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA TÉRMICA OROFACIAL

O painel A representa o mapa de canulação do RVM para os experimentos que avaliaram hiperalgisia térmica, sendo que os círculos fechados representam o correto posicionamento das cânulas e os círculos abertos indicam os *off sets*. No painel B, no dia 5 pós-CION os animais receberam lidocaína (4%, 0,5 μ L) ou veículo (salina, 0,5 μ L) no RVM e a hiperalgisia térmica foi avaliada antes e em intervalos de 30 min até 120 min após os tratamentos. * indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham Veículo. As barras indicam o Erro Padrão da Média. B indica responsividade basal, antes da cirurgia para canulação; B-CION indica responsividade antes da cirurgia de constrição; D5 – responsividade no dia 5 pós-CION. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No teste de CPP não houve diferença entre os tempos de pré e pós-condicionamento nas câmaras pareadas lidocaína, independente do grupo. Os animais do grupo Sham apresentaram tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína nos dias de pré e pós-condicionamento de $375,7 \pm 23,3$ e $428,0 \pm 58,5$ s, respectivamente. Para os animais do grupo CION, os tempos foram de $387,1 \pm 23,3$ e $398,9 \pm 24,4$ s, respectivamente. Estes dados mostram que os tempos de pré e pós-condicionamento na câmara pareada com lidocaína foram equivalentes para ambos os grupos, indicando ausência de CPP (FIGURA 8A).

A comparação entre os grupos usando a diferença de escores indica que os grupos Sham e CION apresentaram tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína equivalentes no dia teste, com valores de $52,3 \pm 64,4$ s e $11,8 \pm 34,0$ s, respectivamente (FIGURA 8B).

A diferença de escores para animais *off sets*, nos quais as cânulas foram implantadas fora da região do RVM, indicou que não houve diferença entre os tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína entre os grupos, com valores de $76,5 \pm 51,5$ s e $53,5 \pm 56,3$ s, para os grupos Sham e CION respectivamente (FIGURA 8C).

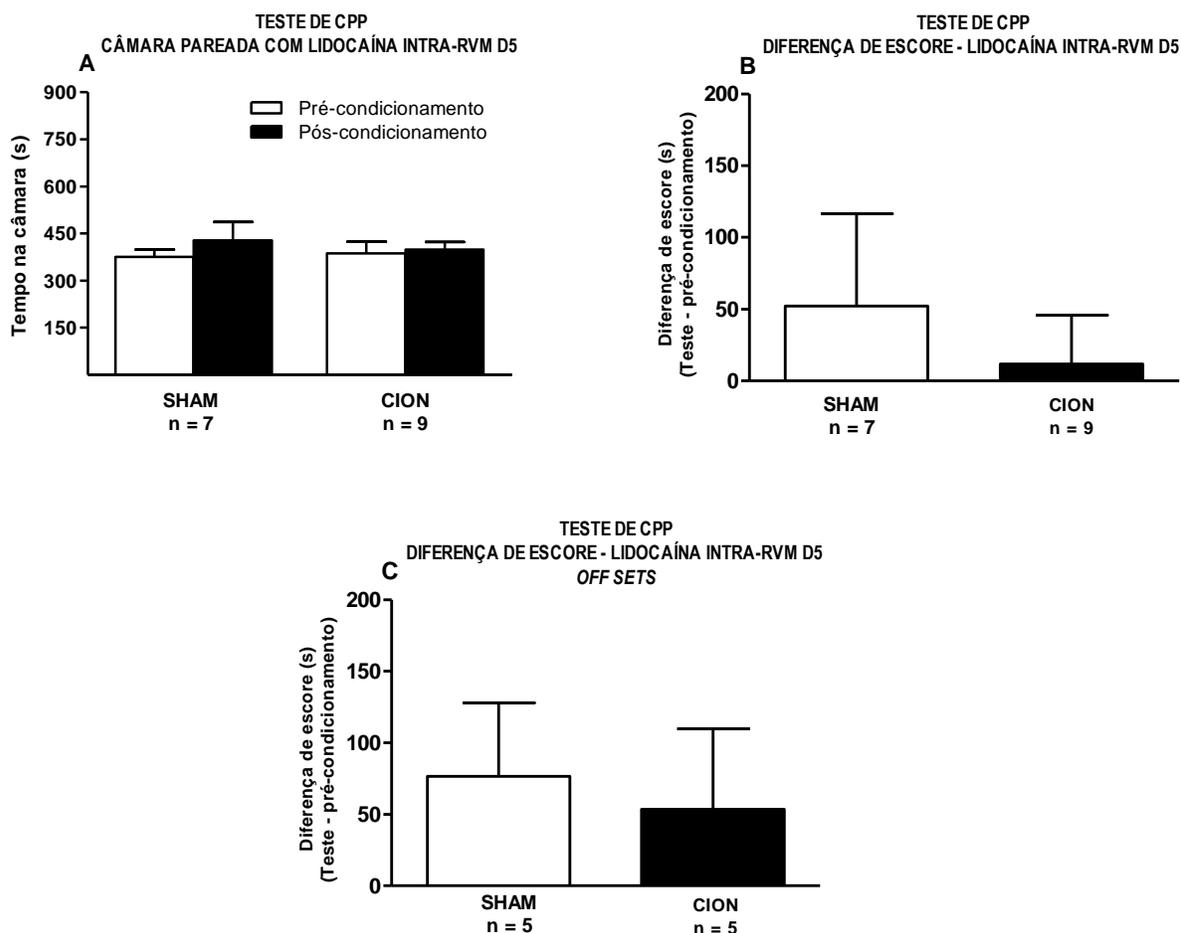


FIGURA 8 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NO TESTE DE CPP 5 DIAS PÓS-CION

Nos dias 4, 5 e 6 pós-CION, os animais foram submetidos ao teste de CPP, sendo que receberam intra-RVM lidocaína (4%, 0,5 μ L) e veículo (salina, 0,5 μ L) no condicionamento (dia 5). O painel A indica os tempos de permanência nas câmaras pareadas com lidocaína no pré e pós-condicionamento. O painel B representa a diferença de escores (pré e pós-condicionamento). O painel C representa a diferença de escores para os animais *off sets*. As barras indicam o Erro Padrão da Média. D5 – dia 5 pós-CION. CION – Construção do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Bonferroni (painel A); Teste *t* de Student (painéis B e C).

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA SISTÊMICA NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION

Nos experimentos que avaliaram a hiperalgesia mecânica orofacial, o limiar de resposta à estimulação mecânica basal para os animais de todos os grupos foi de 8 g. Quinze dias após a cirurgia de constrição, 48,1 % (63/131) dos animais do grupo CION desenvolveram hiperalgesia mecânica, com uma redução de 86,2 % no limiar de resposta ao estímulo (FIGURA 9A).

Animais constrictos hiperalgésicos que receberam tratamento sistêmico via subcutânea com lidocaína na dose de 10 mg/Kg no décimo quinto dia pós-CION exibiram um aumento do limiar para a resposta à aplicação dos filamentos na face. O efeito anti-hiperalgésico da lidocaína foi detectado 30 min após sua administração e persistiu até o tempo de 90 min. Este tratamento não alterou a latência basal para a resposta dos animais dos grupos Sham e CION não-hiperalgésicos (FIGURA 9B).

Com o intuito de avaliar a atividade locomotora dos animais após o tratamento com lidocaína sistêmica, um grupo de animais naïve foi tratado com lidocaína (10 mg/Kg, s.c.) ou veículo (salina 1mL/Kg, s.c.), e submetido ao teste do Campo Aberto. Este tratamento não modificou o número de cruzamentos no teste em relação aos animais tratados com veículo (FIGURA 9C).

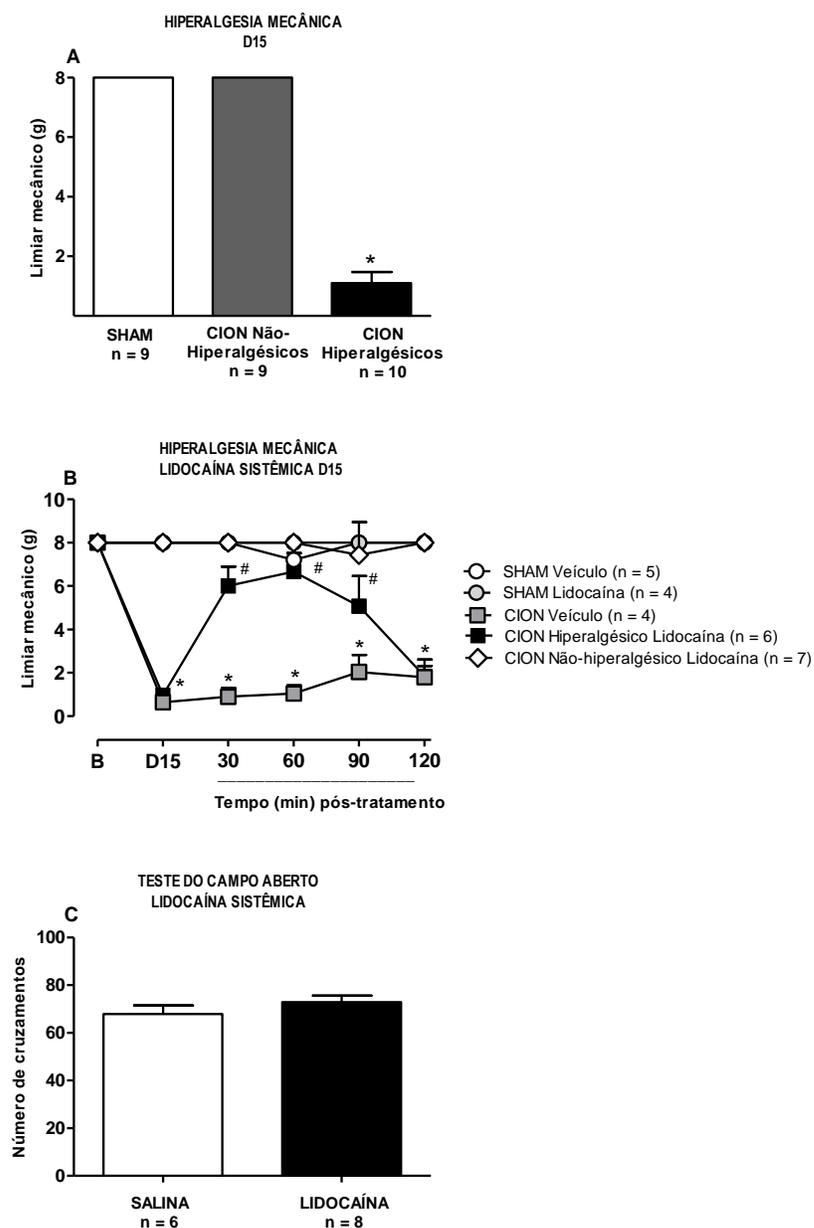


FIGURA 9 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL PÓS-CION

No dia 15 pós-CION o limiar mecânico na face dos animais foi avaliado (painel A). Na sequência, os animais receberam lidocaína (10 mg/Kg, s.c.) ou veículo (salina 1 mL/Kg, s.c.) e a hiperalgisia mecânica foi avaliada em intervalos de 30 min até 120 min após os tratamentos (painel B). O painel C apresenta o número de cruzamentos no teste do Campo Aberto em animais naïve tratados com salina ou lidocaína pela via sistêmica. * indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham Veículo. # indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo CION Veículo. As barras indicam o Erro Padrão da Média. B indica responsividade basal, antes da cirurgia; D15 – responsividade no dia 15 pós-CION. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Bonferroni (painel A). ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls (painel B). Teste *t* de Student (painel C).

No teste de CPP não houve diferença entre os tempos de pré e pós-condicionamento nas câmaras pareadas lidocaína, independente do grupo. Os animais do grupo Sham apresentaram tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína nos dias de pré e pós-condicionamento de $382,3 \pm 23,7$ e $306,0 \pm 29,0$ s, respectivamente. Para os animais do grupo CION hiperalgésico, os tempos foram de $404,5 \pm 32,3$ e $329,2 \pm 40,7$ s, respectivamente. Para os animais do grupo CION não hiperalgésico, os tempos foram de $373,4 \pm 25,2$ e $326,4 \pm 30,2$ s, respectivamente. Estes dados mostram que os tempos de pré e pós-condicionamento na câmara pareada com lidocaína foram equivalentes para os 3 grupos avaliados, indicando ausência de CPP (FIGURA 10A).

A diferença de escore permite uma comparação entre os grupos e, neste experimento, foi de $-76,3 \pm 34,7$ s, $-75,1 \pm 49,8$ e $-47,0 \pm 46,1$ s para os grupos Sham, CION hiperalgésico e CION não-hiperalgésico, respectivamente, indicando ausência de CPP nestes grupos (FIGURA 10B).

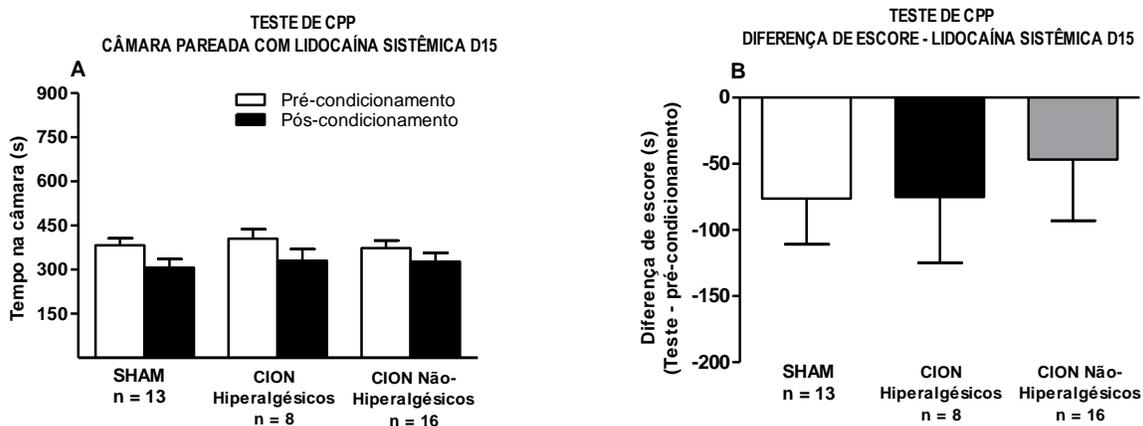


FIGURA 10 – EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM LIDOCAÍNA NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION

Nos dias 14, 15 e 16 pós-CION, os animais foram submetidos ao teste de CPP, sendo que receberam pela via sistêmica lidocaína (10 mg/Kg) e veículo (salina, 1 mL/Kg) no condicionamento (dia 15). O painel A indica os tempos de permanência nas câmaras pareadas com lidocaína no pré e pós-condicionamento. O painel B representa a diferença de escores (pré e pós-condicionamento). As barras indicam o Erro Padrão da Média. D15 – dia 15 pós-CION. CION – Constricção do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Bonferroni.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL E NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION

As injeções no RVM foram realizadas como descrito anteriormente. Para os experimentos envolvendo a avaliação da hiperalgesia mecânica, de um total de 128 animais submetidos à cirurgia de canulação, 84 estavam com as cânulas bem posicionadas, representando 65,6%. A figura 11A apresenta o mapa de canulação do RVM representativo para estes experimentos, sendo que os círculos fechados representam o correto posicionamento das cânulas, enquanto os círculos abertos indicam uma canulação incorreta (FIGURA 11A).

O limiar mecânico basal dos animais foi avaliado antes da cirurgia para canulação do RVM e antes da cirurgia de constrição. O limiar de resposta verificado no primeiro momento dos grupos controle e CION foi de 8 g. Sete dias após a cirurgia de canulação, o limiar para resposta dos animais para ambos os grupos se manteve em 8 g, indicando que a cirurgia para canulação do RVM não alterou o limiar basal de resposta para o estímulo mecânico. Quinze dias após a cirurgia de constrição, o limiar mecânico de resposta dos animais hiperalgésicos reduziu 85,2 % em relação ao grupo controle, caracterizando o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica neste grupo. Animais constritos não hiperalgésicos não apresentaram diferença no limiar de resposta (FIGURA 11B).

Animais hiperalgésicos que receberam tratamento com lidocaína no RVM no décimo quinto dia pós-CION exibiram um aumento do limiar para a resposta à aplicação dos filamentos na face. O efeito anti-hiperalgésico da lidocaína foi detectado nos tempos de 30 e 60 min após sua administração. Este tratamento não alterou a latência basal para a resposta dos animais do grupo Sham (FIGURA 11B).

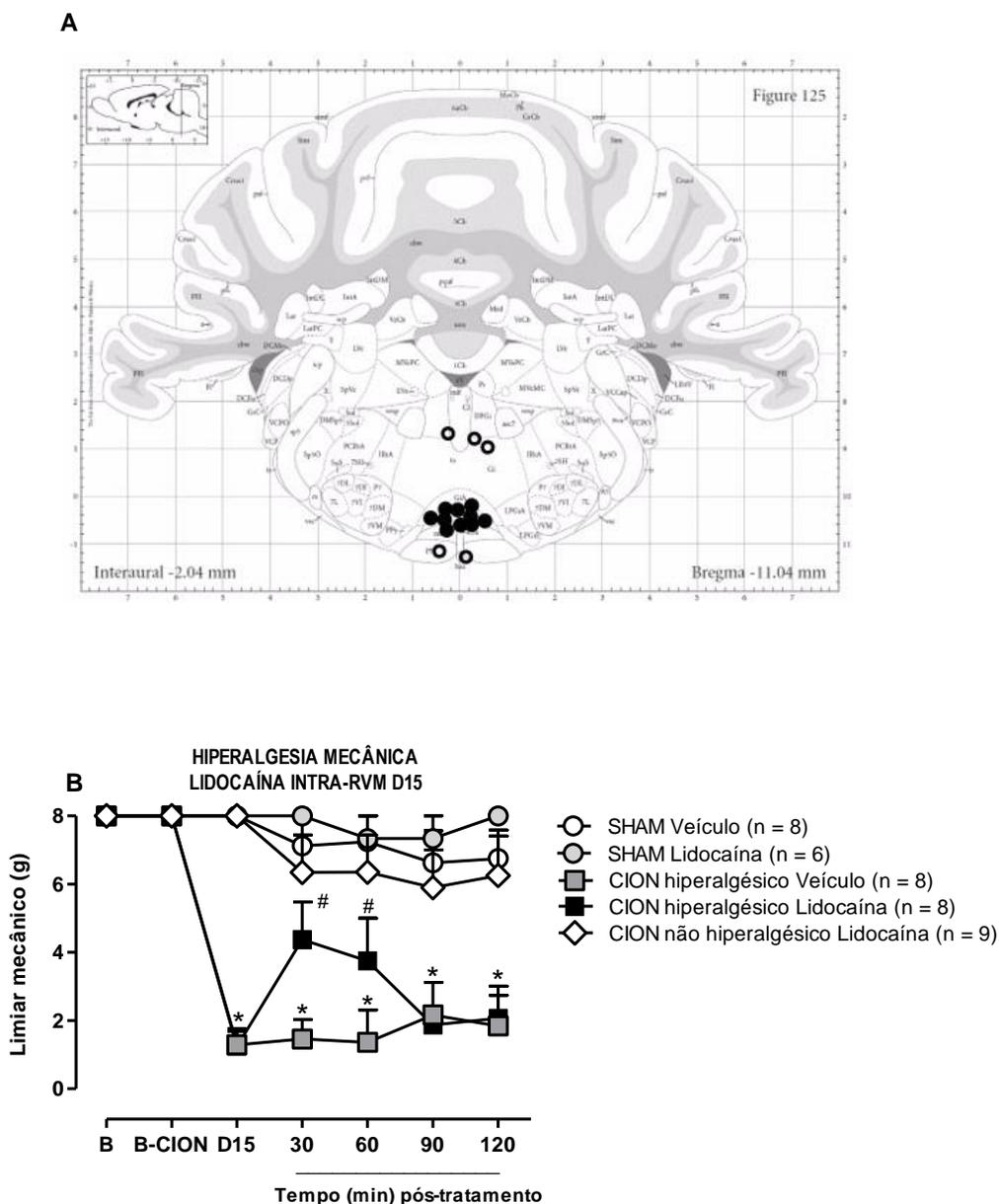


FIGURA 11 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NA HIPERALGESIA MECÂNICA OROFACIAL

O painel A representa o mapa de canulação do RVM para os experimentos que avaliaram hiperalgisia mecânica, sendo que os círculos fechados representam o correto posicionamento das cânulas e os círculos abertos indicam os *off sets*. No painel B, no dia 15 pós-CION os animais receberam lidocaína (4%, 0,5 μ L) ou veículo (salina, 0,5 μ L) intra-RVM e a hiperalgisia mecânica foi avaliada antes e em intervalos de 30 min até 120 min após os tratamentos. * indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo Sham Veículo. # indicam $P < 0,05$ em relação ao grupo CION hiperalгésico Veículo. As barras indicam o Erro Padrão da Média. B indica responsividade basal, antes da cirurgia para canulação; B-CION indica responsividade antes da cirurgia de constrição; D15 – responsividade no dia 15 pós-CION. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial. ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No teste de CPP não houve diferença entre os tempos de pré e pós-condicionamento nas câmaras pareadas lidocaína, independente do grupo. Os animais do grupo Sham apresentaram tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína nos dias de pré e pós-condicionamento de $389,8 \pm 30,7$ s e $394,5 \pm 32,1$ s, respectivamente. Para os animais do grupo CION não hiperalgésico, os tempos foram de $431,6 \pm 28,1$ e $435,6 \pm 34,0$ s, respectivamente. Estes dados mostram que os tempos de pré e pós-condicionamento na câmara pareada com lidocaína foram equivalentes para os grupos Sham e CION não hiperalgésicos, indicando ausência de CPP nestes 2 grupos. Os animais CION hiperalgésicos demonstraram um aumento no tempo de permanência na câmara pareada com lidocaína no dia teste em comparação com o tempo de pré-condicionamento, com tempos de $529,1 \pm 34,7$ s e $350,4 \pm 33,8$ s, respectivamente, indicando CPP (FIGURA 12A).

A comparação entre os grupos utilizando a diferença de escore mostrou tempos de $4,8 \pm 27,6$ s, $9,9 \pm 31,5$ s para os grupos Sham e CION não-hiperalgésicos, respectivamente. Para os animais do grupo CION hiperalgésicos a diferença de escore foi de $178,7 \pm 53,5$ s, indicando a presença de CPP neste grupo (FIGURA 12B).

A diferença de escores para animais *off sets* indicou que não houve diferença entre os tempos de permanência na câmara pareada com lidocaína entre os grupos, com valores de $1,0 \pm 66,5$ s, $22,5 \pm 53,9$ s e $-22,0 \pm 41,6$ s, para os grupos Sham, CION hiperalgésicos e CION não-hiperalgésicos, respectivamente, indicando ausência de CPP (FIGURA 12C).

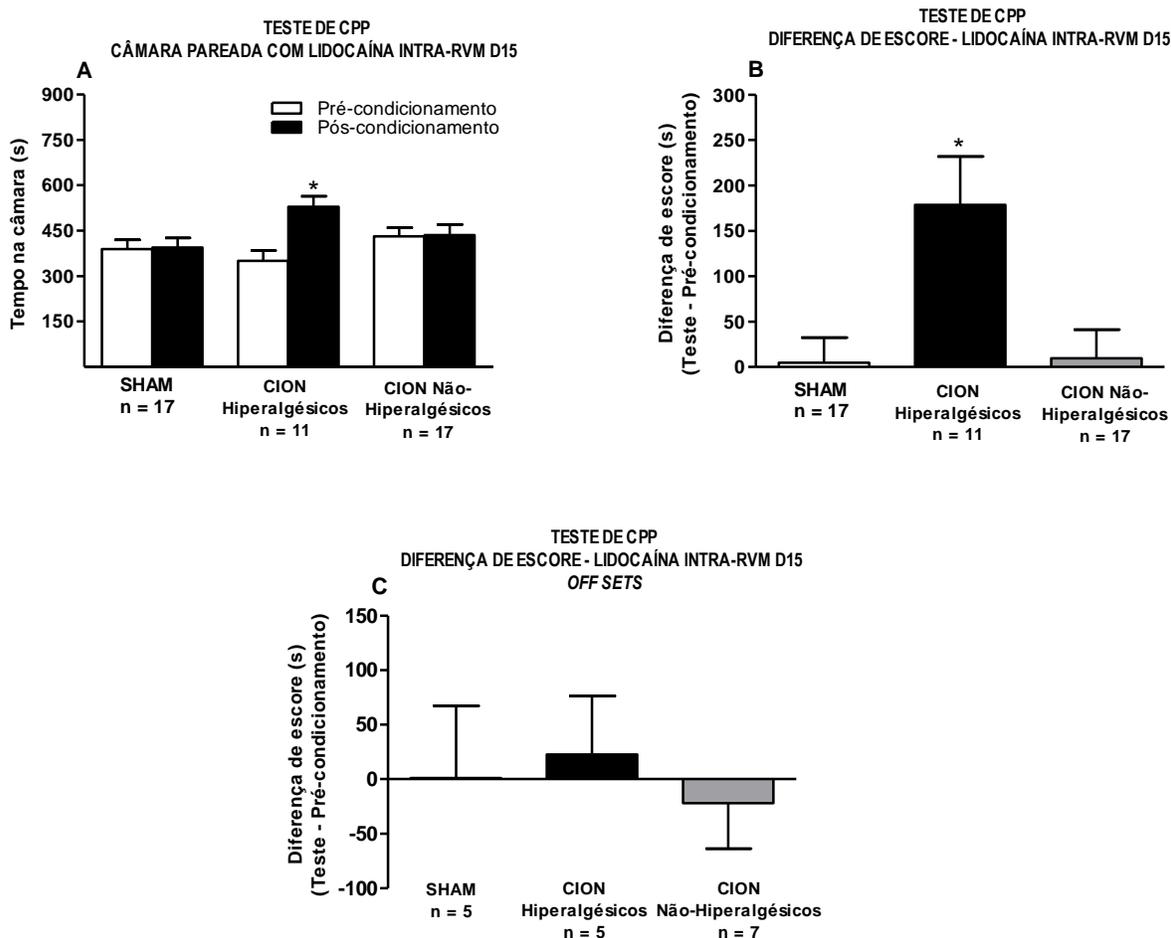


FIGURA 12 – EFEITO DO TRATAMENTO COM LIDOCAÍNA NO RVM NO TESTE DE CPP 15 DIAS PÓS-CION

Nos dias 14, 15 e 16 pós-CION, os animais foram submetidos ao teste de CPP, sendo que receberam intra-RVM lidocaína (4%, 0,5 μ L) e veículo (salina, 0,5 μ L) no condicionamento (dia 15). O painel A indica os tempos de permanência nas câmaras pareadas com lidocaína no pré e pós-condicionamento. O painel B representa a diferença de escores (pré e pós-condicionamento). O painel C representa a diferença de escores para os animais *off sets*. * indicam $P < 0,05$ em relação ao tempo de pré-condicionamento (painel A) e em relação ao grupo Sham (painel B). As barras indicam o Erro Padrão da Média. D15 – dia 15 pós-CION. CION – Constrição do Nervo Infraorbital. CPP – Preferência Condicionada de Lugar. RVM – Bulbo Rostral Ventromedial. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post hoc* de Bonferroni.

5.5 RESUMO DOS RESULTADOS

O tratamento sistêmico com lidocaína resultou na redução da hiperalgesia térmica e mecânica, porém não induziu CPP em ambos os intervalos avaliados. A administração intra-RVM de lidocaína não teve efeito na hiperalgesia ao calor e no teste de CPP no dia 5. No entanto, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e induzir CPP no dia 15 pós-CION (ESQUEMA 5).

TRATAMENTOS	PARÂMETROS AVALIADOS			
	Dia 5 pós-CION		Dia 15 pós-CION	
	Hiperalgesia ao calor	Preferência no Teste de CPP	Hiperalgesia mecânica	Preferência no Teste de CPP
Lidocaína s.c. (10 mg/Kg)	↓	—	↓	—
Lidocaína intra-RVM (4%, 0,5 µL)	NA	—	↓	+

ESQUEMA 5 – INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA AO CALOR E MECÂNICA INDUZIDA PELA CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO E NO TESTE DE CPP EM DIFERENTES TIME-POINTS

Os símbolos ↓, NA, – e + indicam reduziu, não alterou, ausência e presença, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o tratamento sistêmico com lidocaína foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela cirurgia de constrição do nervo infraorbital em ratos, sem indução de CPP nos diferentes intervalos avaliados. Por outro lado, o tratamento intra-RVM com lidocaína foi capaz de reduzir somente a hiperalgesia mecânica e induzir CPP 15 dias pós-CION. Estes achados mostram a participação de vias descendentes facilitatórias do RVM na hiperalgesia mecânica e na dor tônica observadas no modelo. Isto está de acordo com estudos da literatura que sugerem um aumento na facilitação descendente em pacientes com diferentes tipos de dor crônica orofacial (Pielsticker *et al.*, 2005; Sandrini *et al.*, 2006; Moulton *et al.*, 2008; Mainero *et al.*, 2011; Monaco *et al.*, 2015), o que permite sugerir que o RVM perde o seu papel de controle bidirecional em um estado de dor crônica e passa a ter uma influência mais facilitatória da dor quando comparada a uma condição de dor aguda.

Pacientes com dor neuropática trigeminal, incluindo a TN, reportam hiperalgesia ao calor (Eide e Rabben, 1998; Younis *et al.*, 2016). De forma interessante, a cirurgia de constrição do nervo infraorbital induz o desenvolvimento de hiperalgesia térmica de curta duração. Imamura e colaboradores, utilizando o modelo de CION em ratos, reportaram o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor entre os dias 4 e 12 pós-construção no lado ipsilateral à cirurgia (Imamura *et al.*, 1997). Outro estudo avaliou as respostas ao calor de ratos submetidos à cirurgia de constrição e observou que após a cirurgia os animais constritos apresentaram uma latência para a resposta reduzida quando comparados aos grupos Sham e naïve, sendo a hiperalgesia ao calor observada entre os dias 2 e 10 pós-construção (Chichorro *et al.*, 2009) e este achado também foi reportado por outro estudo que utilizou o mesmo modelo animal (Luiz *et al.*, 2010).

Poucos estudos avaliaram os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de hiperalgesia ao calor neste processo. Urano e colaboradores, utilizando o modelo de ligadura parcial do ramo infraorbital, reportaram o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor e mecânica na região de inserção das vibrissas de animais constritos. Neste estudo, o tratamento local com um antagonista de receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1, do inglês *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), a

capsazepina, foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica de forma dose dependente, sem alterar o limiar mecânico. Além disso, o número de células positivas para TRPV1 no gânglio trigeminal estava aumentado para o grupo constricto, o que sugere a participação destes receptores no desenvolvimento de hiperalgesia térmica neste modelo (Urano *et al.*, 2012). Considerando que as fibras C são seletivamente destruídas pelo tratamento com resiniferotoxina (RTX), um análogo à capsaicina, o estudo de Cruz e colaboradores avaliou o efeito da administração intraganglionar de RTX na hiperalgesia induzida pela cirurgia de constrição do nervo infraorbital em ratos. Este tratamento foi capaz de prevenir o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor no grupo constricto, sem alterar o limiar de resposta do grupo controle, demonstrando que neurônios do gânglio trigeminal que expressam TRPV1 são importantes para o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor neste modelo (Cruz *et al.*, 2014). Estes dados indicam que o quadro de hiperalgesia térmica orofacial é resultado de uma sensibilização periférica de fibras C. O presente estudo demonstrou que a hiperalgesia ao calor induzida pelo CION é reduzida pelo tratamento por via sistêmica com lidocaína, mas não é afetada pela administração de lidocaína no RVM, o que corrobora estes estudos anteriores.

Achados clínicos indicam que anormalidades sensoriais são mais frequentes no lado sintomático em pacientes com TN (Maier *et al.*, 2010; Maarbjerg *et al.*, 2014; Younis *et al.*, 2016). De forma semelhante, a hiperalgesia ao calor pós-CION é restrita ao lado ipsilateral à cirurgia (Chichorro *et al.*, 2009; Luiz *et al.*, 2010), o que suporta a ideia de que há sensibilização neuronal periférica, mas não central. Não se pode descartar a hipótese de que a lidocaína possa atuar também centralmente. O estudo de Mao & Chen abordou diferentes aspectos do uso de lidocaína sistêmica para tratamento de dores de origem neuropática e indicou que a lidocaína pode atuar em alvos periféricos e centrais (Mao e Chen, 2000). Porém, mais estudos são necessários para elucidar esta questão. Apesar disso, pode-se especular que a hiperalgesia ao calor reflete uma sensibilização periférica inicial, que possivelmente contribui para a sensibilização central e subsequentes alterações sensoriais.

Além dos ataques de dor e alterações sensoriais, a dor persistente também tem sido reportada por uma proporção importante de pacientes com TN (Ichida *et al.*, 2015;

Younis *et al.*, 2016). Poucos estudos têm avaliado dor tônica em modelos de dor crônica. Isto parece não considerar o fato de que muitas vezes a primeira queixa de dor dos pacientes é a dor espontânea, e não hiperalgesia ou alodinia (Backonja e Stacey, 2004). No presente estudo, para avaliar a dor tônica no modelo de CION foi utilizado o teste de CPP, baseado em demonstrações anteriores de que o alívio da dor produz CPP para um contexto distinto (King *et al.*, 2009; King *et al.*, 2011; Okun *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2011; Okun *et al.*, 2012). Os tratamentos com lidocaína sistêmica ou no RVM não produziram CPP durante a fase inicial (5 dias) pós-CION, onde há hiperalgesia térmica. Isto indica que a cirurgia de constrição não induz dor tônica neste *time-point*.

Pode-se especular que o tratamento sistêmico não induziu CPP em função das propriedades farmacocinéticas da lidocaína, o que poderia dificultar a associação entre o alívio da dor e o contexto. A dose utilizada também poderia não ter sido suficiente para observar um efeito. No entanto, a mesma dose foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica pós-CION, indicando que esta dose foi suficiente para bloquear a dor evocada nesta fase. Outro aspecto é que o alívio da dor tônica pode ter ocorrido em um momento distinto do tempo de condicionamento com a droga. O decurso temporal do efeito do tratamento sistêmico com lidocaína na hiperalgesia ao calor indica ausência de efeito nos primeiros 30 min após a injeção e, em função disso, é possível que o pareamento com lidocaína não tenha sido realizado no tempo ideal para o pareamento do contexto com alívio da dor.

Além da hiperalgesia térmica, pacientes com TN também reportam hiperalgesia mecânica (Maier *et al.*, 2010). A hiperalgesia à estímulos mecânicos é reportada por diferentes estudos que demonstram que a cirurgia de constrição induz este quadro aproximadamente entre 10 e 15 dias após a lesão (Vos *et al.*, 1994; Chichorro *et al.*, 2006 [a]; Coelho *et al.*, 2014; Michot *et al.*, 2015).

O presente estudo demonstra pela primeira vez um aspecto importante com relação à hiperalgesia mecânica orofacial. Somente uma parte dos animais (48%) submetidos à cirurgia de CION desenvolveram esta alteração sensorial. Isto representa uma diferença adicional em relação à hiperalgesia ao calor, a qual foi detectada em praticamente todos os animais avaliados. Nesse sentido, De Felice e colaboradores

demonstraram que, após a cirurgia de ligadura de nervo espinhal, 85% dos ratos *Sprague-Dawley* e 51% dos ratos *Holtzman* desenvolveram alodinia mecânica (De Felice *et al.*, 2011). A maioria dos modelos animais utilizados para o estudo da dor neuropática avalia os animais com lesão consistente, ou seja, que representam um estado “doloroso”. Entretanto, algumas linhagens animais são resistentes ao desenvolvimento de dor neuropática experimental. Da mesma forma como em humanos, as razões para a susceptibilidade e/ou resistência a dor neuropática experimental ainda não são bem entendidas (De Felice *et al.*, 2011).

Estes dados estão de acordo com evidências clínicas que mostram que a dor neuropática não se desenvolve em todos os pacientes com lesão de nervo ou outro potencial fator iniciante. Existem diversas condições que podem predispor um indivíduo à dor neuropática. No entanto, as disfunções sensoriais mais comuns são hipoestésias, parestesias e disestesias, que são consideradas desagradáveis, mas não dolorosas. De fato, sabe-se que a dor neuropática afeta cerca de 10% dos indivíduos com predisposição (Ossipov e Porreca, 2005). É possível que um dos fatores de risco para o desenvolvimento da dor neuropática seja justamente a incapacidade do indivíduo de restabelecer o equilíbrio do sistema bidirecional de controle descendente da dor, após a sua mudança para um status facilitatório.

O presente estudo demonstrou que o tratamento com lidocaína por via sistêmica ou no RVM 15 dias após a cirurgia de contração foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica, indicando que esta alteração sensorial envolve mecanismos periféricos e centrais (Ziegler *et al.*, 1999). Este achado corrobora outros estudos que mostram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica contralateral após cirurgia de contração, o que indica o envolvimento de estruturas centrais. Nesse sentido, o estudo de Vos e colaboradores demonstrou um aumento na responsividade ao estímulo mecânico no território facial contralateral à cirurgia e, aproximadamente 30 dias após a contração, outras regiões faciais também apresentavam um limiar alterado ao estímulo (Vos *et al.*, 1994). O estudo de Chichorro e colaboradores também demonstrou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica orofacial bilateral na face de ratos submetidos à contração do nervo infraorbital (Chichorro *et al.*, 2006 [a]).

Clinicamente, a hiperalgesia mecânica representa uma das alterações sensoriais mais frequentes em pacientes com TN e é observada de forma bilateral, apesar dos pacientes reportarem quase exclusivamente dor unilateral (Maier *et al.*, 2010; Ichida *et al.*, 2015; Younis *et al.*, 2016). Os dados do presente estudo sugerem que este aspecto da TN pode ser resultado de sensibilização central e mediado por vias facilitatórias descendentes a partir do RVM, uma vez que a administração intra-RVM de lidocaína 15 dias pós-CION reduziu a hiperalgesia mecânica nos animais constrictos.

O papel do RVM na dor neuropática tem sido investigado em modelos pré-clínicos que envolvem lesão de nervos espinais. Utilizando o modelo de ligadura de nervo espinal, o estudo de Burgess e colaboradores demonstrou que a microinjeção bilateral de lidocaína no RVM 3 dias após a cirurgia não alterou o limiar mecânico de retirada da pata no teste do von Frey, bem como não modificou a latência para resposta ao calor radiante aplicado na superfície plantar da pata traseira de ratos. No entanto, a administração intra-RVM da mesma dose de lidocaína nos dias 6, 9 ou 12 após a cirurgia foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela ligadura. Isto demonstra que, em um estágio inicial, a hiperalgesia térmica e mecânica são independentes da modulação descendente a partir do RVM. Ambas passam a ser dependentes da facilitação descendente a partir da segunda semana após a lesão, o que indica um importante papel da facilitação descendente na manutenção do estado de dor neuropática experimental (Burgess *et al.*, 2002). Utilizando o mesmo modelo animal e medidas de hiperalgesia mecânica e térmica, o estudo de Wang e colaboradores demonstrou que a hiperalgesia induzida pela lesão de nervo muda ao longo do tempo. Além disso, o estudo mostrou que a microinjeção de lidocaína no RVM 14 ou 60 dias após a cirurgia foi capaz de reverter a hiperalgesia mecânica induzida pela ligadura, demonstrando que vias modulatórias descendentes de dor a partir do RVM mantêm a dor induzida pela lesão de nervo por 60 dias após a lesão, um *time-point* em que a hiperalgesia térmica está resolvida, mas a hiperalgesia mecânica persiste (Wang *et al.*, 2013).

Outros estudos têm demonstrado o envolvimento de vias descendentes modulatórias da dor na sensibilização central em diferentes modelos (Bee e Dickenson, 2008; King *et al.*, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009; Havelin *et al.*, 2016). O estudo de

Bee & Dickenson mostrou que a facilitação supraespinhal desempenha um papel importante no processamento neuronal frente à estímulos nocivos e que neurônios envolvidos na facilitação descendente são responsáveis pela manutenção da hiperalgesia à estímulos mecânicos durante estágios mais tardios após lesão de nervo (Bee e Dickenson, 2008). A participação de vias descendentes facilitatórias a partir do RVM e a expressão de Fos no corno dorsal da medula espinhal em resposta a estimulação não-nociva têm sido utilizados como indicativos do desenvolvimento de sensibilização central (Ossipov *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). Considerando isto, o estudo de Havelin e colaboradores, utilizando um modelo de osteoartrite, mostrou que a manipulação da articulação afetada induziu a expressão de Fos no corno dorsal da medula espinhal de animais tratados com injeção intra-articular de altas doses de monoiodo acetato de sódio e não no grupo tratado com salina, indicando que esta manipulação é inócua e que a sensibilização central ocorre seletivamente em animais com dor tônica. Além disso, Havelin e colaboradores demonstraram que o bloqueio do RVM com lidocaína induziu CPP nos animais com osteoartrite, indicando o desenvolvimento de dor tônica e a participação das vias descendentes facilitatórias neste modelo (Havelin *et al.*, 2016).

Pode-se especular que algumas vias específicas estejam envolvidas na facilitação descendente a partir do RVM. O estudo de Porreca e colaboradores demonstrou que após uma microinjeção intra-RVM do conjugado dermorfina-saporina, que reduz o número de células que expressam receptores μ opioides, animais submetidos à lesão de nervo não apresentaram um aumento da sensibilidade a estímulos inócuos térmicos ou mecânicos aplicados na pata. Este efeito foi bloqueado com um antagonista μ opioide, indicando uma interação específica do conjugado com os receptores μ . Este estudo ainda demonstrou que o tratamento com o conjugado foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela lesão, o que confirma a hipótese de que uma atividade anormal do processo descendente facilitatório pode representar um mecanismo para a dor crônica (Porreca *et al.*, 2001).

Outro estudo, de Kovelowski e colaboradores, mostrou que o tratamento intra-RVM com um antagonista seletivo de CCK2, um peptídeo pronociceptivo, em animais

submetidos à lesão de nervo foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica, sugerindo que a CCK endógena pode atuar como um importante *input* excitatório no RVM (Kovelowski *et al.*, 2000). Em adição, o estudo de Zhang e colaboradores demonstrou que o tratamento intra-RVM com CCK-saporina ou dermorfina-saporina resultou em concomitante perda de células que expressam receptores para CCK2 e μ opioides e redução da hiperalgesia induzida pela microinjeção intra-RVM de CCK. Isto demonstra que as células do RVM que coexpressam estes receptores atuam na facilitação da dor e podem ser diretamente ativadas pela CCK (Zhang *et al.*, 2009). Considerando isto, uma avaliação de diferentes vias a partir do RVM que possam estar envolvidas no desenvolvimento de hiperalgesia orofacial no modelo de constrição do nervo infraorbital ainda se faz necessária.

O tratamento com lidocaína sistêmica não induziu CPP na dose que reverteu a hiperalgesia mecânica no dia 15 pós-CION. Em contraste, quando administrada no RVM induziu CPP no mesmo *time-point*. Estes dados sugerem que a dor tônica associada à CION se desenvolve em períodos mais tardios após a lesão do nervo e parece estar relacionada à ativação de vias descendentes facilitatórias de dor a partir do RVM. Alguns estudos já demonstraram o papel de vias descendentes a partir do RVM na manutenção de dores crônicas (Burgess *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013). O estudo de King e colaboradores observou que a administração intratecal de clonidina ou ω -conotoxina MVIIA, utilizadas clinicamente para o alívio da dor neuropática, é capaz de reverter a alodinia mecânica e concomitantemente produzir CPP em animais submetidos a cirurgia de ligadura dos ramos L5 e L6 espinhais. Além disso, o tratamento intra-RVM com lidocaína induziu CPP em ratos submetidos a cirurgia, independente do protocolo de pareamento utilizado, sendo esta uma evidência direta de que a facilitação descendente a partir do RVM pode amplificar a dor neuropática tônica. A presença de CPP foi observada seletivamente pelo bloqueio dos circuitos modulatórios descendentes de dor ou pela modulação direta de neurônios espinhais. Isto demonstra que modelos animais de dor neuropática apresentam um importante componente tônico. Dando suporte a estes dados, o tratamento intratecal com adenosina reverteu a alodinia mecânica, mas não foi capaz de induzir CPP nos animais submetidos a cirurgia, mostrando que a

hiperalgesia evocada pode ser bloqueada com tratamentos que não são efetivos para a dor tônica (King *et al.*, 2009).

Importante considerar que existem diferenças morfológicas e neuroquímicas nas projeções descendentes a partir do RVM para o núcleo trigeminal e corno dorsal da medula. Enquanto neurônios do RVM enviam predominantemente projeções GABAérgicas para o corno dorsal da medula e fornecem entrada direta de neurônios pós-sinápticos (como interneurônios ou neurônios de projeção ascendente), a projeção do RVM para o núcleo trigeminal é mais orientada para os dendritos e é apenas modestamente GABAérgica (Aicher *et al.*, 2012). A inativação do RVM pode interferir de forma diferente na modulação da dor a partir desta estrutura para níveis trigeminal e espinhal. No estudo de Edelmayer e colaboradores, a inativação do RVM pela injeção local de bupivacaína 30 min após a administração de mediadores inflamatórios na dura-máter bloqueou completamente a alodinia mecânica induzida por inflamação na testa, enquanto que a alodinia mecânica foi parcialmente atenuada na superfície plantar da pata traseira (Edelmayer *et al.*, 2009). Estes resultados indicam que a modulação descendente a partir do RVM para o núcleo trigeminal e corno dorsal da medula não é uniforme e pode ocorrer de forma diferente. Este estudo ainda reportou que a alodinia facial induzida pela administração de mediadores inflamatórios na dura-máter, com pico em 3 h após o tratamento, pode ser revertida por agentes utilizados clinicamente, como sumatriptan e naproxeno via sistêmica. Outro aspecto importante é que técnicas de eletrofisiologia confirmaram a ativação de células *on* e supressão da atividade de células *off* do RVM após o tratamento com mediadores inflamatórios. Estes achados mostram a influência da facilitação descendente a partir do RVM no desenvolvimento da alodinia facial (Edelmayer *et al.*, 2009).

O estudo de Sugiyo e colaboradores utilizou técnicas de marcação neuronal e imunocitoquímica para demonstrar a presença de conexões funcionais entre a zona de transição ventral entre os subnúcleos trigeminais *interpolaris* e *caudalis* (Vi/Vc) e o RVM. Esta via Vi/Vc-RVM é ativada após lesão profunda induzida no masseter por CFA e tem importante contribuição na facilitação da hiperalgesia orofacial. Este estudo ainda demonstrou que a inativação do RVM com ácido ibotênico foi capaz de atenuar a

hiperalgesia mecânica no masseter induzida por CFA no lado ipsilateral à injeção (Sugiyo *et al.*, 2005).

Os achados do presente estudo também corroboram alguns estudos clínicos. Estudos em pacientes com migrânea e TN mostraram anormalidades na substância cinzenta desta população, indicando um sistema modulatório descendente prejudicado (Rocca *et al.*, 2006; Desouza *et al.*, 2013). Além disso, tem sido reportado que a facilitação central do processamento nociceptivo trigeminal somente é detectada em pacientes com TN e concomitante dor crônica orofacial (Obermann *et al.*, 2007).

7 CONCLUSÃO

Após a cirurgia de constrição do nervo infraorbital os animais desenvolveram hiperalgesia orofacial térmica ao calor e mecânica, observada com pico nos dias 5 e 15, respectivamente. Na fase inicial pós-CION, o tratamento sistêmico com lidocaína resultou na redução da hiperalgesia térmica, enquanto que o tratamento intra-RVM não foi capaz de alterar a latência para a resposta ao estímulo. Além disso, não houve indução de CPP com ambos os tratamentos. Quinze dias pós-CION, os tratamentos sistêmico e intra-RVM com lidocaína foram capazes de reduzir a hiperalgesia mecânica. No entanto, somente o tratamento intra-RVM foi capaz de induzir CPP neste *time point*.

Estes achados confirmam a hipótese inicial de que as vias descendentes facilitatórias do RVM contribuem para a hiperalgesia mecânica e a dor tônica 15 dias pós-CION, mas não participam da hiperalgesia ao calor 5 dias após a cirurgia.

Tendo em vista as diferenças observadas na ação da lidocaína sistêmica e intra-RVM na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital, bem como no teste de CPP em diferentes *time-points*, pode-se sugerir que as alterações sensoriais iniciais após a constrição dependem de mecanismos periféricos, enquanto que as alterações mais tardias possivelmente refletem a presença de sensibilização central e são mantidas por projeções facilitatórias descendentes a partir do RVM. Estes dados sugerem que a investigação destas vias facilitatórias da dor a partir do RVM pode fornecer um novo alvo molecular para melhorar o tratamento da dor persistente associada à TN.

REFERÊNCIAS

- AICHER, S. A. ; HERMES, S. M.; WHITTIER, K. L.; HEGARTY, D. M. Descending projections from the rostral ventromedial medulla (RVM) to trigeminal and spinal dorsal horns are morphologically and neurochemically distinct. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 43, n. 2, p. 103-11, Mar 2012.
- AKERMAN, S.; HOLLAND, P. R.; GOADSBY, P. J. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 12, n. 10, p. 570-84, Set 20 2011.
- AL-QULITI, K. W. Update on neuropathic pain treatment for trigeminal neuralgia. The pharmacological and surgical options. *Neurosciences (Riyadh)*, v. 20, n. 2, p. 107-14, Abr 2015.
- AMBROSIO, A. F. SOARES DA SILVA, P.; CARVALHO, C. M.; CARVALHO, A. P. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochemical Research*, v. 27, n. 1-2, p. 121-30, Fev 2002.
- ANDERSON, L. C.; VAKOULA, A.; VEINOTE, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Archives of Oral Biology*, v. 48, n. 2, p. 161-9, Fev 2003.
- ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPAA, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S. *et al.* EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *European Journal of Neurology*, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, Set 2010.
- BACKONJA, M. M.; STACEY, B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *Journal of Pain*, v. 5, n. 9, p. 491-7, Nov 2004.
- BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *Journal of Comparative Neurology*, v. 405, n. 3, p. 359-79, Mar 15 1999.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, v. 38, n. 8, p. 1083-152, Ago 1999.
- BEDERSON, J. B.; FIELDS, H. L.; BARBARO, N. M. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. *Somatosensory & Motor Research*, v. 7, n. 2, p. 185-203, 1990.
- BEE, L. A.; DICKENSON, A. H. Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. *Pain*, v. 140, n. 1, p. 209-23, Nov 15 2008.
- BEHBEHANI, M. M.; FIELDS, H. L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Research*, v. 170, n. 1, p. 85-93, Jul 06 1979.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology*, v. 71, n. 3, p. 217-21, Jul 15 2008.

BENOLIEL, R.; ELIAV, E. Neuropathic orofacial pain. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 20, n. 2, p. 237-54, vii, Mai 2008.

BERGOUIGNAN, M. Anti-epileptic drugs in the treatment of essential trigeminal neuralgia. *Presse Medicale*, v. 78, n. 42, p. 1832-4, Out 10 1970.

BINGEL, U.; SCHOELL, E.; BUCHEL, C. Imaging pain modulation in health and disease. *Current Opinion in Neurology*, v. 20, n. 4, p. 424-31, Ago 2007.

BINGEL, U.; TRACEY, I. Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology (Bethesda)*, v. 23, p. 371-80, Dez 2008.

BURGESS, S. E.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H.; MALAN JR, T. P., VANDERAH, T. W.; LAI, J. *et al.* Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 12, p. 5129-36, Jun 15 2002.

CABRERA, M. A.; DIP, R. M.; FURLAN, M. O.; RODRIGUES, S. L. Use of drugs that act on the cytochrome P450 system in the elderly. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 64, n. 4, p. 273-8, 2009.

CAMPBELL, F. G.; GRAHAM, J. G.; ZILKHA, K. J. Clinical trial of carbamazepine (tegretol) in trigeminal neuralgia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 29, n. 3, p. 265-7, Jun 1966.

CHESHIRE, W. P. Trigeminal neuralgia: for one nerve a multitude of treatments. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 7, n. 11, p. 1565-79, Nov 2007.

CHICHORRO, J. Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A.; FRANCO, C. R.; RAE, G. A. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides*, v. 43, n. 2, p. 133-42, Abr 2009.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Experimental Biology and Medicin (Maywood)*, v. 231, n. 6, p. 1136-40, Jun 2006 [a].

CHICHORRO, J. G. ; ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; RAE, G. A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain*, v. 123, n. 1-2, p. 64-74, Jul 2006 [b].

CHIOCA, L. R.; RAUPP, I. M.; DA CUNHA, C.; LOSSO, E. M.; ANDREATINI, R. Subchronic fluoride intake induces impairment in habituation and active avoidance tasks in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 579, n. 1-3, p. 196-201, Jan 28 2008.

CHRISTENSEN, D.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. *et al.* Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain*, v. 83, n. 3, p. 433-40, Dez 1999.

COELHO, S. C.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; FRAGA, D.; CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R. Etanercept reduces thermal and mechanical orofacial hyperalgesia following inflammation and neuropathic injury. *European Journal of Pain*, v. 18, n. 7, p. 957-67, Ago 2014.

CRUCCU, G.; FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S.; SCHOLZ, J.; SINDOU, M.; SVENSSON, P. *et al.* Trigeminal neuralgia: New classification and diagnostic grading for practice and research. *Neurology*, v. 87, n. 2, p. 220-8, Jul 12 2016.

CRUCCU, G.; GRONSETH, G.; ALKSNE, J.; ARGOFF, C.; BRAININ, M.; BURCHIEL, K. *et al.* AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *European Journal of Neurology*, v. 15, n. 10, p. 1013-28, Out 2008.

CRUZ, L. S.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Intraganglionic resiniferatoxin prevents orofacial inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Behavioural Pharmacology*, v. 25, n. 2, p. 112-8, Abr 2014.

DAVIES, A. J.; KIM, Y. H.; OH, S. B. Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. *The Open Pain Journal*, v. 3, p. 11-28, 2010.

DE FELICE, M.; EYDE, N.; DODICK, D.; DUSSOR, G. O.; OSSIPOV, M. H.; FIELDS, H. L. *et al.* Capturing the aversive state of cephalic pain preclinically. *Annals of Neurology*, v. 74, n. 2, p. 257-65, Ago 2013.

DE FELICE, M.; OSSIPOV, M. H. Cortical and subcortical modulation of pain. *Pain Management*, v. 6, n. 2, p. 111-20, Abr 2016.

DE FELICE, M.; SANOJA, R.; WANG, R.; VERA-PORTOCARRERO, L.; OYARZO, J.; KING, T. *et al.* Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain. *Pain*, v. 152, n. 12, p. 2701-9, Dez 2011.

DE TOLEDO, I. P.; CONTI REUS, J.; FERNANDES, M.; PORPORATTI, A. L.; PERES, M. A.; TAKASCHIMA, A. *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. *Journal of the American Dental Association*, v. 147, n. 7, p. 570-576 e2, Jul 2016.

DESOUZA, D. D.; MOAYEDI, M.; CHEN, D. Q.; DAVIS, K. D.; HODAIE, M. Sensorimotor and Pain Modulation Brain Abnormalities in Trigeminal Neuralgia: A Paroxysmal, Sensory-Triggered Neuropathic Pain. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e66340, 2013.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annual Review of Neuroscience*, v. 6, p. 381-418, 1983.

EBOLI, P.; STONE, J. L.; AYDIN, S.; SLAVIN, K. V. Historical characterization of trigeminal neuralgia. *Neurosurgery*, v. 64, n. 6, p. 1183-6; discussion 1186-7, Jun 2009.

EDELMAYER, R. M.; VANDERAH, T. W.; MAJUTA, L.; ZHANG, E. T.; FIORAVANTI, B.; DE FELICE, M. *et al.* Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Annals of Neurology*, v. 65, n. 2, p. 184-93, Fev 2009.

EDLICH, R. F.; WINTERS, K. L.; BRITT, L.; LONG, W. B. Trigeminal neuralgia. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, v. 16, n. 2, p. 185-92, 2006.

EIDE, P. K.; RABBEN, T. Trigeminal neuropathic pain: pathophysiological mechanisms examined by quantitative assessment of abnormal pain and sensory perception. *Neurosurgery*, v. 43, n. 5, p. 1103-10, Nov 1998.

ELLRICH, J.; ULUCAN, C.; SCHNELL, C. Are 'neutral cells' in the rostral ventro-medial medulla subtypes of on- and off-cells? *Neuroscience Research*, v. 38, n. 4, p. 419-23, Dez 2000.

FDA, U. S. F. A. D. A. Public Meeting on Patient-Focused Drug Development for Neuropathic Pain Associated with Peripheral Neuropathy. 2016. Disponível em: < www.fda.gov >. Acesso em: 10/14/2016.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 5, n. 7, p. 565-75, Jul 2004.

FIELDS, H. L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Progress in Brain Research*, v. 122, p. 245-53, 2000.

FIELDS, H. L. *et al.* The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *Journal of Neuroscience*, v. 3, n. 12, p. 2545-52, Dez 1983.

FIELDS, H. L.; HEINRICHER, M. M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annual Review of Neuroscience*, v. 14, p. 219-45, 1991.

FOO, H.; MASON, P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Medicine Reviews*, v. 7, n. 2, p. 145-54, Abr 2003.

FORSSELL, H.; TENOVUO, O.; SILVONIEMI, P.; JAASKELAINEN, S. K. Differences and similarities between atypical facial pain and trigeminal neuropathic pain. *Neurology*, v. 69, n. 14, p. 1451-9, Out 2 2007.

FRIED, K.; BONGENHIELM, U.; BOISSONADE, F. M.; ROBINSON, P. P. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist*, v. 7, n. 2, p. 155-65, Abr 2001.

GRONSETH, G.; CRUCCU, G.; ALKSNE, J.; ARGOFF, C.; BRAININ, M.; BURCHIEL, K. *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 Federation of Neurological Societies. *Neurology*, v. 71, n. 15, p. 1183-90, Out 7 2008.

HAVELIN, J. IMBERT, I.; CORMIER, J.; ALLEN, J.; PORRECA, F.; KING, T. Central Sensitization and Neuropathic Features of Ongoing Pain in a Rat Model of Advanced Osteoarthritis. *Journal of Pain*, v. 17, n. 3, p. 374-82, Mar 2016.

HAYASHIDA, K.; CLAYTON, B. A.; JOHNSON, J. E.; EISENACH, J. C. Brain derived nerve growth factor induces spinal noradrenergic fiber sprouting and enhances clonidine analgesia following nerve injury in rats. *Pain*, v. 136, n. 3, p. 348-55, Jun 2008.

HEADACHE CLASSIFICATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL HEADACHE, S. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia*, v. 33, n. 9, p. 629-808, Jul 2013.

HEINRICHER, M. M.; BARBARO, N. M.; FIELDS, H. L. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosensory & Motor Research*, v. 6, n. 4, p. 427-39, 1989.

HEINRICHER, M. M.; NEUBERT, M. J. Neural basis for the hyperalgesic action of cholecystokinin in the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neurophysiology*, v. 92, n. 4, p. 1982-9, Out 2004.

HEINRICHER, M. M.; TORTORICI, V. Interference with GABA transmission in the rostral ventromedial medulla: disinhibition of off-cells as a central mechanism in nociceptive modulation. *Neuroscience*, v. 63, n. 2, p. 533-46, Nov 1994.

HITCHON, P. W.; HOLLAND, M.; NOELLER, J.; SMITH, M. C.; MORITANI, T.; JERATH, N. *et al.* Options in treating trigeminal neuralgia: Experience with 195 patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 149, p. 166-70, Out 2016.

HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J. E.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science*, v. 197, n. 4299, p. 183-6, Jul 08 1977.

HOWORTH, P. W.; THORNTON, S. R.; O'BRIEN, V.; SMITH, W. D.; NIKIFOROVA, N.; TESCHEMACHER, A. *et al.* Retrograde viral vector-mediated inhibition of pontospinal noradrenergic neurons causes hyperalgesia in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 41, p. 12855-64, Out 14 2009.

IASP. Global year against orofacial pain. 2013. Disponível em: < http://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/GlobalYearAgainstPain2/20132014OrofacialPain/FactSheets/Trigeminal_Neuralgia.pdf >.

ICHIDA, M. C.; ALVARENGA DA SILVA, L.; TEIXEIRA, M. J.; DE SIQUEIRA, J. T.; DE SIQUEIRA, S. R. Functional and sensory evaluation of patients with idiopathic trigeminal neuralgia: comparison with controls. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 130, p. 114-21, Mar 2015.

IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Experimental Brain Research*, v. 116, n. 1, p. 97-103, Ago 1997.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Set 13 2001.

KAMERMANS, M.; FAHRENFORT, I. Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 14, n. 5, p. 531-41, Out 2004.

KANAI, A.; SUZUKI, A.; KOBAYASHI, M.; HOKA, S. Intranasal lidocaine 8% spray for second-division trigeminal neuralgia. *British Journal of Anaesthesia*, v. 97, n. 4, p. 559-63, Out 2006.

KAPLAN, H.; FIELDS, H. L. Hyperalgesia during acute opioid abstinence: evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 1433-9, Mai 1991.

KATO, G.; YASAKA, T.; KATAFUCHI, T.; FURUE, H.; MIZUNO, M.; IWAMOTO, Y. *et al.* Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 6, p. 1787-94, Fev 08 2006.

KILLIAN, J. M.; FROMM, G. H. Carbamazepine in the treatment of neuralgia. Use of side effects. *Archives of Neurology*, v. 19, n. 2, p. 129-36, Ago 1968.

KING, T.; QU, C.; OKUN, A.; MERCADO, R.; REN, J.; BRION, T. *et al.* Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity. *Pain*, v. 152, n. 9, p. 1997-2005, Set 2011.

KING, T.; VERA-PORTOCARRERO, L.; GUTIERREZ, T.; VANDERAH, T. W.; DUSSOR, G.; LAI, J. *et al.* Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, v. 12, n. 11, p. 1364-6, Nov 2009.

KOOPMAN, J. S.; DIELEMAN, J. P.; HUYGEN, F. J.; DE MOS, M.; MARTIN, C. G.; STURKENBOOM, M. C. Incidence of facial pain in the general population. *Pain*, v. 147, n. 1-3, p. 122-7, Dez 15 2009.

KOVELOWSKI, C. J.; OSSIPOV, M. H.; SUN, H.; LAI, J.; MALAN, T. P.; PORRECA, F. Supraspinal cholecystinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain*, v. 87, n. 3, p. 265-73, Set 2000.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. *Pain Practice*, v. 14, n. 7, p. 656-67, Set 2014.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *Journal of Pain*, v. 10, n. 9, p. 895-926, Set 2009.

LAZAROV, N. E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Progress in Neurobiology*, v. 66, n. 1, p. 19-59, Jan 2002.

LECHIN, F.; VAN DER DIJS, B.; LECHIN, M. E.; AMAT, J.; LECHIN, A. E.; CABRERA, A. *et al.* Pimozide therapy for trigeminal neuralgia. *Archives of Neurology*, v. 46, n. 9, p. 960-3, Set 1989.

LEOCÁDIO, J. C. M.; SANTOS, L. C., SOUSA, M. C. A.; GONÇALVES, N. J. C.; CAMPOS, I. C. Neuralgia do Trigêmeo – Uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR*, v. 7, n. 2, p. 5, 2014.

LINDSTROM, P.; LINDBLOM, U. The analgesic effect of tocinide in trigeminal neuralgia. *Pain*, v. 28, n. 1, p. 45-50, Jan 1987.

LUIZ, A. P.; SCHROEDER, S. D.; CHICHORRO, J. G.; CALIXTO, J. B.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides*, v. 44, n. 2, p. 87-92, Abr 2010.

MA, W.; EISENACH, J. C. Chronic constriction injury of sciatic nerve induces the up-regulation of descending inhibitory noradrenergic innervation to the lumbar dorsal horn of mice. *Brain Research*, v. 970, n. 1-2, p. 110-8, Abr 25 2003.

MAARBJERG, S.; GOZALOV, A.; OLESEN, J.; BENDTSEN, L. Trigeminal neuralgia--a prospective systematic study of clinical characteristics in 158 patients. *Headache*, v. 54, n. 10, p. 1574-82, Nov-Dez 2014.

MAIER, C.; BARON, R.; TOLLE, T. R.; BINDER, A.; BIRBAUMER, N.; BIRKLEIN, F. *et al.* Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain*, v. 150, n. 3, p. 439-50, Set 2010.

MAINERO, C.; BOSHYAN, J.; HADJIKHANI, N. Altered functional magnetic resonance imaging resting-state connectivity in periaqueductal gray networks in migraine. *Annals of Neurology*, v. 70, n. 5, p. 838-45, Nov 2011.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 17, n. 12, p. 457-62, Dez 1996.

MAO, J.; CHEN, L. L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain*, v. 87, n. 1, p. 7-17, Jul 2000.

MARINKOVIC, S.; MARINKOVIC, S.; GIBO, H.; TODOROVIC, V.; ANTIC, B.; KOVACEVIC, D. *et al.* Ultrastructure and immunohistochemistry of the trigeminal peripheral myelinated axons in patients with neuralgia. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 111, n. 10, p. 795-800, Dez 2009.

MARINKOVIC, S.; TODOROVIC, V.; GIBO, H.; BUDEC, M.; DRNDAREVIC, N.; PESIC, D. *et al.* The trigeminal vasculature pathology in patients with neuralgia. *Headache*, v. 47, n. 9, p. 1334-9, Out 2007.

MASON, P. Deconstructing endogenous pain modulations. *Journal of Neurophysiology*, v. 94, n. 3, p. 1659-63, Set 2005.

MASON, P.; GAO, K.; GENZEN, J. R. Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects ongoing autonomic and respiratory activities. *Journal of Neurophysiology*, v. 98, n. 4, p. 1919-27, Out 2007.

MICHOT, B.; KAYSER, V.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. CGRP receptor blockade by MK-8825 alleviates allodynia in infraorbital nerve-ligated rats. *European Journal of Pain*, v. 19, n. 2, p. 281-90, Fev 2015.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v. 66, n. 6, p. 355-474, Abr 2002.

MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D. Theories of pain: from specificity to gate control. *Journal of Neurophysiology*, v. 109, n. 1, p. 5-12, Jan 2013.

MONACO, A.; CATTANEO, R.; MESIN, L.; ORTU, E.; GIANNONI, M.; PIETROPAOLI, D. Dysregulation of the descending pain system in temporomandibular disorders revealed by low-frequency sensory transcutaneous electrical nerve stimulation: a pupillometric study. *PLoS One*, v. 10, n. 4, p. e0122826, 2015.

MONTANO, N.; CONFORTI, G.; DI BONAVENTURA, R.; MEGLIO, M.; FERNANDEZ, E.; PAPACCI, F. Advances in diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 11, p. 289-99, 2015.

MOULTON, E. A.; BURSTEIN, R.; TULLY, S.; HARGREAVES, R.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Interictal dysfunction of a brainstem descending modulatory center in migraine patients. *PLoS One*, v. 3, n. 11, p. e3799, 2008.

OBERMANN, M. Treatment options in trigeminal neuralgia. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 3, n. 2, p. 107-15, Mar 2010.

OBERMANN, M.; HOLLE, D.; KATSARAVA, Z. Trigeminal neuralgia and persistent idiopathic facial pain. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 11, n. 11, p. 1619-29, Nov 2011.

OBERMANN, M.; YOON, M. S.; ESE, D.; MASCHKE, M.; KAUBE, H.; DIENER, H. C. *et al.* Impaired trigeminal nociceptive processing in patients with trigeminal neuralgia. *Neurology*, v. 69, n. 9, p. 835-41, Ago 28 2007.

OBERMANN, M.; YOON, M. S.; SENSEN, K.; MASCHKE, M.; DIENER, H. C.; KATSARAVA, Z. Efficacy of pregabalin in the treatment of trigeminal neuralgia. *Cephalalgia*, v. 28, n. 2, p. 174-81, Feb 2008.

OGLE, O. E.; MAHJoubi, G. Local anesthesia: agents, techniques, and complications. *Dent Clin North Am*, v. 56, n. 1, p. 133-48, ix, Jan 2012.

OKUN, A.; DEFELICE, M.; EYDE, N.; REN, J.; MERCADO, R.; KING, T. *et al.* Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive afferents. *Molecular Pain*, v. 7, p. 4, 2011.

OKUN, A.; LIU, P.; DAVIS, P.; REN, J.; REMENIUK, B.; BRION, T. *et al.* Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain*, v. 153, n. 4, p. 924-33, Abr 2012.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; MALAN JR, T. P.; PORRECA, F. *et al.* Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 909, p. 12-24, 2000.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, v. 8, n. 2, p. 143-51, Jun 2014.

OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. *NeuroRx*, v. 2, n. 4, p. 650-61, Out 2005.

PAXINOS G, W. C. The rat brain in stereotaxic coordinates. v. Ed 2, 1986.

PEARCE, J. Trigeminal neuralgia (Fothergill's disease) in the 17th and 18th centuries. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 74, p. 1, 2003 2003.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 71-80, Jan 2007.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, v. 80, n. 2, p. 53-83, Out 2006.

PIELSTICKER, A.; HAAG, G.; ZAUDIG, M.; LAUTENBACHER, S. Impairment of pain inhibition in chronic tension-type headache. *Pain*, v. 118, n. 1-2, p. 215-23, Nov 2005.

PORRECA, F.; BURGESS, S. E.; GARDELL, L. R.; VANDERAH, T. W.; MALAN JR, T. P.; OSSIPOV, M. H. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 14, p. 5281-8, Jul 15 2001.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in Neurosciences*, v. 25, n. 6, p. 319-25, Jun 2002.

POTREBIC, S. B.; FIELDS, H. L.; MASON, P. Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. *Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 3 Pt 2, p. 1655-65, Mar 1994.

QU, C.; KING, T.; OKUN, A.; LAI, J.; FIELDS, H. L.; PORRECA, F. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. *Pain*, v. 152, n. 7, p. 1641-8, Jul 2011.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, v. 100, n. 1-2, p. 1-6, Nov 2002.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, v. 164, n. 3878, p. 444-5, Abr 25 1969.

ROCCA, M. A.; CECCARELLI, A.; FALINI, A.; COLOMBO, B.; TORTORELLA, P.; BERNASCONI, L. *et al.* Brain gray matter changes in migraine patients with T2-visible lesions: a 3-T MRI study. *Stroke*, v. 37, n. 7, p. 1765-70, Jul 2006.

ROCKLIFF, B. W.; DAVIS, E. H. Controlled sequential trials of carbamazepine in trigeminal neuralgia. *Archives of Neurology*, v. 15, n. 2, p. 129-36, Ago 1966.

SANDRINI, G.; ROSSI, P.; MILANOV, I.; SERRAO, M.; CECCHINI, A. P.; NAPPI, G. Abnormal modulatory influence of diffuse noxious inhibitory controls in migraine and chronic tension-type headache patients. *Cephalalgia*, v. 26, n. 7, p. 782-9, Jul 2006.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anestesiologica*, v. 71, n. 4, p. 117-36, Abr 2005.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 33, n. 4, p. 243-61, Abr 2006.

SIQUEIRA, S. R.; ALVES, B.; MALPARTIDA, H. M.; TEIXEIRA, M. J.; SIQUEIRA, J. T. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. *Neuroscience*, v. 164, n. 2, p. 573-7, Dez 1 2009.

SUGIYO, S.; TAKEMURA, M.; DUBNER, R.; REN, K. Trigeminal transition zone/rostral ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats. *Journal of Comparative Neurology*, v. 493, n. 4, p. 510-23, Dez 26 2005.

THALAKOTI, S.; PATIL, V. V.; DAMODARAM, S.; VAUSE, C. V.; LANGFORD, L. E.; FREEMAN, S. E. *et al.* Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. *Headache*, v. 47, n. 7, p. 1008-23; discussion 24-5, Jul-Ago 2007.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, v. 55, n. 3, p. 377-91, Ago 2 2007.

URANO, H.; ARA, T.; FUJINAMI, Y.; HIRAOKA, B. Y. Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain. *International Journal of Medical Sciences*, v. 9, n. 8, p. 690-7, 2012.

VAN KLEEF, M.; VAN GENDEREN, W. E.; NAROUZE, S.; NURMIKKO, T. J.; VAN ZUNDERT, J.; GEURTS, J. W. *et al.* 1. Trigeminal neuralgia. *Pain Practice*, v. 9, n. 4, p. 252-9, Jul-Ago 2009.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research Reviews*, v. 46, n. 3, p. 295-309, Nov 2004.

VOS, B.; MACIEWICZ, R. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: BESSON JM, G. G. (Ed.). *Lesion of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain*. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.147-158.

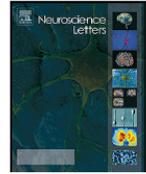
- VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neuroscience*, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2708-23, Mai 1994.
- WAITE, P. M. E.; ASHWELL, K. W. S. *The Human Nervous System*. Second Ed. Sydney, Australia: Elsevier, 2004. 32.
- WANG, R.; KING, T.; DE FELICE, M.; GUO, W.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Descending facilitation maintains long-term spontaneous neuropathic pain. *Journal of Pain*, v. 14, n. 8, p. 845-53, Ago 2013.
- WOLFE, J. W.; BUTTERWORTH, J. F. Local anesthetic systemic toxicity: update on mechanisms and treatment. *Curr Opin Anaesthesiol*, v. 24, n. 5, p. 561-6, Out 2011.
- YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 101, n. 2, p. 107-17, Jun 2006.
- YOUNIS, S.; MAARBJERG, S.; REIMER, M.; WOLFRAM, F.; OLESEN, J.; BARON, R. *et al.* Quantitative sensory testing in classical trigeminal neuralgia - a blinded study in patients with and without concomitant persistent pain. *Pain*, Fev 17 2016.
- ZAKRZEWSKA, J. M. Differential diagnosis of facial pain and guidelines for management. *British Journal of Anaesthesia*, v. 111, n. 1, p. 95-104, Jul 2013.
- ZAKRZEWSKA, J. M.; LINSKEY, M. E. Trigeminal neuralgia. *British Medical Journal*, v. 348, p. g474, Fev 17 2014.
- ZHANG, E. T.; OSSIPOV, M. H.; ZHANG, D. Q.; LAI, J.; PORRECA, F. Nerve injury-induced tactile allodynia is present in the absence of FOS labeling in retrogradely labeled post-synaptic dorsal column neurons. *Pain*, v. 129, n. 1-2, p. 143-54, Mai 2007.
- ZHANG, W.; GARDELL, S.; ZHANG, D.; XIE, J. Y.; AGNES, R. S.; BADGHISI, H. *et al.* Neuropathic pain is maintained by brainstem neurons co-expressing opioid and cholecystokinin receptors. *Brain*, v. 132, n. Pt 3, p. 778-87, Mar 2009.
- ZIEGLER, E. A.; MAGERL, W.; MEYER, R. A.; TREEDE, R. D. Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli. Central sensitization to A-fibre nociceptor input. *Brain*, v. 122 (Pt 12), p. 2245-57, Dez 1999.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.

ANEXO



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Research article

Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain

C.F.M. Nones^a, R.F. Claudino^a, L.E.N. Ferreira^a, R.C. Dos Reis^a, T. King^b, J.G. Chichorro^{a,*}^a Department of Pharmacology, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil^b Department of Biomedical Science, University of New England, Biddeford, ME, USA

HIGHLIGHTS

- Constriction of the trigeminal nerve induces early heat and late tactile facial hypersensitivity.
- CCI-ION induced spontaneous pain emerges between 5 and 15 days post injury.
- Descending pain facilitatory pain pathways mediate evoked and spontaneous pain 15 but not 5 days post-CCI-ION.
- Targeting RVM facilitatory pathways may improve treatment of chronic trigeminal neuropathic pain.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2016

Received in revised form 1 February 2017

Accepted 18 February 2017

Keywords:

Trigeminal neuropathic pain

RVM

Spontaneous pain

Hypersensitivity

ABSTRACT

The Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve (CCI-ION) is a well-established model to study facial sensory changes related to trigeminal neuropathic pain. CCI-ION induces heat hypersensitivity that resolves within 2–3 weeks and a delayed mechanical hypersensitivity that emerges during the second week post-injury. The role of descending facilitatory pain pathways from the rostro ventromedial medulla (RVM) in mediating the heat and tactile hypersensitivity was examined. CCI-ION induced heat hypersensitivity observed 5 days post-surgery was reversed by systemic, but not RVM lidocaine. CCI-ION-induced tactile hypersensitivity observed 15 days post-surgery was reversed by systemic lidocaine and attenuated by RVM lidocaine. CCI-ION-induced spontaneous pain was determined using conditioned place preference (CPP) to pain relief at each time-point. At day 5 post-CCI-ION, neither systemic nor RVM lidocaine induced CPP. However, at 15 days post-CCI-ION, CPP was observed to the chamber paired with RVM lidocaine, but not systemic lidocaine. These data indicate that CCI-ION induced heat hypersensitivity is not dependent on descending facilitatory pain pathways 5-days post-injury whereas descending facilitatory pain pathways mediate tactile allodynia and spontaneous pain 15 days post-CCI-ION. This suggests that CCI-ION induces early peripheral sensitization followed by development of central sensitization that mediates spontaneous pain and contributes to mechanical hypersensitivity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trigeminal neuralgia (TN) is a form of neuropathic pain characterized by severe lancinating pain in orofacial regions innervated by the trigeminal nerve. It is thought that most cases of TN result from compression of a trigeminal nerve root by the superior cerebellar artery in the posterior cranial fossa [1–3]. A significant proportion of TN patients report spontaneous pain in addition to the pain attacks [4,5]. Treatment options currently available for TN fail to provide reliable and permanent pain relief in all patients. Studies that con-

tribute to a better understanding of mechanisms underlying TN pain are warranted to improve therapeutic strategies for treatment of these patients with persistent facial pain.

CCI-ION has been developed and characterized as an experimental model that reproduces important aspects of TN. CCI-ION induces mechanical and thermal hypersensitivity that occur across different time courses [6–8]. Heat hyperalgesia emerges within 2 days post-injury and dissipates between 2 and 3 weeks post injury [6,9]. In contrast, tactile hypersensitivity does not emerge until approximately 12–15 days post-surgery [6,9]. The observation that mechanical and thermal hypersensitivity emerge at different times post-CCI-ION suggests that different mechanisms mediate the early and late facial sensory changes after CCI-ION.

* Corresponding author.

E-mail address: juliana.chichorro@ufpr.br (J.G. Chichorro).

Multiple laboratories have proposed an imbalance of inhibitory and facilitatory input during chronic pain states with a net gain in descending pain facilitation [10–13]. The rostral ventromedial medulla (RVM) is a critical site for descending modulation of nociceptive transmission [14] and has been implicated both in inhibition and facilitation of pain [15]. Preclinical models using spinal nerve injury indicate that the role of the RVM in pain modulation seems to change following nerve injury [12]. Spinal nerve injury induced evoked hypersensitivity has an initiation stage across approximately the first week during which evoked hypersensitivity is independent of descending facilitatory pathways from the RVM [12]. This is followed by a maintenance stage emerging during the second week during which evoked hypersensitivity is dependent on descending facilitation [12]. Subsequent studies demonstrated that descending facilitatory pain pathways from the RVM also mediate nerve-injury induced spontaneous pain [16,17]. The role of descending projections from the RVM to maintain different aspects of trigeminal neuropathic pain has not been explored. The present study examined the hypothesis that RVM neurons mediate tactile hypersensitivity and spontaneous pain 15 days post-CCI-ION, but do not alter thermal hypersensitivity or spontaneous pain 5 days post-CCI-ION.

2. Material and methods

2.1. Animals

Conventional heterogenic adult male Wistar rats, an outbred rat strain, weighing 200–220 g were used. Animals were bred and housed by the animal care facility of UFPR. Rats were housed 5 per cage on wood shaver bedding, maintained in a climate-controlled room at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12-h light/dark cycle with laboratory chow and tap water *ad libitum*. Studies were performed during the light cycle between 7:00 a.m. and 7:00 p.m. All procedures were approved by UFPR's institutional Committee on the Ethical Use of Animals (authorization # 805) and performed in accordance with the recommendations of the International Association for Study of Pain [18] and Brazilian regulations on animal welfare. All efforts were made to improve welfare and minimize the number of animals used.

2.2. RVM cannulation

Bilateral cannulation of the RVM was performed as previously described [12]. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine (90/10 mg/kg, respectively) and placed in a stereotaxic apparatus. The skull was exposed and two 26-gauge guide cannulas separated by 1.2 mm (Plastics One Inc, Roanoke, VA) were directed toward the lateral portions of the RVM (AP-11.0 mm from bregma, L ± 0.6 mm, DV-8.5 mm from the base of skull). The guide cannulas were cemented in place and fixed by small stainless steel screws. Rats then received oxytetracyclin (480 mg/kg, i.m.) and were allowed to recover 7 days before any behavioral testing or surgery.

2.3. Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve – CCI-ION

One week after RVM cannulation, animals were subjected to CCI-ION or sham surgery with some modifications [19] of the method proposed by Vos et al. [8]. Rats were anesthetized with ketamine/xylazine (90/10 mg/kg, respectively). An incision was made in the skin of the snout, under the right eye, about 3 mm caudal to the mystacial pads to expose the rostral end of the infraorbital nerve as it emerged from the infraorbital fissure. Two silk 4-0 ligatures were tied loosely around the infraorbital nerve 2 mm apart.

The wound was closed with silk sutures. Sham operated rats were treated identically, but no ligatures were applied to the infraorbital nerve. After surgery, all rats were maintained in a warm room until they recovered from anesthesia. Independent groups of CCI-ION or sham rats were used for each behavioral test.

2.4. Evaluation of heat hypersensitivity

Heat sensory thresholds on the ipsilateral side of the face were measured before and 5 days post-surgery as previously described by Almeida et al. [20], with some modifications [21]. Each animal was removed from its home cage and gently held by the experimenter. A radiant heat source maintained at 50°C was positioned 1 cm from the surface of the right vibrissal pad. The latency to display either head withdrawal or vigorous flicking of the snout was recorded. A 20 s cut-off time was used to prevent tissue damage. To examine the effects of systemic administration of lidocaine, rats received lidocaine (10 mg/kg, s.c.) or equivolume saline by a subcutaneous injection into the loose skin over the neck. Response latencies were assessed 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min post-injection. To evaluate effects of RVM lidocaine injections, separate groups of rats received lidocaine (4% w/v in $0.5 \mu\text{l}$) or equivolume saline injections across 1 min through a 33-gauge injection cannula protruding an additional 1 mm into fresh brain tissue to prevent backflow of drug. Response latencies were assessed 30, 60, 90 and 120 min post-injection. Only the ipsilateral side of the face was tested in to avoid overstimulation of the animal during testing of the time-course of the lidocaine effects on heat hypersensitivity.

2.5. Evaluation of mechanical hypersensitivity

Facial mechanical hypersensitivity was assessed before and 15 days post-surgery. During each testing session, animals were habituated to individual cages ($30 \times 30 \times 30$ cm) for a minimum of 2 h as described [22]. Mechanical thresholds were measured using calibrated von Frey filaments ranging from 0.04 to 8 g. Each stimulation series began with the 0.4 g filament, applied 3 times near the center of the right vibrissal pad, and proceeded up to the filament that evoked one of the following nociceptive behaviors twice: brisk head withdrawal, escape or attack reactions or short-lasting facial grooming. Only rats that did not react to application of the 8 g filament at pre-surgery testing were used for subsequent testing. Systemic or intra RVM injections of lidocaine were performed in separate cohorts of rats as described above. Mechanical thresholds were assessed 30, 60, 90 and 120 min post-injection. Only the ipsilateral side of the face was tested in to avoid overstimulation of the animal during testing of the time-course of the lidocaine effects on mechanical hypersensitivity.

2.6. Conditioned place preference (CPP)

A single-trial conditioning procedure was performed as previously described [23]. CPP was performed either days 4–6 post-surgery or days 14–16 post-surgery. Separate groups of rats were used at each time-point.

On the first day (i.e. preconditioning), rats were placed in the neutral chamber with access to all chambers for 15 min. Time spent in each chamber was analyzed to verify absence of preconditioning chamber preference. For all CPP groups, animals were removed from the study if they spent more than 720 s or less than 180 s in a single chamber (about 8% of rats tested) as previously reported [23].

Single trial conditioning occurred the following day. To determine if systemic lidocaine produced CPP, chamber pairing occurring 30 min following saline or drug administration to coincide with peak anti-hypersensitivity effects of systemic lidocaine.

Rats first received systemic saline and were placed back into their homecages for 30 min. The rats were then confined to the appropriate pairing chamber for 30 min followed by return to their home cages for 4 h. Rats then received systemic lidocaine (10 mg/kg, s.c.) and were placed in their homecages for 30 min. They were then confined to the opposite pairing chamber for 30 min and returned to the housing facility overnight.

To determine if RVM lidocaine induced CPP, rats first received RVM microinjection of saline (0.5 μ l over 1 min) and were immediately placed in the appropriate pairing chamber for 30 min. Four hours later, rats received RVM microinjection of lidocaine (4%w/v in 5 μ l over 1 min) and were immediately placed in the opposite pairing chamber for 30 min.

In both protocols, all drug pairings occurred in the afternoon to prevent potential effects of drug administration during the morning session from interfering with the afternoon pairing as previously described [24,16,25].

On test day, 24 h later, rats were placed in the CPP box for 15 min and time spent in each chamber was analyzed. Difference scores were calculated by subtracting the post-conditioning time from the pre-conditioning time spent in the drug paired chamber. A positive score reflects increased post-conditioning time spent in the drug pair chamber compared to preconditioning time indicating CPP.

2.7. RVM injection verification

To verify RVM injections, 0.5 μ l toluidine blue ink was injected bilaterally into the RVM across 1 min. The brains were removed and post-fixed in a 10% formaldehyde solution followed by immersion in 20% sucrose solution for cryoprotection. Brains were cut serially at 40 μ m thick coronal sections and slices analyzed using an optic microscope to verify the correct position of the cannula. Only animals with correct cannula placements were included in the data analysis [26].

2.8. Statistical analysis

Lidocaine effects on thermal and mechanical hypersensitivity were analyzed using two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc analysis with the Newman Keuls post-hoc test. For CPP experiments, data were analyzed by 2-factor ANOVA (chambers vs treatment) followed by the Bonferroni test of post-conditioning compared to preconditioning time spent in the drug-paired chamber. Difference scores for the drug paired chamber were used to determine group differences between nerve injured and sham operated rats using paired *t*-tests. In all statistical analysis, *p* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Systemic lidocaine blocks evoked hypersensitivity but does not induce CPP

On day 5, CCI-ION reduced the latency to heat-evoked responses compared to sham-operated rats. Systemic lidocaine (10 mg/kg, s.c.) reversed CCI-ION-induced heat hypersensitivity, with peak effect observed 60 through 120 min after administration (Fig. 1a, **p* < 0.05 vs CCI-ION saline). On day 15 after CCI-ION, a significant reduction on the facial mechanical threshold was detected in about 50% of the rats, but the remaining did not develop tactile hypersensitivity (data not shown). Systemic lidocaine (10 mg/kg, s.c.) reversed the facial tactile hypersensitivity with peak effects observed 30–60 min post administration (Fig. 1b, **p* < 0.05 vs CCI-ION saline). On day 5, systemic lidocaine (10 mg/kg, s.c.) failed to induce CPP in CCI-ION- or sham-treated rats (Fig. 1c, *p* > 0.05 vs null hypothesis of 0). On day 15, systemic lidocaine (10 mg/kg, s.c.) failed to induce CPP in

CCI-ION- or sham-treated rats (Fig. 1d, *p* > 0.05 vs null hypothesis of 0). It is noteworthy that systemic treatment with lidocaine did not impair locomotion as assessed in the open field test (data not shown).

3.2. RVM lidocaine attenuates tactile hypersensitivity and induces CPP but does not block CCI-ION-induced heat hypersensitivity

On day 5, RVM lidocaine (4%, 0.5 μ l) did not alter CCI-ION induced heat hypersensitivity (Fig. 2a). On day 15, CCI-ION-induced tactile hypersensitivity was attenuated by the RVM lidocaine, with peak effect observed 30 and 60 min post-RVM injection (Fig. 2b, **p* < 0.05 vs CCI-ION saline). On day 5, RVM lidocaine failed to induce CPP in CCI-ION- or sham-treated rats (Fig. 2c, *p* > 0.05 vs null hypothesis of 0). Only data from animals with verified accurate injections were included (58/97 total rats, 59.8%), as represented in the map (Fig. 2c inset, closed circles indicate hits, open circles indicate misses). On day 15, rats with CCI-ION-induced facial tactile hypersensitivity demonstrated a significant increase in the time spent in the lidocaine-paired chamber (Fig. 2d, **p* < 0.05 vs sham). In contrast, RVM lidocaine injections failed to induce CPP in rats that failed to develop tactile hypersensitivity 15 days post-CCI-ION (Fig. 2d, *p* > 0.05 vs the null hypothesis of 0). Only data from animals with verified accurate injections were included (84/128 total rats, 65.6%), as represented in the map (Fig. 2d inset, closed circles indicate hits, open circles indicate misses). Analysis of data from the RVM misses demonstrated that OFF-site injection of lidocaine failed to reverse heat or tactile hypersensitivity and did not alter the time spent in the lidocaine paired chamber for any treatment group (data not shown).

4. Discussion

We demonstrate that CCI-ION induces spontaneous pain that is observed 15 days post-surgery as indicated by CPP to a chamber paired with RVM lidocaine administration. These observations indicate that spontaneous pain is mediated by descending facilitatory pain pathways from the RVM. We further demonstrate that RVM lidocaine fails to alter heat hypersensitivity or induce CPP 5 days post-surgery, indicating that descending facilitatory pathways do not mediate the injury-induced pain state at this time-point. Systemic lidocaine fully reversed thermal hypersensitivity 5 days and attenuated tactile hypersensitivity 15 days post-CCI-ION but failed to induce CPP at either time-point. These data suggest that CCI-ION-induced evoked and spontaneous pain observed 15 days post-CCI-ION are mediated by descending facilitatory pain pathways and that spontaneous pain may show a delayed development, emerging between 5 and 15 days post-injury.

Our observations of thermal hypersensitivity 5 days post-CCI-ION surgery are consistent with clinical observations [27,5] indicating that decreased mechanical pain hypersensitivity and heat pain threshold represent the most prominent QST abnormalities detected in TN patients. Other preclinical studies have demonstrated that CCI-ION-induced heat hypersensitivity is observed ipsilateral to the CCI-ION, emerges during the first week post-injury, and lasts approximately 2–3 weeks [6,7,9,21]. These observations indicate that CCI-ION heat hypersensitivity may reflect peripheral sensitization. Consistent with this, both RTX induced ablation of TRPV1 receptor expressing cells in the trigeminal ganglion and administration of a TRPV1 receptor antagonist block CCI-ION-induced heat hyperalgesia indicating that CCI-ION-induced heat hypersensitivity is dependent on afferent sensory input from TRPV1 expressing trigeminal neurons [28,29]. Altogether, these data indicate that heat hypersensitivity after CCI-ION is result of peripheral sensitization of TRPV-1 expressing fibers. We

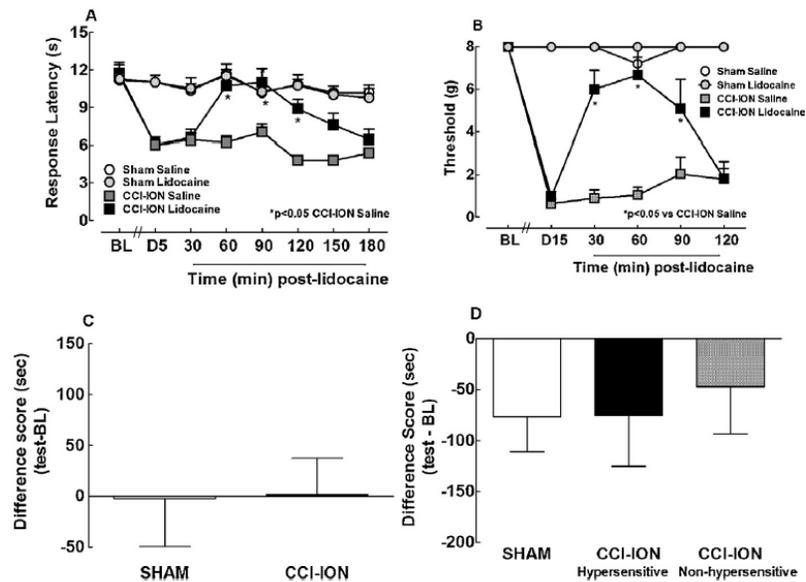


Fig. 1. Effect of systemic lidocaine on facial hypersensitivity and CPP test after CCI-ION surgery. **A.** Systemic lidocaine (10 mg/kg,s.c.) fully reversed heat hypersensitivity observed 5 days (D5) post-CCI-ION within 60 min post-administration. **B.** Systemic lidocaine fully reversed tactile hypersensitivity observed 15 days (D15) post-CCI-ION within 30 min post-injection. **C.** Systemic lidocaine does not induce CPP in CCI-ION-treated rats 5 days post-injury. **D.** Systemic lidocaine failed to induce CPP in the CCI-ION treated rats 15 days post-injury. In panels A and B "BL" represents the basal responsiveness before surgery; in C and D represents the pre-conditioning time in the lidocaine-paired chamber. $n = 6-14$. All graphs represent mean \pm SEM.

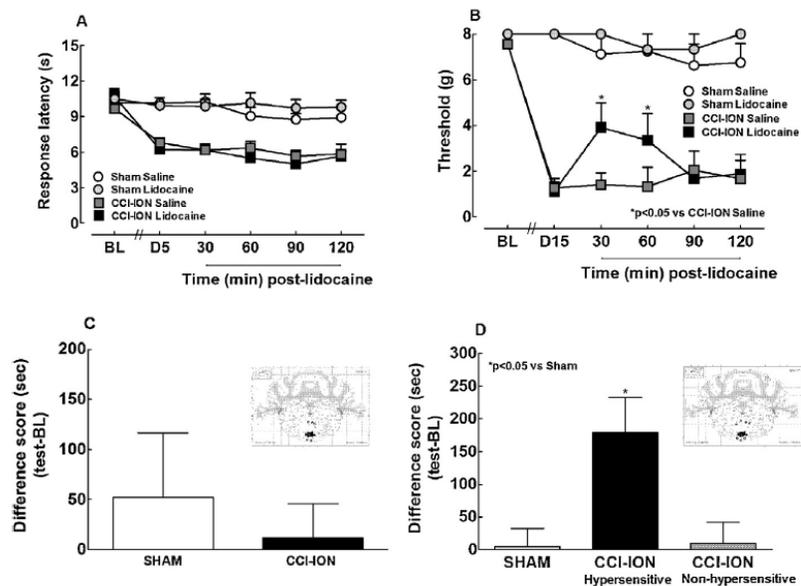


Fig. 2. Effect of RVM lidocaine on orofacial hypersensitivity and CPP test after CCI-ION surgery. **A.** RVM lidocaine (4% w/v, 0.5 μ l) failed to alter heat hypersensitivity in CCI-ION treated rats 5 days (D5) post-injury. **B.** RVM lidocaine attenuated tactile hypersensitivity observed 15 days (D15) post-CCI-ION within 30 min post-injection. **C.** RVM lidocaine does not induce CPP in CCI-ION treated rats 5 days post-injury. Map of accurate (solid circles) and missed (open circles) RVM injections overlaid on a map of the RVM from Paxinos and Watson (insert). **D.** RVM lidocaine induced CPP in CCI-ION treated rats that showed tactile hypersensitivity 15 days post-injury. CCI-ION rats that failed to show tactile hypersensitivity failed to demonstrate CPP. Map of accurate (solid circles) and missed (open circles) RVM injections overlaid on a map of the RVM from Paxinos and Watson (insert). In panels A and B "BL" represents the basal responsiveness before surgery; in C and D represents the pre-conditioning time in the lidocaine-paired chamber. $n = 6-17$. All graphs represent mean \pm SEM.

note that it is possible that lidocaine may be acting on other central targets as systemic administration of lidocaine has been proposed to work through actions at both the peripheral and central nervous system [30]. Future studies targeting peripheral input (e.g. RTX)

or using other peripherally restricted agents can be used to further strengthen this conclusion. The heat hypersensitivity reported following CCI-ION is consistent with clinical observations reporting heat hyperalgesia in patients with trigeminal neuropathic pain,

including TN [31,5], although not reported as frequently as mechanical hypersensitivity [27].

Several reports demonstrate that CCI-ION induces tactile hypersensitivity approximately 10–15 days post-injury [7,32,8] and affect both sides of the face [33,8], suggesting the development of central sensitization. Descending modulatory pain pathways have been indicated as important mediators of central sensitization across a variety of pain states including nerve injury, osteoarthritis, and cancer pain [10,11,23,16,34,15]. We determined whether blocking descending facilitatory pain pathways by lidocaine microinjection into the RVM blocks CCI-ION-induced tactile hypersensitivity. Lidocaine injected into the RVM 15 days post CCI-ION attenuated the tactile hypersensitivity. Clinically mechanical hypersensitivity represents one of the most frequent sensory alterations reported by TN patients and it is observed bilaterally in contrast to reports of unilateral spontaneous pain attacks [5]. Our data indicate that this aspect of TN may be a result of central sensitization and is mediated in part by descending facilitatory pain pathways from the RVM.

Persistent background pain is reported in a significant proportion of TN patients [4,5]. Therefore, we determined whether pain-relief by lidocaine administration induced CPP as previously reports indicate local or RVM lidocaine induces CPP in chronic pain states [23,35,16,25,26]. Systemic as well as RVM lidocaine failed to produce CPP during the early period of CCI-ION-induced thermal hypersensitivity (i.e. day 5). These results suggest that CCI-ION did not result in persistent ongoing pain at this specific time point. However, future studies examining ongoing pain at earlier time-points post-surgery are indicated. Preclinical studies indicate a robust increase in a subtype of facial grooming represented by medium ipsilateral stroking of the face, potentially reflecting spontaneous pain [8]. Notably, this grooming behavior is observed within 3 days of CCI-ION injury and decreased across the subsequent 2-week period [8]. This grooming reflects a recuperative behavior that diminishes across time due to adaptation to the chronic pain state. Indeed, others have proposed that suppression of nocifensive behaviors indicative of weakness in rodent models of chronic pain is due to the fact that mice and rats are animals of prey [36,13].

Our data demonstrate that injection of lidocaine into the RVM attenuates CCI-ION-induced tactile hypersensitivity and blocks ongoing pain observed 15 days post-surgery. These observations are consistent with other studies demonstrating that RVM lidocaine fails to block thermal or tactile hypersensitivity 3 days post-spinal nerve ligation (SNL), but was effective when administered 10 days [12] as well as at time-points at which SNL-induced heat hypersensitivity had resolved, such as 60 days post-injury [17]. These observations suggest that descending facilitatory pain pathways from the RVM are integral to maintenance of chronic neuropathic pain [11,12,24,37,14,16,15,17]. Specific to the trigeminal system, RVM inactivation attenuated CFA-induced masseter hyperalgesia and contralateral orofacial hyperalgesia induced by microinjection of interleukin-1 β into the interparietal/caudalis of rats [38,39]. More recently, it was demonstrated that bupivacaine injection into the RVM completely blocked dural inflammation-induced facial mechanical allodynia [40]. Together with our observations, these reports indicate that descending facilitatory pain pathways from the RVM maintain both hypersensitivity and spontaneous aspects of chronic trigeminal pain. Future studies are required to determine whether descending facilitatory pain pathways from the RVM maintain spontaneous pain earlier than 15 days post-injury at later time-points post CCI-ION as described in the SNL model of pain [17] to get a more complete understanding of the time-course in which descending facilitatory pain pathways mediate nerve-injury induced trigeminal pain.

In conclusion, the present observations indicate that early sensory changes after CCI-ION are unilateral and likely depend on peripheral trigeminal input. The later development of mechanical hypersensitivity and ongoing pain are maintained by descending facilitatory projections from the RVM. Further investigation into the role of central sensitization in the maintenance of ongoing pain in the setting of trigeminal nerve injury may allow detection of novel molecular targets for development of improved therapeutics for pain management in patients with trigeminal neuralgia.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This study was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, grant number 0839/2014), Brazil.

Author contribution

C.F.M. Nones and R.F. Claudino: acquisition, analysis and interpretation of data; drafting the article. L.E.N. Ferreira and R.C. Dos Reis: acquisition, analysis and interpretation of data. J.G. Chichorro and T. King: substantial contributions to conception and design and analysis and interpretation of data; critical revision of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

References

- [1] R. Benoliel, Y. Sharav, Chronic orofacial pain, *Curr. Pain Headache Rep.* 14 (2010) 33–40.
- [2] M. van Kleef, W.E. van Genderen, S. Narouze, T.J. Nurmikko, J. van Zundert, J.W. Geurts, N. Mekhail, *World Institute of Medicine*, 1. Trigeminal neuralgia, *Pain Pract.* 9 (2009) 252–259.
- [3] J.M. Zakrzewska, R. McMillan, Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain, *Postgrad. Med. J.* 87 (2011) 410–416.
- [4] M.C. Ichida, L. Alvarenga da Silva, M.J. Teixeira, J.T. de Siqueira, S.R. de Siqueira, Functional and sensory evaluation of patients with idiopathic trigeminal neuralgia: comparison with controls, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 130 (2015) 114–121.
- [5] S. Younis, S. Maarbjerg, M. Reimer, F. Wolfram, J. Olesen, R. Baron, L. Bendtsen, Quantitative sensory testing in classical trigeminal neuralgia—a blinded study in patients with and without concomitant persistent pain, *Pain* 157 (2016) 1407–1414.
- [6] J.G. Chichorro, A.R. Zampronio, D.A. Cabrini, C.R. Franco, G.A. Rae, Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats, *Neuropeptides* 43 (2009) 133–142.
- [7] S.C. Coelho, A.L. Bastos-Pereira, D. Fraga, J.G. Chichorro, A.R. Zampronio, Etanercept reduces thermal and mechanical orofacial hyperalgesia following inflammation and neuropathic injury, *Eur. J. Pain* 18 (2014) 957–967.
- [8] B.P. Vos, A.M. Strassman, R.J. Maciewicz, Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve, *J. Neurosci.* 14 (1994) 2708–2723.
- [9] Y. Imamura, H. Kawamoto, O. Nakanishi, Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats, *Exp. Brain Res.* 116 (1997) 97–103.
- [10] R. Baron, G. Hans, A.H. Dickenson, Peripheral input and its importance for central sensitization, *Ann. Neurol.* 74 (2013) 630–636.
- [11] L.A. Bee, A.H. Dickenson, Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin, *Pain* 140 (2008) 209–223.
- [12] S.E. Burgess, L.R. Gardell, M.H. Ossipov, T.P. Malan Jr., T.W. Vanderah, J. Lai, F. Porreca, Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain, *J. Neurosci.* 22 (2002) 5129–5136.
- [13] N. Percie du Sert, A.S. Rice, Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2951–2963.
- [14] M.M. Heinricher, N.M. Barbaro, H.L. Fields, Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and

- off-cells is related to nociceptive responsiveness, *Somatosens. Mot. Res.* 6 (1989) 427–439.
- [15] M.H. Ossipov, G.O. Dussor, F. Porreca, Central modulation of pain, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 3779–3787.
- [16] T. King, L. Vera-Portocarrero, T. Gutierrez, T.W. Vanderah, G. Dussor, J. Lai, H.L. Fields, F. Porreca, Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain, *Nat. Neurosci.* 12 (2009) 1364–1366.
- [17] R. Wang, T. King, M. De Felice, W. Guo, M.H. Ossipov, F. Porreca, Descending facilitation maintains long-term spontaneous neuropathic pain, *J. Pain* 14 (2013) 845–853.
- [18] M. Zimmermann, Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain* 16 (1983) 109–110.
- [19] J.G. Chichorro, A.R. Zampronio, G.E. Souza, G.A. Rae, Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Pain* 123 (2006) 64–74.
- [20] R.T. Almeida, I.D. Duarte, Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint, *Brain Res.* 1188 (2008) 54–60.
- [21] A.P. Luiz, S.D. Schroeder, J.G. Chichorro, J.B. Calixto, A.R. Zampronio, G.A. Rae, Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats, *Neuropeptides* 44 (2010) 87–92.
- [22] D. Christensen, M. Gautron, G. Guilbaud, V. Kayser, Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain, *Pain* 83 (1999) 433–440.
- [23] J. Havelin, I. Imbert, J. Cormier, J. Allen, F. Porreca, T. King, Central sensitization and neuropathic features of ongoing pain in a rat model of advanced osteoarthritis, *J. Pain* 17 (2016) 374–382.
- [24] M. De Felice, R. Sanoja, R. Wang, L. Vera-Portocarrero, J. Oyarzo, T. King, M.H. Ossipov, T.W. Vanderah, J. Lai, G.O. Dussor, H.L. Fields, T.J. Price, F. Porreca, Engagement of descending inhibition from the rostral ventromedial medulla protects against chronic neuropathic pain, *Pain* 152 (2011) 2701–2709.
- [25] A. Okun, P. Liu, P. Davis, J. Ren, B. Remeniuk, T. Brion, M.H. Ossipov, J. Xie, G.O. Dussor, T. King, F. Porreca, Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis, *Pain* 153 (2012) 924–933.
- [26] C. Qu, T. King, A. Okun, J. Lai, H.L. Fields, F. Porreca, Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy, *Pain* 152 (2011) 1641–1648.
- [27] C. Maier, R. Baron, T.R. Tolle, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, J. Gierthmühlen, H. Flor, C. Geber, V. Hüge, E.K. Krumova, G.B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, H. Richter, R. Rolke, A. Scherens, A. Schwarz, C. Sommer, V. Tronnier, N. Uceyler, M. Valet, G. Wasner, R.D. Treede, Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes, *Pain* 150 (2010) 439–450.
- [28] L.S. Cruz, C.M. Kopruszinski, J.G. Chichorro, Intraganglionic resiniferatoxin prevents orofacial inflammatory and neuropathic hyperalgesia, *Behav. Pharmacol.* 25 (2014) 112–118.
- [29] H. Urano, T. Ara, Y. Fujinami, B.Y. Hiraoka, Aberrant TRPV1 expression in heat hyperalgesia associated with trigeminal neuropathic pain, *Int. J. Med. Sci.* 9 (2012) 690–697.
- [30] J. Mao, L.L. Chen, Systemic lidocaine for neuropathic pain relief, *Pain* 87 (2000) 7–17.
- [31] P.K. Eide, T. Rabben, Trigeminal neuropathic pain: pathophysiological mechanisms examined by quantitative assessment of abnormal pain and sensory perception, *Neurosurgery* 43 (1998) 1103–1110.
- [32] B. Michot, V. Kayser, M. Hamon, S. Bourgoin, CGRP receptor blockade by MK-8825 alleviates allodynia in infraorbital nerve-ligated rats, *Eur. J. Pain* 19 (2015) 281–290.
- [33] V. Kayser, B. Auel, M. Hamon, S. Bourgoin, The antimigraine 5-HT_{1B/1D} receptor agonists sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain, *Br. J. Pharmacol.* 137 (2002) 1287–1297.
- [34] A. Latremoliere, C.J. Woolf, Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity, *J. Pain* 10 (2009) 895–926.
- [35] T. King, C. Qu, A. Okun, R. Mercado, J. Ren, T. Brion, J. Lai, F. Porreca, Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity, *Pain* 152 (2011) 1997–2005.
- [36] J.S. Mogil, Animal models of pain: progress and challenges, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 283–294.
- [37] L.R. Gardell, T.W. Vanderah, S.E. Gardell, R. Wang, M.H. Ossipov, J. Lai, F. Porreca, Enhanced evoked excitatory transmitter release in experimental neuropathy requires descending facilitation, *J. Neurosci.* 23 (2003) 8370–8379.
- [38] K. Shimizu, B. Chai, S.C. Lagraize, F. Wei, R. Dubner, K. Ren, Microinjection of IL-1 β into the trigeminal transition zone produces bilateral NMDA receptor-dependent orofacial hyperalgesia involving descending circuitry, *Open Pain J.* 2 (2009) 76–83.
- [39] S. Sugiyo, M. Takemura, R. Dubner, K. Ren, Trigeminal transition zone/rostral ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats, *J. Comp. Neurol.* 493 (2005) 510–523.
- [40] R.M. Edelmayer, T.W. Vanderah, L. Majuta, E.T. Zhang, B. Fioravanti, M. De Felice, J.G. Chichorro, M.H. Ossipov, T. King, J. Lai, S.H. Kori, A.C. Nelsen, K.E. Cannon, M.M. Heinricher, F. Porreca, Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain, *Ann. Neurol.* 65 (2009) 184–193.