

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CASSANHO TEODORO

PARTICIPAÇÃO DA SUBSTÂNCIA P E DOS RECEPTORES NK₁ EM
MODELOS DE DOR OROFACIAL INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA

CURITIBA
2012

FERNANDA CASSANHO TEODORO

PARTICIPAÇÃO DA SUBSTÂNCIA P E DOS RECEPTORES NK₁ EM
MODELOS DE DOR OROFACIAL INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre 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-orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio

CURITIBA
2012

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, além da conclusão. O artigo será submetido para revista científica da área.



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 76ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado**

2 Ao vigésimo nono dia do mês de junho do ano de dois mil e doze, às nove horas, no
3 Anfiteatro nº 05 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná,
4 reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-
5 graduanda em Farmacologia **FERNANDA CASSANHO TEODORO** intitulada:
6 “PARTICIPAÇÃO DA SUBSTÂNCIA P E DOS RECEPTORES NK₁ EM MODELOS
7 DE DOR OROFACIAL INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA”, sob orientação da Prof.^a
8 Dr.^a Juliana Geremias Chichorro e co-orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto
9 Zamprônio, e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro
10 (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia -
11 UFPR) e Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
12 trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
13 sendo em seguida arguida durante trinta minutos por cada um dos membros da Banca, e
14 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
15 Examinadora emitiu o seguinte parecer: Aprovada. De acordo com o
16 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi
17 aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
18 conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por
19 encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e
20 pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 29 de junho de 2012.

Prof.ª Dr.ª Juliana Geremias Chichorro (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.ª Dr.ª Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR)

Prof.ª Dr.ª Luana Fischer (Fisiologia – UFPR)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “PARTICIPAÇÃO DA SUBSTÂNCIA P E DOS RECEPTORES NK1 EM MODELOS DE DOR OROFACIAL INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA.”, de autoria da pós-graduanda **FERNANDA CASSANHO TEODORO**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR) e Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR) reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 29 de junho de 2012.

Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Luana Fischer (Fisiologia – UFPR)

Aos meus queridos pais e
ao pequenino guerreiro, João Carlos, que nos ensinou o quão é valiosa a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por ter proporcionado fé, coragem e força em todos os momentos dessa jornada.

Aos meus queridos pais José Aparecido e Maria Silvia, por terem transmitido tanto amor, carinho e estima.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro por ter oferecido essa chance valiosa e, sobretudo, pela paciência e dedicação com que transmitiu os ensinamentos.

À Shirley Boller, pela amizade, cumplicidade e, mais de que tudo, por ter aberto o caminho para essa oportunidade.

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório: Anne Schreiber, Carlos Henrique Alves Jesus, Carina Mattedi Nones, Caroline Machado Kopruszinski e Renata Cristiane dos Reis pelo apoio cedido tanto na jornada profissional quanto na pessoal.

Às professoras Dr^a. Joice Maria da Cunha e Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli pelos valiosos ensinamentos, pela ajuda e carinho.

Ao Prof. Dr. Giles A. Rae e Alessandra Martini Cadete que foram essenciais para a concretização do *Western blot*.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Aleksander R. Zamprônio, pela contribuição cedida a esse projeto.

Às professoras Fernanda de Paula Cerantolla e Rita de Cássia Domanski, pelo apoio e incentivo.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos de Chavantes-SP, pela amizade e o carinho cedido a mim e aos meus pais.

Ao meu companheiro Juliano Luiz, pelo apoio e paciência.

À banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha e Profa. Dr^a. Luana Fisher, pela participação e pelas críticas construtivas.

Aos professores do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação.

Aos colegas e funcionários do departamento de Farmacologia.

Ao Biotério da UFPR, que foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, pela oportunidade.

À Fundação Araucária e Capes pelo suporte financeiro.

“Todo ato de criação é, antes de tudo, um ato de destruição.”
(Pablo Picasso, 1881-1973)

RESUMO

Existem inúmeras evidências de que a substância P liberada de neurônios sensoriais periféricos participa da dor de origem inflamatória e neuropática. O objetivo desse estudo foi avaliar se a substância P, administrada no lábio superior de ratos, é capaz de evocar comportamentos nociceptivos, hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor) e mecânica na região orofacial, bem como investigar a participação dos receptores neurocinina do tipo 1 (NK₁) em modelos de dor orofacial inflamatória e neuropática. Em adição, avaliar possíveis alterações na expressão de receptores NK₁ no gânglio do trigêmeo de ratos, que receberam uma injeção do estímulo inflamatório carragenina no lábio superior ou que foram submetidos à constrição do nervo infraorbital, através da técnica de *Western blot*. A substância P, injetada no lábio superior de animais, nas doses de 1, 10 e 100 µg/50 µL, não foi capaz de evocar respostas nociceptivas, mesmo em ratos pré-tratados com captopril (5 mg/kg, i.p.). Por outro lado, quando administrada na dose de 0,1; 1 ou 10 µg/50 µL a substância P induziu hiperalgesia térmica, a qual foi significativa na 3^a e 4^a horas e reduzida pelo tratamento prévio com o antagonista não peptídico seletivo de receptores NK₁ SR140333B (na dose de 3 mg/Kg, i.p.). Entretanto, a substância P não induziu hiperalgesia ao frio ou hiperalgesia mecânica na região orofacial quando administrada no lábio superior nessa mesma dose (1 µg/50 µL). O tratamento sistêmico dos animais com SR140333B (3 mg/Kg) também reduziu a hiperalgesia ao calor induzida pela aplicação de carragenina (50 µg/50 µL) no lábio superior, mas não exerceu qualquer influência sobre a hiperalgesia ao frio induzida por esse agente inflamatório. Além disso, o bloqueio dos receptores NK₁ com SR140333B (3 mg/Kg) reduziu em cerca de 50% as respostas nociceptivas em ambas as fases do teste de formalina orofacial. Após constrição do nervo infraorbital, um modelo de dor neuropática orofacial, o tratamento dos animais com SR140333B (3 mg/Kg) aboliu a hiperalgesia ao calor, mas não modificou a hiperalgesia ao frio ou mecânica, avaliadas nos dias 4 e 16 pós-operatório, respectivamente. A análise do gânglio do trigêmeo por *Western blot* revelou aumento da expressão de receptores NK₁ somente no extrato citosólico das amostras coletadas de ratos que receberam uma injeção de carragenina no lábio superior ou que foram submetidos à constrição do nervo infraorbital. Os resultados desse estudo sugerem que a substância P liberada das terminações periféricas dos neurônios sensoriais trigeminais tem importante participação, através da ativação de receptores NK₁, na dor orofacial de origem inflamatória e neuropática.

Palavras chave: substância P, receptor NK₁, hiperalgesia, dor inflamatória, dor neuropática, nervo trigêmeo.

ABSTRACT

There is accumulating evidence that substance P released from peripheral sensory neurons participates in inflammatory and neuropathic pain. The aim of the present study was to assess whether substance P, administered into the rat's upper lip, is able to evoke orofacial nociceptive behavior, thermal heat and cold and mechanical hyperalgesia in the orofacial region, as well as to investigate the role of NK₁ receptors on models of orofacial inflammatory and neuropathic pain. In addition, to evaluate possible changes in the expression of NK₁ receptors in the trigeminal ganglia of rats, which received an injection of the inflammatory stimulus carrageenan into the upper lip or which were submitted to the constriction of the infraorbital nerve, by using the Western Blot method. Substance P, injected into the upper lip of animals, at 1, 10 and 100 µg/50 µL failed to induce significant nociceptive responses, even in rats pre-treated with captopril (5 mg/kg, i.p.). On the other hand, when administered at 0.1; 1 or 10 µg/50 µL, substance P was able to induce orofacial thermal hyperalgesia, which was significant from the third up to the fourth hour after its injection, and was significantly reduced by the pre-treatment of the animals with the non-peptidic and selective NK₁ receptor antagonist SR140333B (at 3 mg/Kg, i.p.). However, substance P did not induce heat or mechanical orofacial hyperalgesia when injected into the upper lip at the same dose (1 µg/50 µL). Systemic treatment of animals with SR140333B (3 mg/Kg) also resulted in a reduction of the heat hyperalgesia induced by carrageenan (50 µg/50 µL) injection into the upper lip, but did not influence the cold hyperalgesia induced by this inflammatory agent. Moreover, the blockade of NK₁ receptors with SR140333B (3 mg/Kg) reduced by about 50% both phases of the formalin response evaluated in the orofacial region. After constriction of the infraorbital nerve, a model of orofacial neuropathic pain, the treatment of animals with SR140333B (3 mg/Kg) abolished the heat hyperalgesia, but failed to modify the cold and mechanical hyperalgesia, assessed on post-operative days 4 and 16, respectively. The analysis of the trigeminal ganglia by Western blot revealed an increase in the expression of NK₁ receptors, only in the cytosolic extract, of the samples collected from rats which received an injection of carrageenan into the upper lip or which were submitted to the constriction of the infraorbital nerve. The results of the present study suggest that SP released from peripheral sensory neurons plays an important role, through activation of NK₁ receptors, on orofacial inflammatory and neuropathic pain.

Keywords: substance P, NK₁ receptor, hyperalgesia, inflammatory pain, neuropathic pain, trigeminal nerve.

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1 - INFLUENCE OF SUBSTANCE P ON OROFACIAL NOCICEPTIVE BEHAVIOR AND ON THERMAL AND MECHANICAL THRESHOLD IN RATS.....	50
FIGURE 2 - EFFECT OF A SELECTIVE NK ₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON SP-INDUCED HEAT HYPERALGESIA.....	52
FIGURE 3 - EFFECT OF THE NK ₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON FORMALIN-INDUCED NOCICEPTION	53
FIGURE 4 - EFFECT OF THE NK ₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON CARRAGEENAN-INDUCED THERMAL HYPERALGESIA.....	54
FIGURE 5 - EFFECT OF THE NK ₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON THE THERMAL AND MECHANICAL THRESHOLD OR RATS SUBMITTED TO INFRAORBITAL NERVE CONSTRICTION.....	56
FIGURE 6 - CHANGES ON NK ₁ RECEPTOR EXPRESSION IN THE CYTOSOL OF TRIGEMINAL GANGLIA CELLS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs- anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc – adenosina monofosfato cíclico
ATM – articulação temporomandibular
CAR - carragenina
CFA – adjuvante completo de Freund
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CION – constrição do nervo infraorbital
COX – enzima ciclooxigenase
DAG - diacilglicerol
DTM – disfunção temporomandibular
ECA – enzima conversora da angiotensina
GABA - ácido gama-aminobutírico
GPCR – receptor acoplado à proteína G
IL-1 β – interleucina-1 β
IP3 – trifosfato de inositol
NEP – endopeptidase neutra
NGF – fator de crescimento do nervo
NKA – neurocinina A
NKB – neurocinina B
NK₁ – neurocinina- 1
NK₂ – neurocinina- 2
NK₃ – neurocinina- 3
PKA – proteína quinase A
PKC – proteína quinase C
PLC- β – fosfolipase C- β
Pr5 – núcleo sensorial principal
SNC – sistema nervoso central
SP – substância P
Sp5 – núcleo do trato espinal
Sp5C – subnúcleo *caudalis* ou caudal
Sp5I – subnúcleo *interpolaris*

Sp5O – subnúcleo *oralis* ou oral

TNF α – fator de necrose tumoral α

TRPV1 – receptor de potencial transitório vanilóide 1

5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DOR OROFACIAL	17
1.1.1	Epidemiologia da dor orofacial	19
1.1.2	Sistema sensorial do trigêmeo	20
1.1.3	Tratamento farmacológico para as dores orofaciais	23
1.2	SUBSTÂNCIA P	26
1.2.1	Participação da substância P em diferentes modelos de inflamação e dor	31
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	ARTIGO CIENTÍFICO	36
	Abstract	37
1.	Introduction	38
2.	Experimental procedures	40
2.1	Animals	40
2.2	Cold stimulation	41
2.3	Heat stimulation	41
2.4	Mechanical stimulation	42
2.5	Formalin induced-response	42
2.6	Constriction of the infraorbital nerve	43
2.7	Blotting for detection of NK₁ receptors	43
2.8	Drugs	45
2.9	Experimental procedures	46
2.10	Statistical analysis	48
3.	Results	48
3.1	Evaluation of the ability of SP to induce orofacial nociceptive response, thermal and mechanical hyperalgesia	48
3.2	Influence of NK₁ receptors blockade on carrageenan-induced thermal hyperalgesia and formalin-evoked grooming behavior	52
3.3	Influence of NK₁ receptors blockade on thermal and	

	mechanical hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction.....	55
3.4	Changes in NK₁ receptors expression in the trigeminal ganglia after carrageenan injection or infraorbital nerve injury.....	57
4.	Discussion	59
	Highlights	65
	Acknowledgments	66
	References	67
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR OROFACIAL

O termo dor orofacial refere-se às dores faciais que surgem abaixo da linha orbito meatal, acima do pescoço e anteriormente ao pavilhão auditivo, enquanto que, as dores que acometem a cavidade oral têm origem nos dentes ou em tecidos moles (ZAKRZEWSKA, HAMLYN, 1999). Dentre as patologias que envolvem a região craniofacial, àquelas que culminam em dor incluem a neuralgia do trigêmeo, neoplasias ou processos de metástase, disfunções na articulação temporomandibular (ATM) ou em músculos mastigatórios, enxaqueca, bem como dores de origem idiopática, tais como a dor facial idiopática persistente, caracterizada por dor difusa e ausência de dano em estruturas nervosas (LeRESCHE, 1997).

As dores orofaciais normalmente são percebidas no local de origem da lesão, mas também podem estar relacionadas a lesões ou patologias que acometem estruturas torácicas, cranianas ou cervicais. Com relação à intensidade, assemelham-se às dores processadas pelos nervos espinhais, embora sejam distintos os mecanismos envolvidos na nocicepção espinal e orofacial (HARGREAVES, 2011). Quanto ao decurso temporal ou etiologia, as dores orofaciais podem ser classificadas em aguda, inflamatória e neuropática (LeRESCHE, 1997; EIDE, RABBEN, 1998). As dores consideradas agudas geralmente são transitórias e oriundas de lesões ou infecções, como por exemplo, as odontalgias que surgem após a exposição da dentina por meio de processos erosivos (MAGLOIRE *et al.*, 2010). As dores inflamatórias podem ser tanto agudas quanto crônicas. Exemplos de dores inflamatórias agudas são as pulpites, as quais são bem controladas com anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e remoção do agente causador (KEISER; HARGREAVES, 2002). No entanto, algumas formas de dor inflamatória apresentam certo grau de cronicidade e podem persistir por meses ou anos, e apresentam algumas características também observadas em dores neuropáticas, tais como alodinia e hiperalgesia (SESSLE, 2000). Segundo a IASP, a alodinia pode ser definida

como dor causada por um estímulo inócuo, enquanto que hiperalgesia é definida como uma resposta exacerbada a um estímulo que normalmente provoca dor (LOESER; TREEDE, 2008).

As disfunções temporomandibulares (DTM) caracterizam-se por dores provenientes de processos inflamatórios crônicos que afetam a região da ATM e os músculos mastigatórios (DWORKIN *et al.*, 1990; LeRESCHE, 1997), enquanto que dores neuropáticas, como por exemplo a neuralgia do trigêmeo, resultam da lesão de componentes neuronais e apresentam como características dor espontânea, hiperalgesia e alodinia (KRAFFT, 2008; BOTO, 2010).

A dor decorrente da neuralgia do trigêmeo é descrita como lancinante, paroxística, na forma de choque elétrico ou queimação e limitada à área inervada por um ou mais ramos do nervo trigêmeo. Os episódios de dor normalmente são desencadeados por estimulação de áreas específicas (*trigger points* ou zonas de gatilho), geralmente localizadas no território inervado pelo trigêmeo. Os estímulos desencadeadores dos ataques de dor incluem o leve toque da face, escovação dos dentes, ativação dos músculos mastigatórios e faciais, como por exemplo, durante a fala e a alimentação, entre outros. Cada episódio de dor é seguido por um período refratário que pode durar alguns segundos até vários minutos. Quando os episódios de dor tornam-se muito frequentes, os pacientes ficam incapacitados de realizar suas atividades diárias, e evitam até mesmo alimentar-se e comunicar-se temendo desencadear uma nova crise (para revisão ver TÜRP; GOBETTI, 1996; DELZELL; GRELE, 1999).

A classificação das dores orofaciais, bem como o conhecimento da sua etiologia, são fundamentais tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento corretos. Dores agudas, inclusive àquelas que apresentam um componente inflamatório, normalmente são bem controladas e apresentam etiologia bastante definida. Por outro lado, dores inflamatórias crônicas ou neuropáticas podem ter origem multifatorial ou muitas vezes etiologia desconhecida e seu controle farmacológico nem sempre é satisfatório, ou ainda pode resultar em inúmeros efeitos adversos para os pacientes.

1.1.1 Epidemiologia da dor orofacial

Sabe-se que dores orofaciais representam uma das condições dolorosas mais comuns que um indivíduo na fase adulta pode sofrer, sendo que somente nos Estados Unidos cerca de 20% da população adulta apresenta alguma forma de dor orofacial (LIPTON *et al.*, 1993). Em um estudo realizado na cidade de Toronto, no Canadá, demonstrou-se que aproximadamente 50% da população já experimentou alguma sensação dolorosa na face ou cavidade oral, sendo as dores agudas (odontalgias) mais comumente relatadas do que as dores crônicas (LOCKER; GRUSHKA, 1987). O perfil epidemiológico das dores orofaciais entre os brasileiros é pouco descrito, embora alguns estudos pontuais já tenham retratado a incidência dessa condição dolorosa. Segue o exemplo do estudo de Lacerda e colaboradores (2011) que demonstraram que a prevalência de dores orofaciais entre indivíduos da zona industrial do município de Laguna foi cerca de 32% da população, sendo que as odontalgias foram relatadas com maior frequência em relação a outros tipos de dor orofacial.

Embora alguns estudos relatem que a forma aguda seja a mais incidente, outros demonstram elevada frequência das formas crônicas de dor orofacial. As dores orofaciais crônicas atingem pelo menos 10% da população na fase adulta, sendo que na senescência o risco aumenta para mais de 50% (SHINAL; FILLIGIM, 2007). Além disso, pacientes do sexo feminino estão mais propensos às formas crônicas das dores orofaciais, como por exemplo, as disfunções temporomandibulares e neuralgia do trigêmeo (RUSSEL *et al.*, 1995; LeRESCHE, 1997; SHINAL; FILLIGIM, 2007; OBERMANN, 2010).

A diferença da incidência considerando as faixas etárias e os sexos ainda é um tema controverso e pouco elucidado, mas postula-se que diversos fatores interferem na percepção da dor, tais como depressão, ansiedade, fatores genéticos, influências hormonais, fatores socioeconômicos e psicológicos (ROBINSON *et al.*, 2000, STOHLER, 2001; APKARIAN *et al.*, 2005).

Quanto às dores orofaciais neuropáticas, sabe-se que a forma mais comum é a neuralgia do trigêmeo acometendo aproximadamente 4 a cada

100.000 indivíduos. Geralmente, a neuralgia do trigêmeo não ocorre até a quarta década de vida, sendo mais incidente entre a sexta ou sétima décadas (KATUSIC *et al.*, 1990). As condições que envolvem dor orofacial crônica representam um importante problema à saúde pública, pois muitas dessas dores são refratárias aos usuais tratamentos farmacológicos. Além disso, estas condições crônicas são frequentemente acompanhadas por outros problemas de saúde, tais como distúrbios de sono, alteração no funcionamento dos sistemas cardiovascular e gastrointestinal, perda ou ganho de peso, edema, sonolência, sudorese e rubor, e até mesmo comprometimento da atenção e memória (STOHLER, 2001).

1.1.2 O Sistema sensorial trigeminal

A face e a cavidade oral são inervadas pelo nervo trigêmeo ou V par craniano que, por essência, possui função sensorial e de propriocepção. O nervo trigêmeo, como a própria denominação indica, é composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular. O nervo oftálmico, ou primeira ramificação do trigêmeo, é puramente sensorial e inerva a porção frontal do crânio, órbita ocular, mucosas sinusais e cavidade nasal. O segundo ramo, maxilar, também essencialmente sensorial, inerva o lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior. O terceiro ramo, mandibular, é caracterizado como nervo misto, isto é, possui componente sensorial e motor e 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; ASHWELL, 2004).

As fibras do V par craniano apresentam terminações nervosas livres ou estão associadas a componentes sensoriais especializados na detecção de estímulos táteis inócuos ou proprioceptivos. As estruturas responsáveis pela detecção de estímulos mecânicos são denominadas de receptores de baixo limiar, já aquelas responsáveis pela propriocepção são denominadas de proprioceptores (para revisão ver SESSLE, 2000). Além disso, as fibras do

nervo trigêmeo podem ser classificadas de acordo com seu diâmetro e velocidade de condução nervosa (DUBNER; BENNET, 1983).

As fibras A α e A β , 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 δ e C. As fibras A δ 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; BENNET, 1983).

Quantitativamente, a proporção de fibras não mielinizadas no nervo trigêmeo é bem menor do que no trato espinal, possivelmente porque a região craniofacial está exposta a estímulos ambientais diferentes do restante do corpo (SESSLE, 2000; TAKEMURA *et al.*, 2006). Tal fato é suportado por estudos anteriores que demonstram que a quantidade de fibras C no gânglio da raiz dorsal representa aproximadamente 80% do total de fibras, enquanto que no gânglio do trigêmeo esse percentual é de 40% (STEER, 1971; YOUNG; KING, 1973). A distribuição das fibras entre as diversas porções anatômicas orofaciais também parece diferir, sendo que a pele da face recebe densa inervação de fibras C, a córnea é inervada principalmente por fibras A δ e a polpa dentária tanto por fibras A β quanto por fibras A δ (SUGIMOTO *et al.*, 1989; SUGIMOTO; TAKEMURA, 1993).

Os corpos celulares da grande 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 mesencefálico do trigêmeo (SESSLE, 2000; DAVIES *et al.*, 2010). Em humanos, o gânglio do trigêmeo localiza-se na parte petrosa do osso temporal e em ratos encontra-se na base do crânio (WAITE, 2003). As projeções pós-ganglionares das fibras aferentes convergem no tronco cerebral e ascendem ou descendem nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo, onde ocorrem sinapses com os neurônios de segunda ordem. Os nervos facial, vago, glossofaríngeo e cervical também convergem nos núcleos do complexo trigeminal, uma peculiaridade do sistema sensorial do trigêmeo (para revisão ver SESSLE, 2000).

O complexo de núcleos do sistema sensorial do trigêmeo pode ser dividido em núcleo sensorial principal (Pr5) e núcleo do trato espinhal (Sp5). O núcleo sensorial principal localiza-se na porção dorsal da ponte e estende-se até obex, aproximando-se ao núcleo motor do trigêmeo. Nesse núcleo há uma grande concentração de neurônios de grande calibre, fibras A β , e funcionalmente está associado a sensações discriminativas, tais como propriocepção e sensações táteis da face. (WAITE, ASHWELL, 2004). O núcleo do trato espinhal compreende três diferentes subnúcleos: *orallis* (Sp5O), *interpolaris* (Sp5I) e *caudalis* (Sp5C) (para revisão ver SESSLE, 2000). Os subnúcleos são arranjados de forma somatotópica, isto é, as porções orofaciais estão representadas em regiões específicas do complexo sensorial do trigêmeo. Assim, os axônios que se projetam da ramificação mandibular concentram-se na porção dorsal, os da ramificação maxilar na região central, enquanto que os do ramo oftálmico localizam-se na região ventral do complexo de subnúcleos do trigêmeo (WAITE, ASHWELL, 2004).

O subnúcleo *caudalis* ou caudal, que se estende desde o obex até a vértebra espinhal C2, é uma continuidade do corno dorsal da medula espinhal e representa uma estrutura crucial no processo nociceptivo. Este subnúcleo é o único que apresenta divisão laminar, sendo que uma grande parcela das fibras C e A δ projetam-se principalmente para as lâminas I, II, V e VI, enquanto que as fibras A β projetam-se para as lâminas III a VI. Além disso, o Sp5C apresenta grande concentração de mediadores químicos (i.e: substância P e glutamato) e receptores relacionados com a transmissão nociceptiva, bem como de mediadores químicos (i.e.: 5-HT, encefalina, GABA) envolvidos na modulação da dor (para revisão ver SESSLE, 2005).

Nas margens caudais do núcleo principal encontra-se o subnúcleo *oralis* ou oral, o qual está implicado tanto com a transmissão de sensações táteis quanto nociceptivas oriundas da cavidade oral e região perioral (DALLEL *et al.*, 1990; WAITE; ASHWELL, 2004). Diferentemente do Sp5C, o Sp5O é destituído de substância gelatinosa, mas recebe indiretamente as informações nociceptivas das fibras C provenientes do Sp5C, através de interneurônios que fazem a comunicação entre os dois subnúcleos (DALLEL *et al.*, 1990; VOISIN *et al.*, 2002).

Entre os subnúcleos oral e caudal encontra-se o *interpolaris*, o qual recebe projeções de fibras que inervam principalmente o periodonto e tecidos profundos da face e da cavidade oral (WAITE; ASHWELL, 2004; REN; DUBNER, 2010). Devido à sua localização, o Sp5I é dotado de um mecanismo de integração entre os subnúcleos, ou seja, é por ele que a maioria das informações nociceptivas descende para o Sp5C. Tal processo relaciona-se com a conformação estrutural desses subnúcleos, em que a porção caudal do Sp5I conecta-se intimamente com a parte ventral do Sp5C, denominada de zona de transição *interpolaris-caudalis*. Nessa zona de transição a informação nociceptiva pode ser transmitida por interneurônios ou modulada por mediadores químicos como o GABA (MATTHEWS *et al.*, 1988; REN; DUBNER, 2010).

Os neurônios aferentes primários, ativados por estímulos nocivos ou inócuos, fazem sinapse com os neurônios de segunda ordem nos subnúcleos do complexo sensorial. Esses neurônios de segunda ordem são classificados em: nociceptivos específicos, de espectro dinâmico e amplo e receptores mecânicos de baixo limiar. Os nociceptivos específicos são ativados essencialmente por estímulos nocivos, enquanto que os receptores mecânicos respondem somente a estímulos táteis. Já os neurônios de espectro dinâmico e amplo são ativados por uma ampla faixa de estímulos, desde inócuos até nocivos (SESSLE, 2005).

1.1.3 Tratamento farmacológico das dores orofaciais

A etiologia multifatorial de algumas formas de dor orofacial muitas vezes dificulta seu diagnóstico correto, fato que prejudica a escolha adequada da terapia farmacológica. O histórico clínico e anamnese são as etapas cruciais para identificação da patologia base e posterior estabelecimento de um manejo terapêutico (MOORE, 2006). Embora as terapias físicas, tais como acupuntura, estimulação elétrica transcutânea e massoterapia, possam amenizar algumas formas de dor orofacial, os regimes farmacológicos ainda são a primeira escolha terapêutica para o controle efetivo dessas condições dolorosas

(CAPELLINI *et al.*, 2006; KATO *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2007).

Na clínica, os analgésicos não opióides são os medicamentos mais prescritos para a terapêutica da dor aguda. Dentre eles, os AINE são os mais adotados no manejo das odontalgias (MOORE, 1999). A maioria das odontalgias, como a pulpite, origina-se de componentes liberados pelo processo inflamatório agudo. Desta forma, justifica-se o uso de AINE, os quais inibem as diferentes isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), reduzindo a produção de prostanoídes (HABIB; GAN, 2005; BECKER, 2010). Nas dores inflamatórias agudas, a terapia medicamentosa com os AINE está associada com diversos benefícios, que incluem efeitos adversos limitados e ações anti-inflamatória, antipirética e analgésica (BECKER, 2010).

Diferentemente da terapia medicamentosa para o controle da dor orofacial aguda, encontram-se os desafios para a terapêutica das dores inflamatórias crônicas. Os AINE raramente são indicados para o controle das dores inflamatórias crônicas em ATM ou músculos mastigatórios e, quando adotados, são utilizados no início da terapêutica ou em casos de capsulites e artrites, visando reduzir o risco de toxicidade renal e gastrointestinal relacionada ao uso prolongado desses fármacos (DIONNE, 1997; HERSH *et al.*, 2008). Várias classes de fármacos são empregadas no controle da dor inflamatória crônica, tais como antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, relaxantes musculares, entre outros, e a escolha do fármaco vai depender de diversos fatores, dentre eles a etiologia e intensidade da dor e a refratariedade a determinados fármacos (HERSH *et al.*, 2008).

Em consonância com a abordagem terapêutica das dores inflamatórias crônicas, são diversas as terapias adotadas no manejo das dores orofaciais neuropáticas, as quais representam um grande desafio quando se trata de controle farmacológico (OKESON; LEEUW, 2011).

As dores orofaciais neuropáticas esporádicas são caracterizadas por episódios breves de dor intensa do tipo choque e seguidas por remissão total. As dores são difusas e, geralmente, irradiam para o ramo mandibular do nervo trigêmeo (OKESON; LEEUW, 2011). Postula-se que essas condições dolorosas são oriundas da desmielinização neuronal proveniente da compressão do nervo (DEVOR *et al.*, 2002). Por outro lado, as dores neuropáticas contínuas raramente cessam por algum período e surgem na forma de dor espontânea e

debilitante. A fisiopatologia é pouco elucidada, mas sabe-se que são originárias de trauma em neurônios periféricos (FIELDS *et al.*, 1998).

O protocolo terapêutico para ambas as formas de dor neuropática é semelhante, entretanto, aquelas com caráter esporádico são consideradas mais fáceis de controlar do que com caráter contínuo (OKESON; LEEUW, 2011). A terapia farmacológica de escolha é a carbamazepina, um anticonvulsivante cujo principal mecanismo de ação é o bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem, o que resulta na estabilização da hiperexcitabilidade neuronal e redução da propagação de impulsos nervosos (OBERMANN, 2010). Em certos casos, a carbamazepina não é eficaz no controle da dor esporádica, assim adota-se a segunda linha de tratamento que é composta pelo anticonvulsivante lamotrigina ou pelo agonista de receptores GABA_B baclofeno (FROMM *et al.*, 1984; ZAKRZEWSKA, *et al.* 1997). Zakrzewska e colaboradores (1997) demonstraram que a lamotrigina foi eficaz no controle da dor de indivíduos com neuralgia do trigêmeo refratária a carbamazepina. Além disso, Fromm *et al.* (1984) notaram que o uso contínuo de baclofeno resulta em redução dos episódios de dor intensa; entretanto, esses autores observaram refratariedade da neuralgia do trigêmeo ao tratamento prolongado com esse agonista de receptores GABA_B.

O controle farmacológico da dor neuropática contínua é ainda mais difícil e normalmente é feito através do uso de antidepressivos tricíclicos, como por exemplo a amitriptilina, ou anticonvulsivantes, os quais representam a terceira opção para o controle de dor neuropática esporádica, refratária aos regimes farmacológicos de primeira e segunda escolhas (JENSEN *et al.*, 2009; HAANPAA *et al.*, 2010). Dentre esses fármacos, destacam-se a gabapentina e pregabalina, os quais têm demonstrado reduzir significativamente a forma contínua de dor neuropática e estarem associados a menos efeitos colaterais se comparados a outros anticonvulsivantes (LEMOS *et al.*, 2008; OBERMANN *et al.*, 2008).

Considerando que os anticonvulsivantes são os principais fármacos utilizados no controle das dores orofaciais neuropáticas, é importante mencionar que, além da refratariedade que alguns pacientes apresentam a esses fármacos, os efeitos adversos associados ao seu uso também limitam o sucesso da terapêutica. Dentre esses efeitos pode-se citar sonolência, náusea,

ataxia, incoordenação motora, os quais são mais frequentes, e hepatotoxicidade, mielossupressão, anemias aplástica, linfadenopatias, os quais são mais graves, porém menos comumente observados (OBERMANN, 2010). Além disso, alguns anticonvulsivantes, como a carbamazepina, são potentes indutores enzimáticos e, portanto, necessitam de ajustes constantes na posologia para que sua eficácia seja mantida (OBERMANN, 2010).

A refratariedade às terapias aplicadas tanto na dor neuropática esporádica quanto na contínua não é rara na clínica diária (OKESON; LEEUW, 2011). Desta forma, diversos estudos têm proposto e avaliado procedimentos cirúrgicos para o tratamento da dor, mas os mesmos são indicados somente nos casos de dor não responsiva a terapia farmacológica, pois apresentam riscos e podem causar sequelas aos pacientes (LEEUW, 2008; OBERMANN, 2010). Assim, o melhor entendimento da fisiopatologia das dores neuropáticas orofaciais, bem como a elucidação dos mediadores envolvidos nesses processos, poderão indicar novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, o desenvolvimento ou estabelecimento de novas abordagens farmacológicas.

1.2 SUBSTÂNCIA P

A substância P foi descoberta na década de 30 por um pesquisador sueco chamado Ulf von Euler, durante seu pós-doutorado no laboratório de Sir Henry Dale, em Londres (para revisão ver HÖKFELT *et al.*, 2001). Em 1931, esses pesquisadores publicaram o primeiro artigo sobre a SP, o qual descrevia que tanto o cérebro quanto o intestino continha um fator resistente à atropina que era capaz de estimular o músculo liso e causar queda na pressão arterial (von EULER; GADDUM, 1931). No entanto, foi apenas no início da década de 70 que Leeman e colaboradores identificaram a SP como um decapeptídeo e conseguiram sintetizá-lo, possibilitando assim que a SP passasse a ser testada em uma grande variedade de ensaios *in vitro* e *in vivo* (para revisão ver HÖKFELT *et al.*, 2001).

A SP, juntamente com a neurocinina A (NKA) e a neurocinina B (NKB), constitui a família das taquicininas. O precursor pré-pró-taquicinina I dá origem

tanto a SP quanto a NKA, enquanto que o precursor pré-pró-taquicinina II dá origem a NKB. Os principais receptores para taquicininas já identificados em mamíferos são denominados NK₁, NK₂ e NK₃. Todas as taquicininas podem atuar como ligantes dos três tipos de receptores. No entanto, cada receptor apresenta uma maior afinidade por uma taquicinina específica, sendo que receptores NK₁ tem maior afinidade pela SP, receptores NK₂ têm maior afinidade pela NKA e os receptores NK₃ possuem maior afinidade pela NKB (para revisão ver HÖKFELT *et al.*, 2001).

Os receptores de taquicininas pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), a qual é responsável pela ativação de segundos mensageiros que cooperam para a transdução dos sinais intracelulares (HERSHEY; KRAUSE, 1990). A estrutura desses receptores consiste em sete α -hélices transmembrana, com um domínio N-terminal extracelular e um domínio C-terminal intracelular (O'CONNOR *et al.*, 2004). O sistema fosfoinositídeo parece ser o efetor comum entre os três tipos de receptores taquicinérgicos, mas outros efetores intracelulares, tais como o AMPc (adenosina monofosfato cíclico), também levam à produção de segundos mensageiros em resposta à ativação desses receptores (PATACCHINI; MAGGI, 2001).

O gene que codifica os receptores NK₁ é definido como *TAC1*, o qual fornece duas variantes de *splicing*, resultando em duas isoformas de NK₁, uma com domínio C-terminal contendo 407 aminoácidos (isoforma *full-length*) e outra composta por 311 aminoácidos (isoforma truncada). Postula-se que a isoforma truncada diferencia-se da outra por três características, que são: a) não sofre o processo de dessensibilização e internalização, garantindo respostas prolongadas após a interação receptor e agonista; b) causam a ativação de mecanismos intracelulares distintos, como por exemplo a fosforilação de Erk_{1/2}; c) a conformação do sítio de ligação é distinta, o que reduz a sua afinidade a SP (TULUC *et al.*, 2009).

Já os receptores NK₂ e NK₃ são codificados pelos genes *TAC2* e *TAC3*, respectivamente. O gene *TAC2*, assim como o *TAC1*, também produz duas variantes de *splicing*, a α -isoforma e a β -isoforma. A primeira isoforma é dita como receptor NK₂ "clássico", enquanto que a segunda carece de uma sequência de aminoácidos que deveria compor os domínios extracelular e

transmembrânico. Como consequência dessa deleção, parece que a sinalização intracelular não ocorre em decorrência da ativação dessa isoforma, porém estudos adicionais são necessários para elucidar se essa isoforma tem participação em algumas funções celulares (PAGE; BELL, 2002; BELLUCCI *et al.*, 2004).

Os receptores NK₁ de humanos são constituídos de 407 aminoácidos e sua massa molecular é aproximadamente 46 kDa. Os segundo e terceiro domínios transmembrana estão implicados na interação com o agonista ou antagonista, enquanto que o terceiro domínio citoplasmático é responsável pela interação com as proteínas G dos tipos G_{q/11}, G_{as} e G_{α0} (HARRISON; GEPPETI, 2001; O'CONNOR *et al.*, 2004). Há evidências de que a fosforilação dos resíduos de serina e treonina, contidos na porção C-terminal, culmina na dessensibilização do receptor em resposta à sua repetida interação com o agonista (KHAWAJA; ROGERS, 1996).

Os três tipos de receptores de taquicininas encontram-se heterogeneamente distribuídos pelo organismo. O receptor NK₁ é amplamente expresso no sistema nervoso central e periférico, células do sistema imune, bem como em células endoteliais e musculares (PENNEFATHER *et al.*, 2004). O receptor NK₂ é detectado principalmente em tecidos periféricos e em porções restritas do SNC (PENNEFATHER *et al.*, 2004). Por outro lado, o receptor NK₃ encontra-se expresso principalmente no SNC e em alguns tecidos periféricos, tais como útero, musculatura esquelética, pulmão e fígado (PAGE; BELL, 2002; LECCI; MAGGI, 2003; PENNEFATHER *et al.*, 2004).

O neuropeptídeo SP é sintetizado nos ribossomos como uma grande cadeia de aminoácidos que, por meio de processos enzimáticos, torna-se decapeptídeo biologicamente ativo (O'CONNOR *et al.*, 2004). Quando liberado na fenda sináptica é rapidamente desintegrado por ação de diversas enzimas, como as catepsinas D e E, endopeptidase neutra (NEP), enzima conversora da angiotensina (ECA), entre outras. Apesar de a SP ser clivada pela grande maioria dessas enzimas, a NEP e a ECA são as mais atuantes nesse processo metabólico. Isso se deve pela ampla distribuição dessas enzimas tanto no sistema nervoso central quanto periférico. A NEP tem sido associada principalmente com a degradação da SP no cérebro, medula espinhal e tecidos periféricos; enquanto que a ECA é mais atuante no plasma, fluido

cerebroespinhal e substância negra. Ambas as enzimas utilizam como processo catalítico a hidrólise da porção C-terminal da SP, culminando na perda do sítio de ligação ao receptor (para revisão ver HARRISON; GEPPEI, 2001).

A SP é biologicamente ativa em concentrações extremamente baixas e produz uma grande variedade de efeitos biológicos, os quais são mediados principalmente pela ativação de receptores NK₁. Esses efeitos incluem vasodilatação, extravasamento plasmático, ativação de células imunes, bem como participa da patofisiologia de doenças inflamatórias dos sistemas respiratório, gastrointestinal e músculo-esquelético (KRANEVELD; NIJKAMP, 2001; DIANZANI *et al.*, 2003; O'CONNOR *et al.*, 2004; BASBAUM *et al.*, 2009). No SNC, acredita-se que a SP participe de várias respostas comportamentais, na regulação da sobrevivência e degeneração neuronais, na função cardiovascular e respiratória e na ativação do reflexo emético. Na medula espinhal, a SP participa na transmissão de estímulos nociceptivos e modula reflexos autonômicos. Na periferia, a SP está localizada nos neurônios sensoriais primários e neurônios intrínsecos dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário (MAGGI, 2000; O'CONNOR *et al.*, 2004).

Além disso, a SP é um dos principais mediadores da chamada inflamação neurogênica, por ser liberada por fibras C peptidérgicas ativadas durante a resposta inflamatória. No entanto, evidências recentes sugerem que as fibras C não são a única fonte de SP, a qual também pode ser liberada por células imunes, leucócitos circulantes e células dendríticas (O'CONNOR *et al.*, 2004; SIO *et al.*, 2008;). Outro importante mediador da inflamação neurogênica é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O CGRP também é expresso por fibras C peptidérgicas e liberado, juntamente com a SP, em resposta à ativação dessas fibras. O CGRP é um importante vasodilatador e tem sido implicado em algumas formas de dor orofacial, especialmente na enxaqueca (BENEMEI *et al.*, 2009).

Os efeitos pró-inflamatórios da SP incluem liberação de histamina dos mastócitos e de serotonina das plaquetas, os quais participam da mediação de respostas como edema, rubor, calor e hiperalgesia. Adicionalmente, a substância P leva a uma maior liberação de bradicinina pelos vasos sanguíneos no local da lesão, a qual também causa hiperalgesia e aumento da

permeabilidade vascular (ERJAVEC *et al.*, 1981; KHALIL; HELME, 1990). Por outro lado, evidências anteriores têm demonstrado que a SP está implicada no reparo tecidual durante a resolução da inflamação, atuando na angiogênese e como mitógeno para células musculares, endoteliais, sinoviais e fibroblastos (NILSSON *et al.*, 1985; LOTZ *et al.*, 1987; ZICHE *et al.*, 1990).

Devido às inúmeras ações pró-inflamatórias já descritas da SP, diversos estudos têm investigado a participação do sistema SP/NK₁ tanto em respostas nociceptivas quanto no processo inflamatório (ABBADIE *et al.*, 1997; CAMPOS; CALIXTO, 2000; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009; LaGRAIZE *et al.*, 2010). Uma das ferramentas comumente utilizadas nesses estudos são os antagonistas seletivos de receptores NK₁, os quais foram substancialmente aprimorados nos últimos anos.

Na década de 80, diversos antagonistas peptídicos derivados da SP foram desenvolvidos, mas careciam de potência, seletividade e ainda apresentavam atividade residual de agonista parcial. Por outro lado alguns antagonistas peptídicos, tais como FR113680 e o FK 888, demonstraram alta afinidade e seletividade para receptores NK₁, mas apresentam baixa biodisponibilidade oral e atravessam a barreira hematoencefálica (QUARTARA; MAGGI, 1997; HARRISON; GEPPEI, 2001).

Já na década de 90, o primeiro antagonista não peptídico seletivo para receptores NK₁ foi desenvolvido (CP 96345), o qual demonstrou um efeito bastante satisfatório em modelos animais de dor e inflamação. No entanto, foi observado que sua ação não se restringia aos receptores NK₁ e que esse antagonista era capaz de interagir com canais de cálcio do tipo L. O RP67580, segundo antagonista não peptídico para receptores NK₁ desenvolvido, apresentou potente atividade antinociceptiva, semelhante à morfina, contudo, em concentrações elevadas, esse antagonista também exercia efeito sobre canais de cálcio (para revisão ver BENTACUR *et al.*, 1997).

Atualmente, há uma considerável variedade de antagonistas não peptídicos seletivos para receptores NK₁, os quais apresentam diversos graus de afinidade, dependendo da espécie utilizada como modelo (GARRET *et al.*, 1991; SNIDER *et al.*, 1991). Dentre os mais potentes e seletivos, encontra-se o SR140333B que é um quaternário de amônio que tem sido extensivamente

utilizado em estudos de caracterização funcional dos receptores NK₁ na periferia (EDMONDS-ALT *et al.*, 1993).

1.2.1 Participação da substância P em diferentes modelos de inflamação e dor

As evidências da participação da SP na resposta inflamatória em modelos animais provêm principalmente de observações de níveis alterados de SP e/ou receptores NK₁ no tecido inflamado, efeitos anti-inflamatórios de antagonistas dos receptores NK₁, bem como da deleção do gene para o receptor NK₁ (BENEMEI *et al.*, 2009; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009; SAHBAIE *et al.*, 2009). Em alguns desses estudos, a participação da SP na hiperalgesia inflamatória também foi avaliada. Nesse sentido, Birch e colaboradores (1992) observaram que o edema induzido pela injeção intraplantar de um agonista de receptores NK₁ (GR73632) foi reduzido pelo tratamento prévio com um antagonista desses receptores. Além disso, esses autores relataram que a segunda fase da resposta à formalina foi abolida por esse mesmo tratamento, sugerindo a participação do sistema SP/NK₁ em um modelo de dor inflamatória. No estudo de Keeble e colaboradores (2005), camundongos *knockout* para receptores NK₁ que receberam adjuvante completo de Freund (CFA) ou SP apresentaram extravasamento plasmático significativamente reduzido se comparado aos camundongos normais. Além disso, a administração de SP após a administração de CFA induziu respostas ainda maiores, o que sugere que a ação de SP é exacerbada quando existe uma inflamação pré-existente. Já no estudo de Costa e colaboradores (2006), a administração de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em camundongos levou a migração e acumulação de leucócitos no espaço extravascular em animais controle, o que não ocorreu no grupo *knockout* para receptores NK₁ e naqueles que receberam um antagonista do receptor NK₁. Esse resultado sugere que alguns dos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α estariam associados à liberação de SP. Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que a hiperalgesia inflamatória evocada por SP eleva consideravelmente os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (COSTA *et al.*, 2006; SAHBAIE *et*

al., 2009).

Com relação à inflamação neurogênica, são descritos efeitos diretos e indiretos da SP, no local da lesão e em órgãos distantes. Sio e colaboradores (2008) demonstraram que após camundongos serem submetidos à lesão por queimadura de 30% da superfície corporal, ocorria um aumento da produção de SP, do gene da PPT-1 (pré-pró-taquicinina) e da atividade biológica do receptor NK₁, os quais foram associados a danos pulmonares, evidenciados por aumento da permeabilidade microvascular, edema e acúmulo de neutrófilos, bem como aumento expressivo de RNA mensageiro para IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos pulmões. Ou seja, a lesão na pele dos animais promoveu a inflamação mediada por SP tanto no local da lesão quanto nos pulmões. Nesse estudo, a administração de um antagonista dos receptores NK₁ reverteu a inflamação e lesão pulmonares. Amann e colaboradores (2000) demonstraram que a administração intraplantar de SP promoveu aumento expressivo de fator de crescimento neuronal (NGF), o qual foi revertido pelo tratamento local com o antagonista de receptores NK₁ (SR140333B). O papel do NGF é bastante nítido na inflamação neurogênica, pois ele possui o poder de regular a expressão de CGRP no gânglio da raiz dorsal (LINDSEY; HARMAR, 1989). No entanto, parece que o NGF não exerce nenhuma influência na expressão de SP durante a inflamação neurogênica induzida por carragenina (AMANN *et al.*, 2000).

A participação da SP na transmissão nociceptiva ao nível espinal também já foi alvo de diversos estudos. Segundo alguns autores, a administração de substância P na medula espinhal evoca comportamentos nociceptivos e hiperalgesia térmica na pata de ratos (MEERT *et al.*, 2003; YOSHIMURA; YONEHARA, 2006). Doyle e Hunt (1999) mostraram que a alteração na expressão de receptores NK₁ na lâmina I da medula espinhal é proporcional à severidade do estímulo nocivo aplicado na periferia. Em consonância a esse estudo, Abbadie e colaboradores (1997) notaram que a administração de CFA na pata dos animais leva a um aumento na expressão de receptores NK₁ na medula espinhal. Além disso, demonstraram que tanto o estímulo térmico quanto mecânico aplicados na pata dos animais leva a internalização desses receptores, indicando sua ativação, e que o percentual de internalização desses receptores é ainda mais expressivo quando o estímulo mecânico ou térmico é aplicado em animais previamente submetidos

à injeção intraplantar de CFA. Esses resultados reforçam a ideia de que, na presença de um processo inflamatório, as ações da SP são exacerbadas. Além disso, vários estudos mostram que o bloqueio de receptores NK₁ na medula espinhal, através da administração intratecal de antagonistas desses receptores, leva à redução das respostas nociceptivas dos animais em diferentes modelos (TRAUB, 1996; GAO *et al.*, 2003; BRADESI *et al.*, 2006).

Em modelos de dor neuropática, a participação da SP e dos receptores NK₁ também tem sido avaliada, especialmente em modelos que envolvem nervos espinhais, através do uso de antagonistas e de análises de alterações nos níveis de SP ou na expressão de receptores NK₁. Nesse sentido, Mansikka e colaboradores (2000) descreveram que a hiperalgesia mecânica induzida por ligação de nervos espinhais foi reduzida em camundongos com depleção gênica para os receptores NK₁ (MANSIKKA *et al.*, 2000), enquanto vários autores já reportaram que a administração intraplantar ou intratecal de antagonistas de receptores NK₁ reduzem a hiperalgesia térmica e/ou mecânica em modelos de dor neuropática (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; CAHILL; CODERRE, 2002; JANG *et al.*, 2004). Em adição, alguns estudos demonstraram aumento nos níveis de SP nas fibras aferentes primárias após lesão do nervo ciático (MA; BISBY, 1998; MIKI *et al.*, 1998; MA *et al.*, 1999), e a origem destes neuropeptídeos parece ser neurônios sensoriais não lesionados (FUKUOKA *et al.*, 1998; MA *et al.*, 1999). Por outro lado, no DRG e na medula espinhal, tem sido demonstrada diminuição nos níveis de SP após lesão de nervos periféricos (MARCHAND *et al.*, 1994; NAHIN *et al.*, 1994; SOMMER; MYERS, 1995).

Embora o estudo do sistema SP/NK₁ esteja mais elucidado em modelos de dor inflamatória ou neuropática envolvendo nervos espinhais, algumas pesquisas têm direcionado a investigação do papel desse neuropeptídeo no sistema trigeminal. Nesse sentido, Gaspersic e colaboradores (2008) detectaram aumento da expressão de SP em fibras C, com origem na ramificação mandibular, no gânglio do trigêmeo após indução de periodontite em animais. Interessantemente, em humanos, também existem demonstrações de níveis elevados de SP na polpa dentária de indivíduos acometidos por pulpites (AWAWDEH *et al.*, 2002; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2007)

Em relação às dores orofaciais de origem neuropática, recentemente,

um estudo empregando o modelo de lesão parcial do nervo infraorbital de camundongos demonstrou uma redução nos níveis de SP e CGRP no corno dorsal, porém um aumento na expressão de receptores NK₁ no corno dorsal medular ipsilateral à lesão do nervo (XU *et al.*, 2008). Em contraste, após secção do nervo infraorbital de ratos foi observado um aumento no RNAm para o precursor da SP, a pré-pró-taquicinina A, no gânglio do trigêmeo, e este foi sugerido como um dos mecanismos que contribui para o desenvolvimento da nocicepção associada a estimulação mecânica da face avaliada nesse estudo (TSUZUKI *et al.*, 2003).

Os estudos sugerem, portanto, que a substância P está envolvida, via receptores NK₁, em processos inflamatórios e é capaz de produzir hiperalgesia, especialmente na presença de inflamação ou lesão tecidual. Entretanto, os resultados divergentes acerca da reversão da hiperalgesia mecânica e térmica com antagonistas de receptor NK₁ sugerem que os mecanismos envolvidos nessas duas formas de sensibilidade podem ser diferentes, e que muitas outras vias moleculares e substâncias devem estar também envolvidas. Apesar de diversas evidências acerca da participação da SP e do receptor NK₁ em modelos de dor envolvendo nervos espinhais, o papel desse neuropeptídeo na nocicepção trigeminal ainda é pouco compreendido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse estudo é avaliar o papel da substância P e dos receptores NK₁ periféricos em modelos de dor orofacial inflamatória e neuropática em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar se a substância P, administrada no lábio superior de ratos, é capaz de evocar comportamentos nociceptivos bem como hiperalgesia térmica, ao frio e ao calor, e hiperalgesia mecânica na região orofacial;
- II. Verificar a participação dos receptores NK₁ na hiperalgesia térmica induzida por substância P;
- III. Investigar o efeito do bloqueio farmacológico de receptores NK₁ na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina;
- IV. Avaliar a influência do bloqueio farmacológico de receptores NK₁ em ambas as fases da resposta nociceptiva induzida por formalina administrada na região orofacial;
- V. Avaliar o efeito do bloqueio farmacológico de receptores NK₁ na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital, um modelo de dor orofacial neuropática;
- VI. Investigar possíveis alterações na expressão de receptores NK₁ no gânglio do trigêmeo de ratos após injeção de carragenina no lábio superior ou constrição do nervo infraorbital.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

The role of substance P and neurokinin-1 receptors in inflammatory and neuropathic orofacial pain models.

Teodoro, Fernanda C.^a; Tronco Júnior, Marcos F.^a; Zamprônio, Aleksander R.^a; Martini, Alessandra C.^b; Rae, Giles A.^b; Chichorro, Juliana G.^{a*}

^a Department of Pharmacology, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil.

^b Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil.

Abstract

There is accumulating evidence that substance P released from peripheral sensory neurons participates in inflammatory and neuropathic pain. In this study it was investigated the ability of substance P to induce orofacial nociception and thermal and mechanical hyperalgesia, as well as the role of NK₁ receptors on models of orofacial inflammatory and neuropathic pain. In addition, Western Blot was used to assess the expression of NK₁ receptors on the trigeminal ganglia of rats. Substance P injected into the upper lip at 1, 10 and 100 µg/50 µL failed to induce significant nociceptive responses, even in rats pre-treated with captopril, and also failed to evoke cold and mechanical hyperalgesia. However, Substance P (at 0.1, 1 and 10 µg/50 µL) induced marked orofacial heat hyperalgesia, which was reduced by the systemic pre-treatment of rats with a non-peptide NK₁ receptor antagonist (SR140333B, 3 mg/Kg). Systemic treatment with SR140333B (3 mg/Kg) also reduced carrageenan-induced heat hyperalgesia, but did not exert any influence on carrageenan-induced cold hyperalgesia. Blockade of NK₁ receptors with SR140333B (3 mg/Kg) also reduced by about 50% both phases of the formalin response evaluated in the orofacial region. Moreover, heat, but not cold or mechanical, hyperalgesia induced by constriction of the infraorbital nerve, a model of trigeminal neuropathic pain, was abolished by pretreatment with SR140333B (3 mg/Kg). Analysis by Western blot demonstrated increased expression of NK₁ receptors in the cytosol of trigeminal ganglion cells of rats which received carrageenan into the upper lip or which were submitted to the constriction of the infraorbital nerve. Our results suggest that substance P may have a role in orofacial inflammatory and neuropathic pain.

Keywords: substance P, NK₁ receptor, hyperalgesia, inflammatory pain, neuropathic pain, trigeminal nerve.

1. Introduction

Orofacial pain represents a major medical and social problems. It is estimate that, in the United States, about 22% of the Americans older than 18 years report pain in the orofacial region (Lipton et al., 1993). Orofacial pain encompasses various disorders, including those that directly affect the trigeminal nerve, such as trigeminal neuralgia, invasion by tumors that compromise joint or another orofacial structures, temporomandibular joint dysfunction, headache, migraine, as well as idiopathic pain. In addition, orofacial pain may be classified in three categories, acute pain after injury, chronic inflammatory pain (e.g., temporomandibular disorders) and neuropathic pain (e.g., trigeminal neuralgia) (Eide, Rabben, 1998; LeResche, 1997).

There are several models to study orofacial pain, both of inflammatory and neuropathic nature. The orofacial formalin test, first proposed by Clavelou and colleagues (1989), is extensively used to assess nociceptive process in the orofacial region. Additionally, injection of carrageenan into the upper lip, as well as other orofacial structures, is widely employed to study orofacial inflammatory hyperalgesia (Chichorro et al., 2006a; Rodrigues et al., 2006; Teixeira et al., 2010). Regarding orofacial neuropathic pain, the constriction of the infraorbital nerve, a model established by Vos and Maciewick (1991) has been shown to reproduce many sensory alterations observed in patients suffering of trigeminal neuropathic pain, such as spontaneous pain, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (Chichorro et al., 2006a, b; Chichorro et al., 2009; Imamura et al., 1997; Vos et al., 1994).

There is accumulating evidence that the undecapeptide substance P

(SP) is a neurotransmitter of small diameter nociceptive afferents of the trigeminal system (Hökfelt et al., 1975) and in terminals in the spinal dorsal horn (Hargreaves, 2011; Takemura et al., 2006). The biological actions of SP can be mediated through the activation of three different neurokinin (NK) receptors named NK₁, NK₂ and NK₃, but the NK₁ receptors demonstrates a preferential affinity for SP (for review see Satake et al., 2012). Indeed, several studies support the role of substance P, acting via NK₁ receptors, in the transmission of noxious information in the spinal cord (Abbadie et al., 1997; LaGraize et al., 2010; Mansikka et al., 2000), as its participation in models of inflammatory and neuropathic pain. In this regard, González and colleagues (1998) showed that blockade of peripheral NK₁ receptors prevented the development of thermal and mechanical hyperalgesia in a rat model of surgical pain. Also, Cahill and Coderre (2002) demonstrated the anti-hyperalgesic effect of a non-peptide NK₁ receptor antagonist in a model of sciatic nerve constriction. In addition, studies have provided evidence for the role of SP, acting through NK₁ receptors, in nociceptive behavior responses of rats submitted to high intensity thermal, mechanical, inflammatory and chemical stimuli applied to the hindpaw (Cahill, Coderre, 2002; Jang et al., 2004; Gao et al., 2003; Nakamura-Craig, Smith, 1989; Sammons et al., 2000; Wajima et al., 2000).

Considering orofacial pain, few studies have shown the involvement of the SP/NK₁ system in experimental inflammatory hyperalgesia (Denadai-Souza et al., 2009; Takeda et al., 2005). In humans, SP expression is significantly increased in the inflamed pulp (Awawdeh et al., 2002; Caviedes-Bucheli et al. 2005; Sattari et al., 2010), while in rats there is increased of small SP-positive

neurons in trigeminal ganglia neurons projecting from the inflamed area after ligature-induced periodontitis (Gaspersic et al., 2008). These data strongly suggest that SP plays a role in the trigeminal nociceptive process.

In light of the above considerations, the present study aimed to investigate whether SP is able to evoke nociceptive behavior and thermal and mechanical hyperalgesia when injected into the upper lip of rats. In addition, to assess if this neuropeptide, acting through NK₁ receptors, participates in inflammatory and neuropathic orofacial pain. Finally, to examine changes in NK₁ receptors expression in the trigeminal ganglia of rats submitted to orofacial inflammation or nerve injury.

2. Experimental Procedures

2.1 Animals

Experiments were conducted on male *Wistar* rats weighing 180–220 g, maintained five a cage at controlled temperature ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) under a 12/12 hours light/dark cycle (lights on at 08:00 h) with free access to food and tap water. They were acclimatized to the laboratory for at least 48 h before use. The experimental procedures were previously approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the Federal University of Parana (authorization number 424), where the study was carried out, and conducted in accordance with the ethical guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann, 1983) and Brazilian regulations on animal welfare. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2 Cold stimulation

This test was performed as previously described by Chichorro et al. (2006a). Before each testing session, animals were placed in individual plastic observation cages and left to adapt to the environment for at least 30 min. After this period, they usually displayed considerable sniffing, but very little locomotor activity. Cold stimulation was applied by the experimenter in the form of a brief 2 seconds spray of tetrafluoroethane to the center of the right vibrissal pads, while gently restraining the animal in its cage by placing one hand around its trunk. The total duration of bilateral facial grooming behavior with both forepaws directed to the snout was recorded, using a stopwatch, over the first 2 min following application of the cold stimulus, as an index of the intensity of nocifensive responsiveness.

2.3 Heat stimulation

Heat stimulation of the orofacial area was performed as previously described (Chichorro et al., 2009). On each occasion, the animal was temporarily removed from its home cage and gently held by the experimenter and a radiant heat source 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 (in seconds) using a stopwatch, and a 20 seconds cut-off time was used to prevent tissue damage.

2.4 Mechanical stimulation

To assess the mechanical threshold, before each testing session, animals were placed in individual plastic cages and left to adapt to the environment for at least 2 hours. The mechanical threshold was measured using a graded series of eight von Frey filaments ranging from 0.04 to 8 g (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, Wood Dale, IL) as described previously (Christensen et al., 1999; Chichorro et al. 2006b). Each filament was applied three times near the center of the right vibrissal pad. Each stimulation series began with the filament producing the lowest force, and proceeded up to the filament that evoked one of the following nocifensive behaviors twice: brisk head withdrawal, escape or attack reactions or asymmetric facial grooming. Only rats that did not react to application of the 8 g filament in the preoperative tests or previous injection of substance P were included in this study, to avoid unspecific responses.

2.5 Formalin induced-response

This test was based on the study by Clavelou et al. (1989) with minor modifications. Briefly, each animal was placed in individual plastic cages and left to adapt to the environment for at least 15 min. Subsequently, the animals were gently held and received a subcutaneous 50 μ l injection of formalin (2.5%) or vehicle (saline) into the right upper lip and were returned immediately to the observation cage. The time each animal spent rubbing the injected area with the forepaws was recorded in consecutive 3-min intervals over a 30 min period,

and it was considered as an index of nociception. The nociceptive responses were measured in both phases after injection of formalin into upper lip, the first phase lasting 0–3 min and the second was considered 12–30 min after formalin injection.

2.6 Constriction of the infraorbital nerve

The constriction of the infraorbital nerve (CION) was performed according to Chichorro et al. (2006a, b), a modify procedure from that originally proposed by Vos and Macviewick (1991). Briefly, rats were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of cetamine and xylazine (50 and 10 mg/Kg, respectively) and an incision was made in the skin of the snout, under the right eye, about 3 mm caudal to the mystacial pads. The superior lip elevator and anterior superficial masseter muscle were bluntly dissected to expose the rostral end of the infraorbital nerve, as it emerged from the infraorbital fissure. Special care was taken do not damage the facial nerve. Two silk 4-0 ligatures were then tied loosely and 2 mm apart around the infraorbital nerve and the wound was closed with additional silk sutures (4-0). Sham-operated 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.

2.7 Blotting for detection of NK₁ receptors

Analysis by immunodetection of the NK₁ receptor was performed in the trigeminal ganglia of rats that received saline or carrageenan injection into the upper lip, naïve, sham or nerve-injured rats, to verify possible changes in this receptor expression. Four hours after vehicle (saline, 50 µL) or carrageenan (50 µg/50 µL) injection into the upper lip or four days after sham- or infraorbital nerve constriction-surgery, animals were sacrificed by an overdose of an anesthetic agent, followed by decapitation, and ipsi and contralateral trigeminal ganglia were removed. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. The collected tissue was homogenized in a lysis buffer containing 10 mM HEPES pH 7, 9; 10 mM KCl; 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol; 10 µg/mL aprotinin; leupeptin 10 µg /mL; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and deionized water, and kept at rest for 15 min at 4°C. The homogenized tissue was centrifuged at 14,000 x g for 45 min at 4°C, the supernatant corresponding to the cytosolic extract was collected for posterior protein concentration determination. The pellet was reconstituted with a lysis buffer and 0.1% Triton X. After centrifugation (14,000 g for 45 min), the supernatant containing the membrane-rich fraction was collected and protein concentrations were determined by Bradford method on both extracts, from membrane and cytosol. Equivalent amounts of protein were mixed in a buffer containing 200 mM Tris; 10% glycerol; 2% SDS; 2.75 mM; β-mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue and boiled for 5 min. Samples containing 50 µg of protein were resolved in a 10% SDS gel by electrophoresis. After transfer to a polyvinylidene fluoride membrane, the blots were positioned in the Snap i.d. Protein Detection System (Millipore Corporation, Billerica, MA,

USA) blot holder, connected to a vacuum pump. The membranes were blocked with TBS-T buffer containing 1% bovine serum albumin for 20 seconds under vacuum. Membranes were then incubated with the anti-NK₁ primary antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) for 10 min at room temperature. The vacuum pump was actuated again to discard the antibodies by suction through 3 consecutive washes with TBS-T buffer. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated donkey anti-goat IgG secondary antibody (1:600, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) for 10 min at room temperature and subjected again to 3 successive washes with TBS-T buffer. The immunocomplexes were visualized using the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brazil)). Quantification of the signal intensity of bands was determined by densitometry using the software Scion Image Software (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

2.8 Drugs

Substance P, carrageenan and captopril were all obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA) and dissolved in 0.9% saline solution. SR140333B ((S)-1-{3-(3,4-dichlorophenyl)-3-[2(4-phenyl-1-azabicyclo[2.2.2]oct-1-yl)-ethyl]-piperidin-1-yl}-2-(3-isopropoxyphenyl)-ethanone benzenesulfonate) was donated by Sanofi-Aventis (France) and dissolved in Tween 80 (1%) and 0.9% saline solution (99 %). Formalin was obtained from Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil) and dissolved in 0.9% saline solution. Ketamine was obtained from Rhobifarma Ind. Farmacêutica (Hortolândia, SP, Brazil) and

xylazine from Laboratórios König S.A. (Avellaneda, Argentina). The primary anti-NK₁ antibody and the secondary antibody (horseradish peroxidase conjugated donkey anti-goat IgG antibody) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc.

2.9 Experimental procedures

Evaluation of the ability of SP to induce orofacial nociceptive response, thermal and mechanical hyperalgesia

To assess whether SP is able to evoke nociceptive behavior in the orofacial area, one group of animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of captopril (5 mg/Kg) 30 min before SP injection (1; 10 and 100 µg/50 µL, s.c.) into the upper lip, while another group of rats received only SP (same doses mentioned above), and the time which animal spent rubbing the injected area with the forepaws was recorded over 15 min. Control animals were treated identically with the corresponding vehicles. To evaluate the influence of SP on orofacial thermal stimulation, SP at 0.1, 1 and 10 µg/50 µL or vehicle (saline, 50 µL) were injected subcutaneously into the upper lip and the radiant heat source was applied before the injection and at 1 h-intervals up to 4 h. An additional group of rats received SP (0.1, 1 and 10 µg/50 µL) or vehicle (saline, 50 µL) into the upper lip and the cold stimulus was applied prior to its administration and at 1 h-intervals up to 4 h. To assess the influence of SP on the orofacial mechanical threshold, rats received SP (1 µg/50 µL, s.c.) or vehicle and the stimulation was performed before and at 1h-intervals up to 4 h after the

injection. In another set of experiments, rats were treated systemically with the NK₁ receptor antagonist (SR140333B, 1 or 3 mg/Kg, i.p.) or vehicle (1 mL/Kg) 30 min before SP (1 µg/ 50 µL) injection into the upper lip and the heat stimulus was applied before and at 1 h-intervals up to 4 h after the local injection.

Influence of NK₁ receptors blockade on formalin-evoked grooming behavior and carrageenan-induced thermal hyperalgesia

Rats received SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) or vehicle (1 mL/Kg, i.p.) 30 min before carrageenan (50 µg/50 µL) injection into the upper lip and heat or cold stimulation was performed before and at 1 h-intervals up to 4 h after the local injection, respectively. Other group of animals were injected with formalin (2.5%, 50 µL) or vehicle (saline, 50 µL) into the upper lip and then the time each animal spent rubbing the injected area with the forepaws was recorded in consecutive 3 min- intervals over a 30 min period. An additional group of rats received SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) 30 min before the injection of formalin or vehicle into upper lip.

Influence of NK₁ receptors blockade on thermal and mechanical hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction

Rats were submitted to CION or sham surgery, and on day 4 postoperative, they were treated systemically with SR140333B (3 mg/Kg) or vehicle (1 mL/Kg) and the thermal hyperalgesia (to heat and cold) was assessed in different groups of rats before and at 1h-intervals up to 6 h after the

treatments. In a different group of rats, the mechanical threshold was evaluated before the sham or CION surgery and on postoperative day 16 (peak of mechanical hyperalgesia), when they received SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) or vehicle (1 mL/Kg) and the mechanical stimulation was performed at 1 h-intervals up to 6 h after the treatments. The dose of SP was based on the study of Sahbaie et al. (2009) while the dose of SR140333B was based on the studies of Bradesi et al. (2006); Denadai-Souza et al. (2009) and Reis et al. (2011).

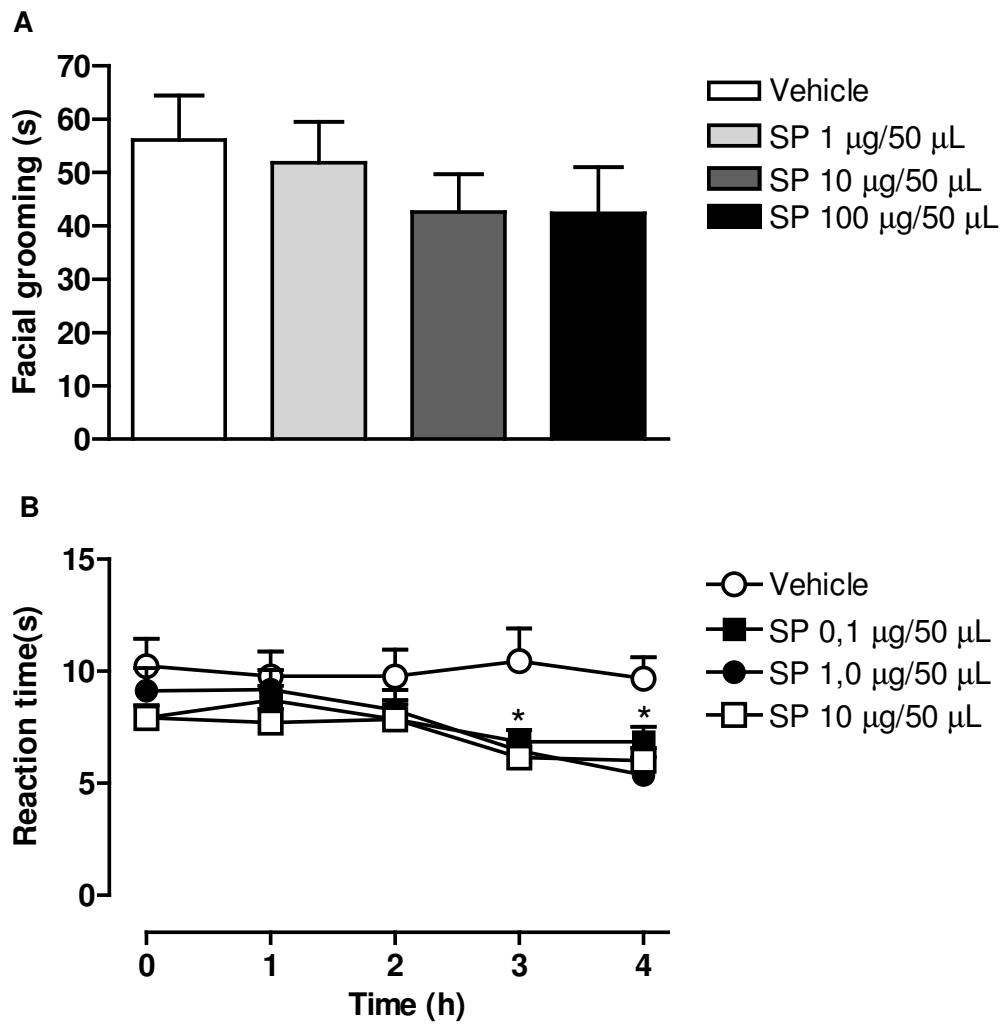
2.10 Statistical analysis

Two-way repeated measures ANOVA was used to analyze the data from both, thermal and mechanical stimulation, with drug treatment as the independent factor and the time points evaluated of nociceptive behavior as the repeated measure. In case of significant differences with the independent factor or with the interaction between the independent and repeated factors, one-way ANOVA, followed by the Duncan's post-hoc test, was performed. The results obtained from experiments assessing substance P- or formalin-induced nociception and data from Western blot were submitted to one-way ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test. In all statistical analysis $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Evaluation of the ability of SP to induce orofacial nociceptive response, thermal and mechanical hyperalgesia

Substance P (1, 10 and 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) injected into the upper lip failed to increase the time animals spent executing facial grooming behavior compared to animals treated with saline (Figure 1A). Also, previous treatment with captopril (5 mg/Kg, i.p.), to prevent the degradation of SP by angiotensin-converting enzyme (ACE), failed to modify the time of facial grooming evoked by SP (FIGURE 1A). In contrast, when injected at 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, SP was able to induce heat hyperalgesia, starting 3 h and persisting up to 4 h after its injection (FIGURE 1B). It is also noteworthy that the thermal hyperalgesia induced by SP at 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ persisted up to 6 h after its injection (data not shown). On the other hand, SP (0.1- 10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) injected into the upper lip did not induce hyperalgesia to a cold stimulus applied to the orofacial region or altered the mechanical threshold assessed by the application of Von Frey filaments, when injected at 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (FIGURE 1C and D). The SP-induced heat hyperalgesia was reduced by the prior treatment with the NK₁ receptor antagonist SR140333B systemically injected at 3 mg/Kg, but not at 1 mg/Kg, and only at the third hour after the treatments (FIGURE 2).



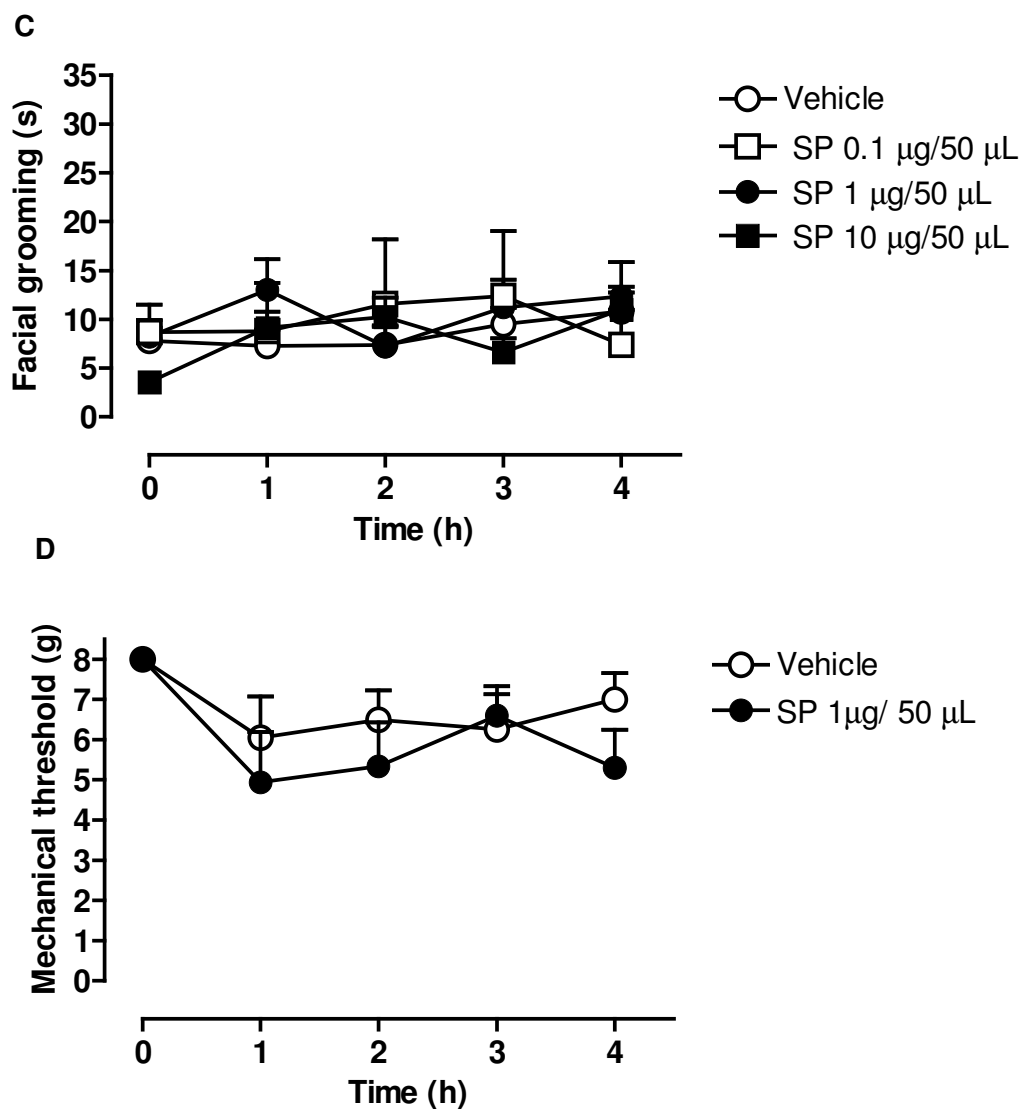


FIGURE 1 - INFLUENCE OF SUBSTANCE P ON OROFACIAL NOCICEPTIVE BEHAVIOR AND ON THERMAL AND MECHANICAL THRESHOLD IN RATS. Animals, pre-treated or not with captopril (5 mg/kg) received an injection of SP (1, 10 or 100 µg/50 µL, s.c.) or the corresponding vehicle into the upper lip and the facial grooming time was registered over the next 15 minutes (panel A). SP (0.1, 1 and 10 µg/50 µL, s.c.) or vehicle was injected into the upper lip and reaction time to a radiant heat stimulus applied to the face or the grooming behavior after the application of a cold stimulus were evaluated at 1h-intervals up to 4 hours (panels B and C, respectively). On panel D, SP (1 µg/50 µL) or vehicle was injected into the upper lip and the mechanical threshold was assessed at 1h-intervals up to 4 hours. Each point represents mean \pm S.E.M. of 5 - 10 animals. $P < 0.05$ compared with the vehicle group (one-way ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test, panel A, and two-way repeated measures ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test on panels B, C and D).

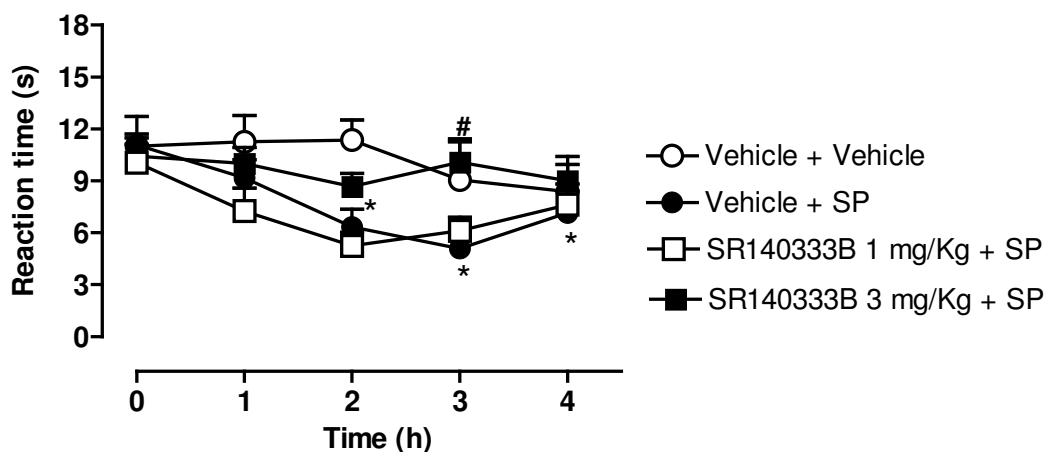


FIGURE 2 - EFFECT OF A SELECTIVE NK₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON SP-INDUCED HEAT HYPERALGESIA. Animals were treated systemically with the NK₁ receptor antagonist SR140333 (1-3 mg/Kg, i.p.) 30 min prior the injection of SP (1 µg/50 µL) or vehicle into the upper lip. Each point represents mean ± S.E.M. of 6 - 8 animals. Asterisks and Fences denote $P < 0.05$ when compared with the vehicle + vehicle and vehicle + SP group, respectively (two-way repeated measures ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test).

3.2 Influence of NK₁ receptors blockade on formalin-evoked grooming behavior and carrageenan-induced thermal hyperalgesia

Formalin (2.5%, 50 µL) injection into upper lip of rats induced a biphasic nociceptive response, which was measured as the time animals spent executing facial grooming on the first 3 min (phase I) and from 12 to 30 min after the injection (phase II). The systemic pretreatment of rats with SR140333B (3 mg/Kg) reduced by about 50% both the first and the second phases of nociception induced by formalin, but it did not influence the grooming behavior time of animals that received a local (i.e. upper lip) injection of vehicle (FIGURE 3).

As illustrated in figure 4, carrageenan (50 µg/50 µL) injection into the upper lip induced heat and cold hyperalgesia, which were statistically significant

at the third and fourth hours after its injection. Pre-treatment with SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) completely prevented carrageenan-induced heat hyperalgesia (FIGURE 4A), but failed to significantly decrease carrageenan-induced cold hyperalgesia (FIGURE 4B).

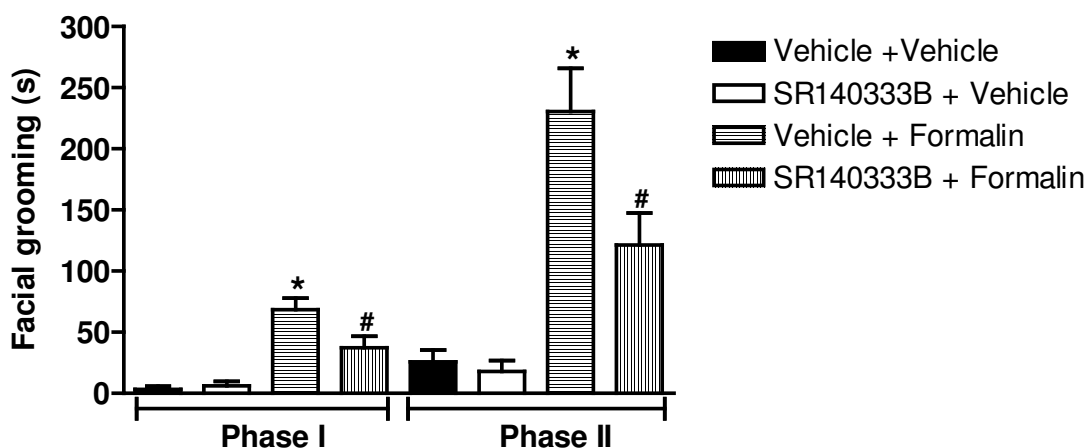


FIGURE 3 - EFFECT OF THE NK₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON FORMALIN-INDUCED NOCICEPTION. Animals were treated systemically with the NK₁ receptor antagonist SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) 30 min prior a subcutaneous injection of formalin (2.5%, 50 μ L) or vehicle into upper lip and the facial grooming time was registered in 3 min-intervals up to 30 min after formalin injection. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 7 - 10 animals. Asterisks and Fences denote $P < 0.05$ when compared to vehicle + vehicle and vehicle + formalin group, respectively (one-way ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test).

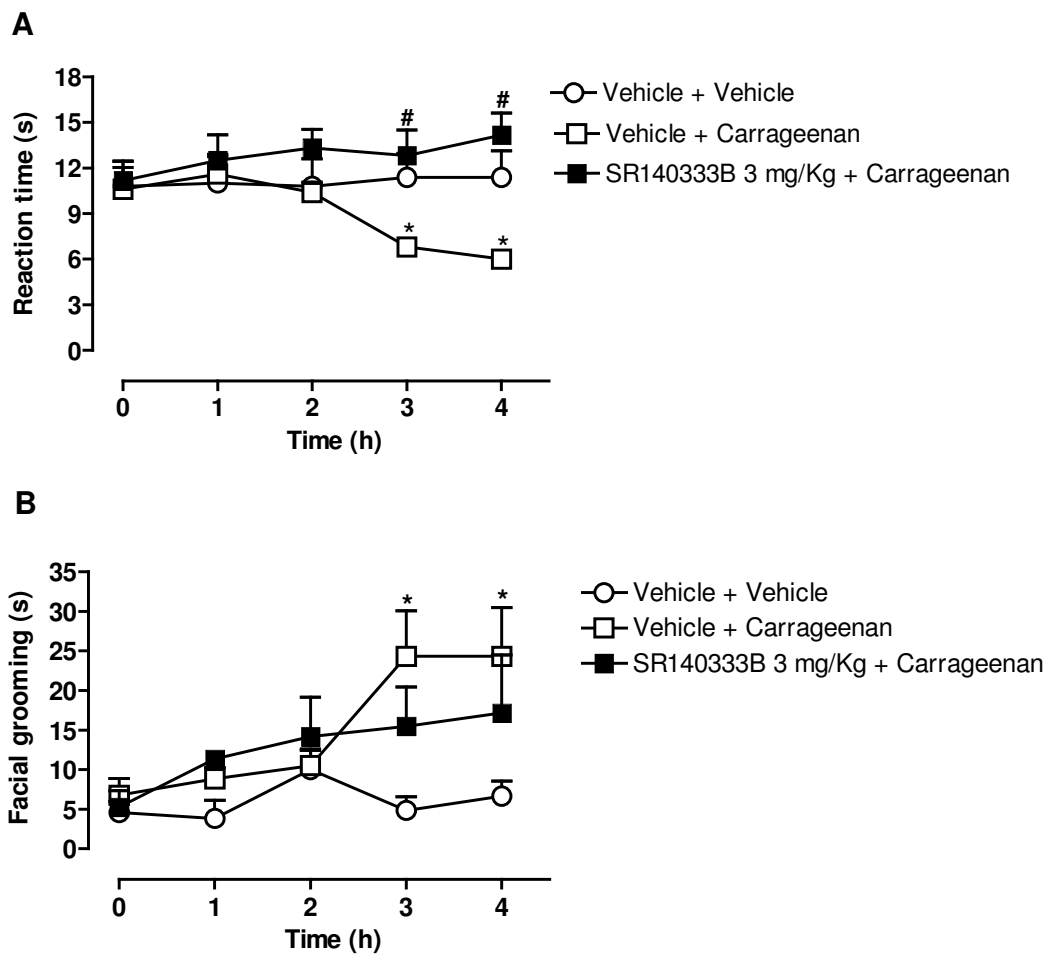


FIGURE 4 - EFFECT OF THE NK₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON CARRAGEENAN-INDUCED THERMAL HYPERALGESIA. Animals were treated systemically with the NK₁ receptor antagonist SR140333 (3 mg/Kg, i.p.) 30 min prior a subcutaneous injection of carrageenan (50 µg/50 µL) or vehicle into the upper lip and the reaction time to a radiant heat stimulus applied to the face (panel A) or the grooming behavior after the application of a cold stimulus (panel B), was assessed at 1h-intervals up to 4 h. Each point represents mean ± S.E.M. of 5 - 7 animals. Asterisks and Fences denote $P < 0.05$ when compared with the vehicle + vehicle and vehicle + carrageenan group, respectively (two-way repeated measures ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test).

3.3 Influence of NK₁ receptors blockade on thermal and mechanical hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction

On day 4 after CION surgery (peak of thermal hyperalgesia, Chichorro et al, 2006a, 2009), treatment of animals with SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) reversed the heat hyperalgesia from the first up to the sixth hour after the treatment (FIGURE 5A). It is important to point out that sham animals treated with SR140333B (3 mg/kg, i.p.) showed the same profile of sham animals treated with vehicle (data not shown). On the other hand, CION-induced cold hyperalgesia, also assessed on day 4 after surgery, was not affected by prior treatment with SR140333B injected systemically at the same dose (FIGURE 5B). As reported before (Chichorro et al., 2006b), the mechanical hyperalgesia has a different time course compared to thermal hyperalgesia, with a late start and a longer duration. In the present study, we verified a significant decrease in the mechanical threshold of CION- compared to sham-operated animals on day 8 after surgery (data not shown). On day 16 after CION, when the mechanical hyperalgesia was well established, the systemic treatment with SR140333B (3 mg/Kg, i.p.) also failed to modify the mechanical threshold of nerve-injured rats (FIGURE 5C).

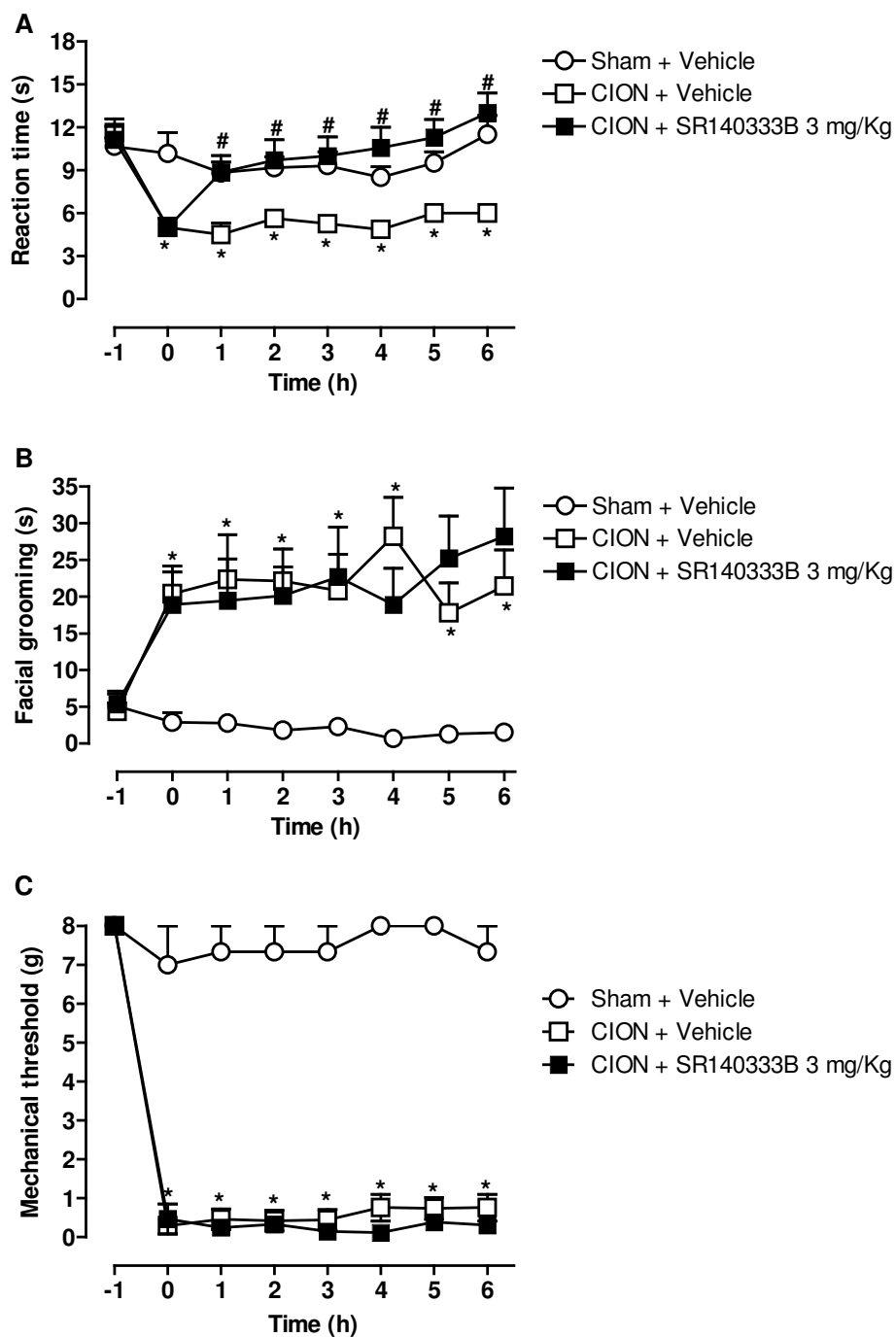


FIGURE 5 - EFFECT OF THE NK₁ RECEPTOR ANTAGONIST ON THE THERMAL AND MECHANICAL THRESHOLD OF RATS SUBMITTED TO INFRAORBITAL NERVE CONSTRICTION. The basal responsiveness of rats to thermal and mechanical stimulation was assessed before sham or CION surgery (-1) and on day 4 after the surgery, but before the treatments (O). On day 4 after the surgery, sham-operated rats received vehicle and nerve-injured rats were treated with vehicle or SR140333 (3 mg/Kg, i.p.) and the reaction time to a radiant heat stimulus (panel A) or the facial grooming time after application of a cold stimulus (panel B) in the orofacial region was assessed at 1h-intervals up to 6 h. On panel C, on day 16 after the surgery, the groups were treated as describe above and the mechanical threshold was evaluated at 1h-intervals up to 6 h. Each point represents \pm S.E.M. of 5 - 9 animals. Asterisks and Fences denote $P < 0.05$ when compared to sham + vehicle and CION + vehicle group, respectively (two-way repeated measures ANOVA followed by the Duncan's post-hoc test).

3.4 Changes in NK₁ receptors expression in the trigeminal ganglia after carrageenan injection or infraorbital nerve injury

Western blot analysis of all groups revealed an approximately 53 kDa band corresponding to the full-length NK₁ receptor protein. The results obtained showed that carrageenan injection into the upper lip, as well as constriction of the infraorbital nerve did not change NK₁ protein expression compared to the corresponding control groups on the membrane of trigeminal cells (data not shown). However, expression of NK₁ receptors in the cytosol was significantly increased on the carrageenan group compared to its control (trigeminal ganglia of rats that received a saline injection into the upper lip). Interestingly, the expression of NK₁ receptors was significantly reduced on the ganglia contralateral to carrageenan injection (FIGURE 6A). In contrast, NK₁ receptors expression was significantly augmented on both, the ipsilateral and contralateral ganglia of the CION group, compared to ganglia of sham animals (FIGURE 6B). There was no difference in NK₁ expression of ipsilateral and contralateral ganglia of sham-operated animals, as the right or left ganglia of naïve animals (data not shown). It is also important to mention that thermal hyperalgesia was assessed in animals before the removal of the ganglia, and they presented significant thermal hyperalgesia 4 h after carrageenan injection or 4 days after the CION surgery compared to their corresponding controls (data not shown).

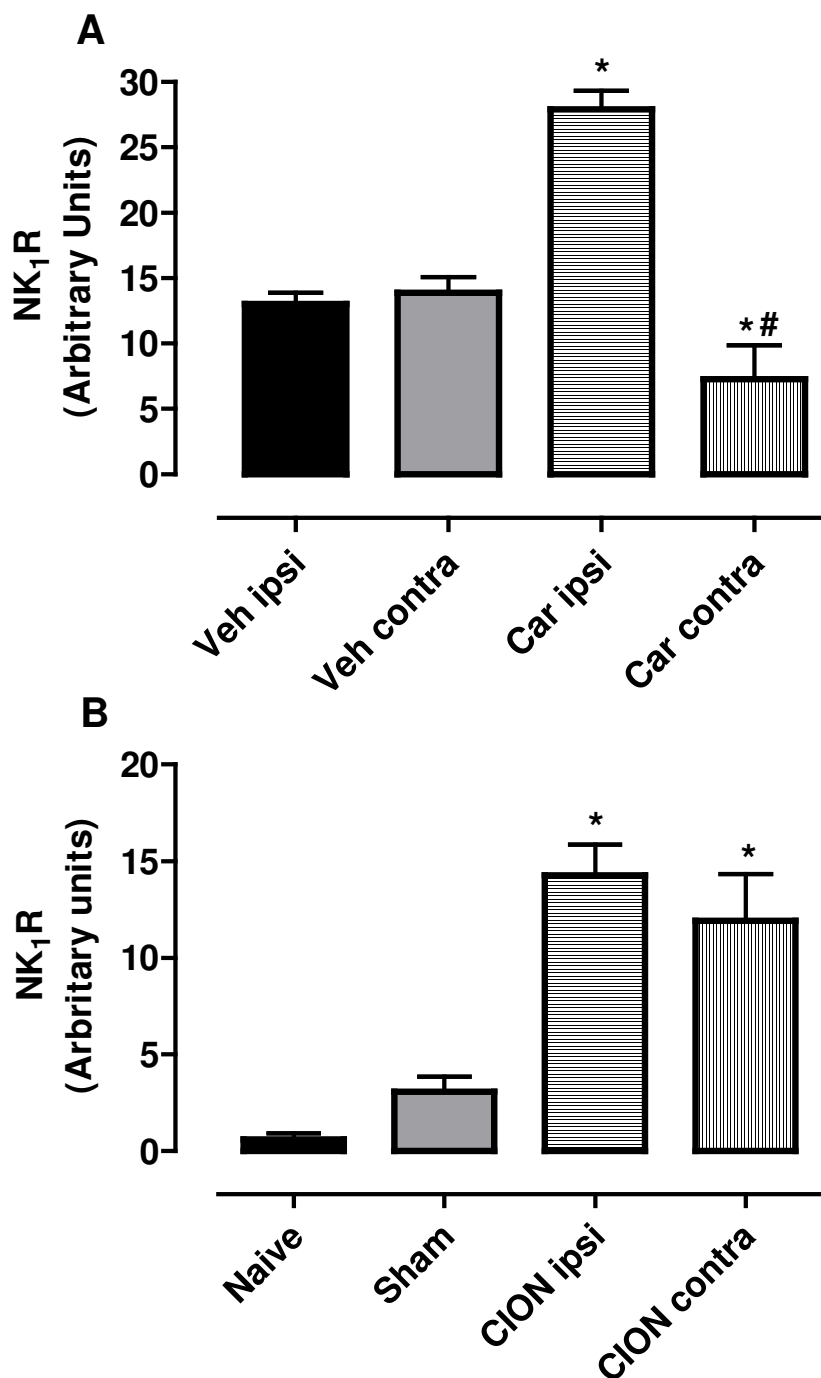


FIGURE 6 - CHANGES ON NK₁ RECEPTOR EXPRESSION ON THE CYTOSOL OF TRIGEMINAL GANGLIA CELLS. Western blot analysis of NK₁ receptor expression in the cytosol of trigeminal ganglia cells of rats collected 4 h after carrageenan (50 µg/50 µL) or vehicle (saline) injection into the upper lip (panel A) or on day 4 after sham or nerve constriction surgery (panel B). Each group represents the mean ± SEM 3 - 5 animals and values are expressed in arbitrary units. Asterisks denote $P < 0.05$ when compared to vehicle-injected rats (panel A) and sham-operated rats (panel B). Fence denote $P < 0.05$ when compared to carrageenan-ipsilateral group (one-way ANOVA followed by by the Duncan's post-hoc test).

4. Discussion

Substance P and NK₁ receptors are widely distributed in central and peripheral nervous system structures, such as dorsal horn terminals, dorsal root and trigeminal ganglia cell bodies of unmyelinated and small myelinated neurons, a fact that supports the involvement of this neuropeptide and NK₁ receptors in nociceptive process (Coste et al., 2008; Gaspersic et al., 2006; 2008; Harrison, Geppetti, 2001; Hökfelt et al., 1975, 1976; O'Connor et al., 2004). Numerous noxious stimuli cause release of SP in dorsal horn neurons, as well as increase its expression in trigeminal ganglion neurons (Gaspersic et al., 2008; Piercey et al., 1980). Moreover, previous studies have associated high expression of SP in spinal and trigeminal neurons with an increase of nociceptive behaviors or pain (Awawdeh et al., 2002; Brand et al., 2010; Budai, Larson, 1995; Rodd, Boissonade, 2000).

In the present study, administration of SP did not evoke nociceptive behavior on the orofacial region. As SP is degraded by angiotensin converting enzyme (ACE), a strategy used in our study was to pre-treat the animals with the ACE inhibitor captopril, as previously proposed by Corrêa and Calixto, 1993. However, rats that received systemic captopril before local SP also did not exhibit augmented facial grooming behavior (Figure 1). In agreement with our data, intraplantar injection of SP (2 µg/paw) in rats did not evoke paw lifting or licking, different from that observed with the injection of prostaglandin E₂, bradykinin and 5-hydroxytryptamine (Hong, Abbot, 1994). Several possibilities could explain the lack of nociceptive responses after peripheral SP injection. One possibility is that SP is neither necessary nor sufficient to activate the

peripheral nociceptive fiber terminal.

On the other hand, SP is widely considered a neuromodulator that alters the excitability of dorsal horn nociceptive neurons. Indeed, it is well established that intrathecal administration of SP induces thermal hyperalgesia (Endo et al., 2006; Frenk et al., 1988; Hua et al., 1999; Malmberg, Yaksh, 1992; Nakayama et al., 2010), and pretreatment with antagonists of NK₁ receptors attenuates SP-induced thermal hyperalgesia (Hua et al., 1999; Malmberg, Yaksh, 1992; Yoshioka et al., 2006). These findings indicate that the binding of SP to the NK₁ receptor leads to the induction of thermal hyperalgesia, which is due to the enhanced responsiveness of spinal neurons.

However, there are also a number of reports showing that peripheral application of SP sensitize primary afferents in both normal and inflamed tissues (Carlton et al., 1996; Heppelmann, Pawlak, 1997; Kessler et al., 1992; Nakamura-Craig, Gill, 1991). Additionally, Carlton and colleagues (1996) also demonstrated that over 32% of the unmyelinated axons in the glabrous skin of the rat hind paw express NK₁ receptors. Thus, in line with these observations, in the present study it was demonstrated that peripherally injected SP was able to induce orofacial heat hyperalgesia, which was attenuated by pharmacological NK₁ receptors blockade with SR140333B, a highly selective and functional antagonist for the rat NK₁ receptor, which does not cross the blood-brain barrier (Emonds-Alt et al., 1993, Rupniak et al., 2003). In agreement with our data, Chen and collaborators (2006) have shown that peripheral injection of an NK₁ receptor agonist induced thermal hyperalgesia evaluated at the rats' hind paw, which was blocked by co-injection of a NK₁ receptor antagonist. Thus, it can be suggested that SP can act via peripheral NK₁ receptors to induce hyperalgesia.

Reinforcing our data in the orofacial region, it has been demonstrated that SP and NK₁ receptors are expressed by peripheral trigeminal structures, such as the dental pulp, and elevated levels of SP have been reported in pulpitis (Bowles et al., 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006) and correlate with pain experience and caries progression (Awawdeh et al., 2002; Rodd, Boissonade, 2000). Moreover, stimulation of peripheral afferent fibers resulted in release of SP within the trigeminal ganglia and this release is greatly increased after orofacial inflammation (Neubert et al., 2000).

It has been proposed that heat hyperalgesia induced by SP, acting through NK₁ receptors, involves an interaction with the transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1). This receptor is specifically expressed in C-fiber nociceptors and responds to capsaicin, noxious heat, protons, and various endogenous ligands (Nagy et al., 2004). Also, NK₁ receptors are highly co-localized with TRPV1 in primary afferent neurons (Zhang et al., 2007). Thus, peripheral NK₁ activation seems to result in heat hyperalgesia by activation of PKC (protein kinase C), which mediates the potentiation of TRPV1 receptors (Zhang et al., 2007). Considering that this mechanism was described in dorsal root ganglia neurons, additional studies are necessary to verify if it also occurs in the trigeminal neurons.

Interestingly, we have shown that SP induced thermal hyperalgesia *per se*, and also participates via NK₁ receptors activation of the thermal hyperalgesia in orofacial inflammatory and neuropathic conditions. Corroborating our results, it has been reported that intraplantar injection of carrageenan induced heat hyperalgesia in the rat hind paw, which was markedly attenuated by intrathecal injection of different NK₁ receptor

antagonists (Gao et al., 2003; Traub, 1996). However, contrasting our data, SP has been reported to not contribute to heat hyperalgesia associated with injury to spinal nerves (Mansikka et al., 2000).

In sharp contrast, the blockade of NK₁ receptors did not influence cold hyperalgesia induced by carrageenan, and SP was not able to induce orofacial cold hyperalgesia when injected into the upper lip. Moreover, cold hyperalgesia induced by infraorbital nerve injury was not affected by NK₁ receptors blockade.

In addition, in the present study, SP failed to induce orofacial mechanical hyperalgesia, as well as, blockade of NK₁ receptors did not influence the mechanical hyperalgesia associated with CION. Our data contrasts the results of studies in spinal nerves, first because SP injected into the rats' hind paw was able to induce mechanical hyperalgesia (Carlton et al., 1996; Sahbaie et al., 2009) and second because cold hyperalgesia induced by constriction of the sciatic nerve was attenuated by a non peptide NK₁ receptor antagonist (Cahil,Coderre, 2002). In addition, mechanical hyperalgesia induced by L5 and/or L6 spinal nerve injury was also significantly reduced by pharmacological NK₁ receptors blockade at the peripheral or at the spinal level, as demonstrated by Jang et al. (2004) and Lee and Kim (2007).

Altogether, our data suggest that SP, acting through activation of peripheral NK₁ receptors, is important mediator of heat, but not cold or mechanical, hyperalgesia in the trigeminal system

In the current study, we have also assessed the influence of NK₁ receptors blockade in the orofacial formalin test. The formalin test is a model of persistent pain that involves elements of peripheral and central sensitization and ongoing afferent activity (Tjolsen et al., 1992). The orofacial formalin test is

a commonly used experimental animal model of persistent inflammatory pain in the trigeminal system. When formalin is injected into the rats' upper lip, it can be seen the typical biphasic time course of the response to formalin, with an early and short-lasting first phase followed, after a quiescent period, by a second, prolonged (tonic) phase. Several pro-inflammatory and algogenic mediators have been described to participate of formalin-induced nociception (Chichorro et al., 2004), including SP (Lu et al., 2009). Lu and colleagues (2009) demonstrated that 2 hours after orofacial formalin injection there was a significant increase in the expression of SP in the trigeminal spinal nucleus and distal cerebrospinal fluid-contacting neurons. In line with this observation, we have shown that pre-treatment with a NK₁ receptor antagonist caused a marked reduction on both phases of formalin-induced orofacial nociception. This finding is in agreement with studies that employed the formalin test in the rats' paw, which have shown that pharmacological blockade of NK₁ receptors reduced the first or both phases of nociception evoked by formalin (Birch et al., 1992; Traub, 1996). Furthermore, there are several evidences that injection of formalin in the paw leads to an increase of SP levels in the dorsal horn, probably, as the result of an increased biosynthesis, transport and release of this peptide in primary afferents and spinal neurons in response to long-lasting inflow of noxious messages (Kantner et al., 1986; Zhang et al., 1994). Altogether, these results reinforce the role of SP in persistent pain and central sensitization.

Finally, in our study, we have examined the expression of NK₁ receptors in the membrane, as well as in the cytosol of trigeminal ganglia neurons, since there are several reports showing that changes in NK₁ receptors expression are associated with numerous pathological processes (Bradesi et al. 2006; Muñoz

et al., 2005; Roche et al., 2012). We have found an increased expression of NK₁ receptors at the cytosol, but not at the membrane, of the trigeminal ganglia of rats submitted to upper lip carrageenan injection or infraorbital nerve injury. Increase in NK₁ receptor-immunoreactivity has been also reported after spinal nerve injury (Abbadie et al., 1996; Malmberg, Basbaum, 1998; Taylor, McCarson, 2004) as well as in the spinal trigeminal nucleus after partial infraorbital ligation in mice (Xu et al., 2008).

In our study, the augmented expression of NK₁ receptors restricted to the cytosol suggests their internalization, a process that has been extensively demonstrated and has been used to assess activation of NK₁ receptors after noxious stimulation (Marvizón et al., 2003; Wang, Marvizón, 2002). Internalization of NK₁ receptors seems to be a very fast process, being completed in few minutes after the ligation of the agonist (Wang, Marvizón, 2002) or induced by noxious stimulation, such as capsaicin or tissue injury (Hua et al 2005; Marvizón et al., 2003). Thus, we can suggest that orofacial carrageenan injection or constriction of the infraorbital nerve results in SP release, which activates and causes the internalization of NK₁ receptors, as well as participates in the thermal hyperalgesia associated with both conditions. Interestingly, we did not observe decrease of NK₁ receptors expression in the plasma membrane simultaneously to their increased expression in the cytosol, possibly because of the different rates of internalization and recycling of NK₁ receptors (Hökfelt et al., 2001, Wang, Marvizón, 2002). Although the internalization process is very fast, the return of the receptor to the plasma membrane usually takes long and depends of several factors, such as the cell type and the sensory stimulus (Honoré et al., 1999). In fact, it has been

demonstrated that both capsaicin and formalin injection into the rat hind paw induces a rapid, marked NK₁ internalization in spinal cord neurons, which is largely resolved 60 min after capsaicin injection, but remains significant 60 min after formalin injection, suggesting that there is an ongoing release of SP (Honoré et al., 1999; Mantyh et al., 1995). In this latter study, it was also reported that, 3 h after carrageenan injection, mechanical stimulation of the rat hind paw induced massive NK₁ receptor internalization in spinal neurons, what is in line with our data (Honoré et al., 1999).

In summary, altogether our results demonstrate that the SP/NK₁ system participates in the heat hyperalgesia associated with inflammation or nerve injury and in the persistent pain evoked by formalin. Thus, it can be suggested that SP represents an important mediator of the trigeminal nociceptive process.

Highlights

- a) SP was able to induce heat, but not cold or mechanical orofacial hyperalgesia.
- b) NK₁ receptor blockade attenuated inflammatory and neuropathic heat hyperalgesia.
- c) NK₁ receptor blockade markedly reduced both phases of formalin-induced response.
- d) Heat hyperalgesia is correlated to NK₁ receptor internalization in the trigeminal ganglia.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação Araucária. F.C.T and M.F.T.J were recipients of a CAPES/PROF and UFPR/TN scholarships, respectively. We gratefully acknowledge to Sanofi-Aventis for the donation of SR140333B.

References

- Abbadie, C., Brown, J. L., Mantyh, P. W., Basbaum, A. I., 1996. Spinal cord substance p receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neuroscience*, 70, 201-209.
- Abbadie, C., Trafton, J., Liu, H., Mantyh, P. W., Basbaum, A. I., 1997. Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *The Journal of Neuroscience*, 17, 8049-8060.
- Awawdeh, L., Lundy, F. T., Shaw, C., Lamey, P. J., Linden, G. J., Kennedy, J. G., 2002. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *Int. Endod. Journal*, 35, 30–6.
- Birch, P. J., Harrison, S. M., Hayes, A. G., Rogers, H., Tyers, M. B., 1992. The non-peptide NK1 receptor antagonist, (+/-)-CP-96,345, produces antinociceptive and anti-oedema effects in the rat. *Br J Pharmacol.*, 105, 508-510.
- Bowles, W. R., Withrow, J. C., Lepinski, A. M., Hargreaves, K. M., 2003. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J. Endod.*, 29, 265-267.
- Bradesi, S., Kokkotou, E., Simeonidis, S., Patierno, S., Ennes, H. S., Mittal, Y., McRoberts, J. A., Ohning, G., Mclean, P., Marvizón, J. C. G., Sternini, C., Pothoulakis, C., Mayer, E. A., 2006. The role of neurokinin 1 receptors in the maintenance of visceral hyperalgesia induced by repeated stress in rats. *Gastroenterology*, 130, 1729-1742.
- Brand, A., Smith, E. St. J., Lewin, G. R., Park, T. J., 2010. Functional neurokinin and NMDA receptor activity in an animal naturally lacking substance P: the naked mole-rat. *PLoS ONE*, 5, 1-7.
- Budai, B., Larson, A. A., 1996. Role of substance P in the modulation of C-fiber-evoked responses of spinal dorsal horn neurons. *Brain Research*, 710, 197-203.
- Cahill, C. M.,Coderre, T. J., 2002. Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain*, 95, 277-285.
- Carlton, S. M., Zhou, S., Coggeshall, R. E., 1996. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. *Brain Research*, 734, 103 – 108.
- Caviedes-Bucheli, J., Azuero-Holguin, M. M., Muñoz, H. R., 2005. The effect of capsaicin on substance P expression in pulp tissue inflammation. *Int. Endod. Journal*, 38, 30–5.

Caviedes-Bucheli, J., Lombana, N., Azuero-Holguín, M. M., Muñoz, H. R., 2006. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int. Endod. J.*, 39, 394-400.

Chen, W. L., Zhang, Y. Q., Zhao, Z. Q., 2006. Neurokinin-1 receptor in peripheral nerve terminals mediates thermal hyperalgesia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 132–136.

Chichorro, J. G.; Lorenzetti, B. B.; Zampronio, A. R., 2004. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol.*, 14,1175–84.

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

Chichorro, J. G., Zampronio, A. R., Rae G. A., 2006b. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic. *Exp. Biol. Med.*, 23, 1136-1140.

Chichorro, J. G., Zampronio, A. R., Cabrini, D. A., Franco, C. R., Rae, G. A., 2009. Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. *Neuropeptides*, 43, 133-42.

Clavelou, P., Pajot, J., Dallel, R., Raboisson, P., 1989. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett.*, 103, 349-353.

Corrêa, C. R., Calixto, J. B., 1993. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 110, 193-198.

Coste, J., Voisin, D. L., Miraucourt, L. S., Dallel, R., Luccarini, P., 2008. Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain*, 137, 340-351.

Denadai-Souza, A., Camargo, L. L., Ribela, M. T. C. P., Keeble, J. E., Costa, S. K. P., Muscará, M. N., 2009. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur. J. of Pain*, 13, 812-819.

Emonds-Alt, X., Doutremepuich, J.D., Heaulme, M., Neliat, G., Santucci, V., Steinberg, R., Vilain, P., Bichon, D., Ducoux, J.P, Proietto, V., Van Broeck, D., Soubrié, P., Le Fur, G., Brelière, J.C., 1993. In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 250, 403–413.

Eide, P. K., Rabben, T., 1998. Trigeminal neuropathic pain: pathophysiological mechanisms examined by quantitative assessment of abnormal pain and sensory perception. *Neurosurgery*, 43, 1103-1110.

Endo, D., Ikeda, T., Ishida, Y., Yoshioka, D., Nishimori, T., 2006. Effect of intrathecal administration of hemokinin-1 on the withdrawal response to noxious thermal stimulation of the rat hind paw. *Neuroscience Letters*, 392, 114-117.

Frenk, H., Bossut, D., Urca, G., Mayer, D. J., 1988. Is substance P a primary afferent neurotransmitter for nociceptive input? Analysis of pain-related behaviors resulting from intrathecal administration of substance P and 6 excitatory compounds. *Brain Res.*, 455, 223-231.

Gao, Y. J., Zhang, Y. Q., Zhao, Z. Q., 2003. Involvement of spinal neurokinin-1 receptors in the maintenance but not induction of carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Brain Research Bull.*, 61, 587-561.

Gaspersic, R., Kovacic, U., Cor, A., Skaleric, U., 2006. Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat gingivomucosal tissue. *Archives of Oral Biology*, 51, 703-709.

Gaspersic, R., Kovacic, U., Cor, A., Skaleric, U., 2008. Unilateral ligature-induced periodontitis influences the expression of neuropeptides in the ipsilateral and contralateral trigeminal ganglion in rats. *Archives of Oral Biology*, 53, 659-665.

Gonzalez, M. I., Field, M. J., Holloman, E. F., Hughes, J., Oles, R. J., Singh, L., 1998. Evaluation of PD 154075, a tachykinin NK1 receptor antagonist, in a rat model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 344, 115-120.

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

Harrison, S., Geppetti, P., 2001. Substance P. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 555-576.

Heppelmann, B., Pawlak, M., 1997. Sensitisation of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. *Neuroscience Letters*, 223, 97-100.

Hökfelt, T., Kellerth, J. O., Nilsson, G., Pernow, B., 1975. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Research*, 100, 235-252.

Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G., Arimura, A., 1976. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1, 131-136

Hökfelt, T., Pernow, B., Wahren, J., 2001. Substance P: a pioneer amongst

neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*, 249, 27-40.

Hong, Y., Abbott, F. V., 1994. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. *Neuroscience*, 63, 827-836.

Honoré, P., Menning, P.M., Rogers, S.C., Nichols, M.L., Basbaum, A.I., Besson, J.M., Matyh, P.W., 1999. Spinal substance p receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *The Journal of Neuroscience*, 19, 7670-7678.

Hua, X. Y., Chen, P., Marsala, M., Yaksh, T. L., 1999. Intrathecal substance P-induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E2 and amino acids. *Neuroscience*, 89, 525-534.

Hua, X. Y., Salgado, K. F., Gu, G., Fitzsimmons, B., Kondo, I., Bartfai, T., Yaksh, T. L., 2005. Mechanisms of antinociception of spinal galanin: how does galanin inhibit spinal sensitization? *Neuropeptides*, 39, 211-216.

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

Jang, J. H., Nam, T. S., Paik, K. S., Leem, J. W., 2004. Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neuroscience Letters*, 360, 129-132.

Kantner, R. M., Goldstein, B. D., Kirby, M. L., 1986. Regulatory mechanisms for substance P in the dorsal horn during a nociceptive stimulus: axoplasmic transport vs electrical activity. *Brain Res.*, 385, 282-290.

Kessler, W., Kirchhoff, C., Reeh, P. W., Handwerker, H. O., 1992. Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. *Exp. Brain Res.*, 91, 467-476.

LaGraize, S. C., Guo, W., Yang, K., Wei, F., Ren, K., Dubner, R., 2010. Spinal cord mechanisms mediating behavioral hyperalgesia induced by neurokinin-1 tachykinin receptor activation in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 171, 1341-1356.

Lee, S. E., Kim, J. H., 2007. Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neuroscience Res.*, 58, 245-249.

LeResche, L., 1997. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit. Ver. Oral Biol. Med.*, 8, 291-305

Lipton, J. A., Ship, J. A., Larach-Robinson, D., 1993. Estimated prevalence and distribution of reported orofacial pain in the United States. *J. Am. Dent. Assoc.* 124, 115-21.

- Lu, X., Geng, X., Zhang, L., Zeng, Y., Dong, H., Yu, H., 2009. Substance P expression in the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons and spinal trigeminal nucleus in formalin-induced the orofacial inflammatory pain in rats. *Brain Res. Bull.*, 78, 139-144.
- Malmberg, A. B., Yaksh, T. L., 1992. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*, 257, 1276-1279.
- Malmberg, A. B., Basbaum, A. I., 1998. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*, 76, 215-222.
- Mansikka, H., Sheth, R. N., DeVries, C., Lee, H., Winchurch, R., Raja, S. N., 2000. Nerve injury-induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin-1 receptor knockout mice. *Exp. Neurol.*, 162, 343-349.
- Mantyh, P. W., DeMaster, E., Malhotra, A., Ghilardi, J.R., Rogers, S.D., Mantyh, C.R., Liu, H., Basbaum, A.I., Vigna, S.R., Maggio, J.E., Simone, D.A., 1995. Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*, 268, 1629-1632.
- Marvizón, J. C. G., Wang, X., Matsuka, Y., Neubert, J. K., Spigelman, I., 2003. Relationship between capsaicin-evoked substance P release and neurokinin 1 receptor internalization in the rat spinal cord. *Neuroscience*, 118, 535-545.
- Muñoz, M., Rosso, M., Pérez, A., Coveñas, R., Rosso, R., Zamarrigo, C., Piruat, J. I., 2005. The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides*, 39, 427-432.
- Nagy, I., Santha P., Jancso, G., Urban, L., 2004. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol.*, 500, 351–369.
- Nakamura-Craig, M., Smith, T. W., 1989. Substance P and peripheral inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 38, 91-98.
- Nakayama, T., Naono, R., Ikeda, T., Nishimori, T., 2010. NMDA and AMPA receptors contribute to the maintenance of substance P-induced thermal hyperalgesia. *Neuroscience Research*, 67, 18-24.
- Neubert, J. K., Maidment, N. T., Matsuka, Y., Adelson, D. W., Kruger, L., Spigelman, I., 2000. Inflammation-induced changes in primary afferent-evoked release of substance P within trigeminal ganglia in vivo. *Brain Res.*, 871, 181-191.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., Shanahan, F., 2004. The Role of Substance P in Inflammatory Disease. *Journal*

of Cellular Physiology, 201, 167-180.

Piercey, M. F., Einspahr, E. J., Dobry, P. J. K., Schroeder, L. A., Hollister, R. P., 1980. Morphine does not antagonize the substance P mediated excitation of dorsal horn neurons, *Brain Research*, 186, 421-434.

Post, C., Butterworth, J. F., Strichartz, G. R., Karlsson, J. A., Persson, C. G., 1985. Tachykinin antagonists have potent local anaesthetic actions. *Eur. J. Pharmacol.*, 117, 347-354.

Reis, R. C., Brito, H. O., Fraga, D., Cabrini, D. A., Zampronio, A. R., 2011. Central substance P NK1 receptors are involved in fever induced by LPS but not by IL-1 β and CCL3/MIP-1 α in rats. *Brain Research*, 1384, 161-169.

Roche, M., Kerr, D. M., Hunt, S. P., Kelly, J. P., 2012. Neurokinin-1 receptor deletion modulates behavioural and neurochemical alterations in an animal model of depression. *Behavioural Brain Research*, 228, 91-98.

Rodd, H. D., Boissonade, F. M., 2000. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience. *Eur. J. Oral Sci.*, 108: 467-474.

Rupniak, N. M., Carlson, E.J., Shephard, S., Bentley, G., Williams, A. R., Hill, A., Swain, C., Mills, S. G., Di Salvo, J., Kilburn, R., Cascieri, M. A., Kurtz, M. M., Tsao, K. L., Gould, S. L., Chicchi, G. G., 2003. Comparison of the functional blockade of rat substance P (NK1) receptors by GR205171, RP67580, SR140333, and NKP-608. *Neuropharmacology*, 45, 231-241

Sahbaie, P., Shi, X., Guo, T. Z., Qiao, Y., Yeomans, D. C., Kingery, W. S., Clark, J. D., 2009. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. *Pain*, 145, 341-349.

Sammons, M. J., Raval, P., Davey, P. T., Rogers, D., Parsons, A. A., Bingham, S., 2000. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Research*, 876, 48-54.

Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T., Kawada, T., 2012. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept Lett.*, Epub ahead of print.

Sattari, M., Mozayeni, M. A., Matloob, A., Mozayeni, M., Javaheri, H. H., 2010. Substance P and CGRP expression in dental pulps with irreversible pulpitis. *Australian Endodontic Journal*, 36, 59-63.

Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S., 2005. Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats. *Pain*, 116, 375-385.

Takemura, M., Sugiyo, S., Moritani, M., Kobayashi, M., Yonehara, N., 2006.

Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch. Histol. Cytol.*, 69, 79-100.

Tjolsen, A., Berge, O. G., Hunskar, S., Rosland, J. H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51, 5-17.

Taylor, B. K., McCarron, K. E., 2004. Neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse dorsalhorn increases with neuropathic pain. *J. Pain*, 5, 71-76.

Traub, R. J., 1996. The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. *Pain*, 67, 151-161.

Vos, B. P., Maciewicz, R. J., 1991. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: An animal model of trigeminal neuropathic pain, in: Besson, J. M., Guilbaud, G. (Eds.), *Lesions of Primary Afferent Fibers as a Tool for the Study of Clinical Pain*, Amsterdam, pp. 147–158.

Vos, B. P.; Strassman, A. M.; Maciewicz, R. J., 1994. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's Infraorbital nerve. *The Journal of Neuroscience*, 74, 2708-2723.

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

Wajima, Z., Hua, X. Y., Yaksh, T. L., 2000. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Research*, 877, 314-321.

Wang, X., Marvizón, J. C. G., 2002. Time-course of the internalization and recycling of neurokinin 1 receptors in rat dorsal horn neurons. *Brain Res.*, 944, 239-247.

Yoshioka, D., Takebuchi, F., Nishimori, T., Naono, R., Ikeda, T., Nakayama, T., 2006. Intrathecal administration of the common carboxyl-terminal decapeptide in endokinin A and endokinin B evokes scratching behavior and thermal hyperalgesia in the rat. *Neuroscience Letters*, 410, 193-197.

Zhang, R. X., Mi, Z. P., Qiao, J. T., 1994. Changes of spinal substance P, calcitonin gene-related peptide, somatostatin, Met-enkephalin and neurotensin in rats in response to formalin-induced pain. *Regul. Pept.*, 51, 25-32.

Zhang, H., Cang, C. L., Kawasaki, Y., Liang, L. L., Zhang, Y. Q., Ji, R. R., Zhao, Z., 2007. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKC ϵ : a novel pathway for heat hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*, 27, 12067–12077.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109–10.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A substância P e o receptor NK₁ estão amplamente distribuídos nas estruturas do sistema nervoso central e periférico, incluindo gânglio da raiz dorsal, gânglio do trigêmeo e neurônios sensoriais primários, fato que sugere a participação desse neuropeptídeo e de seu receptor no processo nociceptivo (para revisão ver HARRISON; GEPPEI, 2001). Além disso, estudos anteriores têm associado níveis elevados de SP e expressão aumentada ou internalização de receptores NK₁ em neurônios espinhais com o aumento de comportamentos nociceptivos (BUDAI, LARSON, 1995; ABBADIE *et al.*, 1997; BRAND *et al.* 2010).

Nesse estudo, a administração de SP não evocou comportamentos nociceptivos, mesmo em animais pré-tratados com o inibidor da ECA, captopril. Uma possibilidade para este achado é que a SP não seja um estímulo suficiente para ativar as fibras nociceptivas, visto que diversos estudos têm relatado que as ações da SP somente são observadas, ou ainda exacerbadas, na presença de um processo inflamatório (ABBADIE *et al.*, 1997, KEBLEE *et al.*, 2005).

Por outro lado, nossos dados mostram que a injeção de SP no lábio superior dos animais resulta em hiperalgesia térmica ao calor, corroborando vários estudos envolvendo a ativação de nervos espinhais (HUNT; MANTYH, 2001; YOSHIOKA *et al.*, 2006; HAMITY *et al.*, 2010). Uma das possibilidades para a indução da hiperalgesia ao calor pela SP é a sensibilização de receptores TRPV1 (ZHANG *et al.*, 2007). Em adição, demonstramos que a hiperalgesia ao calor induzida por SP foi significativamente reduzida por um antagonista seletivo de receptores NK₁, corroborando estudos anteriores (MALMBERG, YAKSH, 1992; CHEN *et al.*, 2006; YOSHIOKA *et al.*, 2006). Entretanto, a SP em nenhuma das doses testadas evocou hiperalgesia ao frio ou mecânica na região orofacial dos animais. Esse último dado contrasta com estudos anteriores que mostram que a administração local de SP reduz o limiar de retirada da pata de ratos mediante aplicação do estímulo mecânico (CARLTON *et al.*, 1996; SAHBAIE *et al.*, 2009).

Além de induzir hiperalgesia ao calor, a SP também parece ter

importante participação na hiperalgia térmica induzida pela carragenina, visto que o bloqueio farmacológico dos receptores NK₁ resultou na reversão desse efeito. Esse dado corrobora aos resultados obtidos por Traub (1996), em que demonstrou que o tratamento prévio com um antagonista NK₁ reduziu de forma dose-dependente a hiperalgia ao calor evocada por carragenina, administrada na pata de animais. Porém, em nosso estudo, o antagonista de receptores NK₁ (SR140333B), administrado sistemicamente nos animais, não modificou a hiperalgia ao frio induzida por carragenina na região orofacial.

Nossos resultados também mostram que o tratamento sistêmico dos animais com SR140333B reduziu ambas as fases da resposta a formalina orofacial. Esse dado alinha-se aos estudos anteriores que demonstraram, empregando o teste de formalina na pata, que o bloqueio farmacológico de receptores NK₁ leva à redução da primeira ou ambas as fases da resposta a formalina (BIRCH *et al.*, 1992; TRAUB, 1996). Além disso, existem diversas evidências de que a injeção de formalina na pata ou região orofacial leva ao aumento dos níveis de SP em diferentes populações neuronais (KANTNER *et al.*, 1986; ZHANG *et al.*, 1994; LU *et al.*, 2009). Considerados em conjunto, esses resultados sugerem a participação da SP na nocicepção persistente e sensibilização central que ocorrem no teste da formalina.

No modelo de dor neuropática orofacial observou-se que o antagonista de receptores NK₁, SR140333B, não modificou a hiperalgia ao frio ou mecânica, mas reduziu significativamente a hiperalgia ao calor. Esse resultado reforça o papel da SP na hiperalgia térmica ao calor na região orofacial, porém os mecanismos subjacentes a esse efeito ainda precisam ser investigados. Por outro lado, existem relatos de que o bloqueio de receptores NK₁ reverte a hiperalgia ao frio induzida por constrição do nervo ciático (CAHIL; CODERRE, 2002). Pode-se especular que essas discrepâncias sejam devido a diferenças na transmissão nociceptiva de nervos espinhais e do nervo trigêmeo.

Por fim, nossos dados mostram que tanto a injeção de carragenina na região orofacial quanto à constrição do nervo infraorbital induzem a internalização de receptores NK₁, indicando a ativação dos mesmos pela SP liberada endogenamente.

Em conclusão, os resultados desse estudo mostram a participação do

sistema SP/NK₁ na hiperalgesia ao calor em modelos de dor orofacial inflamatória e neuropática, bem como na nocicepção persistente induzida por formalina. Portanto, podemos sugerir que a SP representa um importante mediador da nocicepção trigeminal.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.; EGGER, T.; SCHULIGOI, R. The tachykinin NK1 receptor antagonist SR140333 prevents the increase of nerve growth factor in rat paw skin induced by substance p or neurogenic inflammation. **Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 611-615, 2000.
- APKARIAN, A. V.; BUSHNELL, M. C.; TREEDE, R. D., ZUBIETA, J. K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, v. 9, n. 4, p. 463–84, 2005.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 13, p. 267–284, 2009.
- BECKER, D. E. Pain management: part 1: managing acute and postoperative dental pain. **Anesth Prog**, v. 57, p. 67-79, 2010.
- BELLUCCI, F.; MEINI, S.; CATALIOTO, R. M.; CATALANI, C.; GIULIANI, S.; QUARTARA, L.; GIOLITTI, S.; FAIELLA, A.; ROTONDARO, L.; LUZ CANDENAS, M.; PINTO, F.; MAGGI, C.A. Pharmacological evaluation of alpha and beta human tachykinin NK2 receptor splice variants expressed in CHO cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 499, p. 229-238, 2004.
- BENEMEI, S.; NICOLETTI, P.; CAPONE, J. G.; GEPPETTI, P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 9, p. 9-14, 2009.
- BETANCUR, C.; AZZI, M.; ROSTÈNE, W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. **TiPS**, v. 18, p. 372-386, 1997.
- BOTO, G. R. Neuralgia del trigémino. **Neurocirugía**, v. 21, p. 361-372, 2010.
- CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Neurokinin mediation of edema and inflammation. **Neuropeptides**, v. 34, p. 314-322, 2000.
- CAPELLINI, V. K.; SOUZA, G. S.; FARIA, C. R. S. Massage therapy in the management of myogenic TMD: a pilot study. **J Appl Oral Sci.**, v. 14, n.1, p. 21-26, 2006.
- COSTA, S. K. P.; YSHII, L. M.; POSTON, R. N.; MUSCARÁ, M. N.; BRAIN, S. D. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF α in the cutaneous microvasculature. **Journal of Neuroimmunology**, v. 171, p. 99-109, 2006.

DALLEL R.; RABOISSON, P.; WODA, A.; SESSLE, B. J. Properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis of the rat. **Brain Research**, v. 521, p. 95-106, 1990.

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. 14-28, 2010.

DELZELL, J. E. JR.; GRELE, A.R. Trigeminal neuralgia. New treatment options for a well-known cause of facial pain. **Arch Fam Med**, v. 8, n. 3, p. 264-268, 1999.

DEVOR, M.; AMIR, R.; RAPPAPORT, Z. H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. **Clin J Pain**, v. 18, p. 4-13, 2002.

DIANZANI, C.; LOMBARDI, G.; COLLINO, M.; FERRARA, C.; CASSONE, M.C.; FANTOZZI, R. Priming effects of substance P on calcium changes evoked by interleukin-8 in human neutrophils. **J. Leukoc. Biol**, v. 69, p.1013-1018, 2001.

DIONNE, R.A.; CAMPBELL, R. A.; COOPER, S. A.; HALL, D. L.; BUCKINGHAM, B. Suppression of postoperative pain by preoperative administration of ibuprofen in comparison to placebo, acetaminophen, and acetaminophen plus codeine. **J Clin Pharmacol.**, v. 23, p. 37-43, 1983.

DIONNE, R. A. Pharmacologic treatments for temporomandibular disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 83, p. 134-142, 1997.

DOYLE, C. A.; HUNT, S. P. Substance P receptor (neurokinin-1)-expressing neurons in lamina I of the spinal cord encode for the intensity of noxious stimulation: a c-Fos study in rat. **Neuroscience**, v. 89, n. 1, p. 17-28, 1999.

DUBNER, R.; BENNET, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Ann. Rep. Neurosci**, v. 6, p. 381-418, 1983.

DWORKIN, S. F.; HUGGINS, K. H.; LERESCHE, L.; VON KORFF, M.; HOWARD, J.; TRUELOVE, E.; SOMMERS, E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. **JADA**, v. 120, n. 3, p. 273-281, 1990.

EMONDS-ALT, X.; DOUTREMEPUICH, J. D.; HEAULME, M.; NELIAT, G.; SANTUCCI, V.; STEINBERG, R.; VILAIN, P.; BICHON, D.; DUCOUX, J. P.; PROIETTO, V. In vitro and in vivo biological activities of SR 140333, a novel potent nonpeptide tachykinin NK1 receptor antagonist. **Eur J Pharmacol**, v. 250, p. 403-413, 1993.

ERJAVEC, F.; LEMBECK, F.; FLORJANG-IRMAN, T.; SKOFITSCH, G.; DONNERER, J.; SARIA, A.; HOLZER, P. Release of histamine by substance P. **Archives of Pharmacology**, v. 317, p. 67-70, 1981.

FIELDS, H. L.; ROWBOTHAM, M.; BARON, R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. **Neurobiol Dis**, v.5, p. 209-227, 1998.

FROMM, G. H.; TERRENCE, C. F.; CHATTHA, A. S. Baclofen in the treatment of trigeminal neuralgia: double-blind study and long-term follow-up. **Ann Neurol**, v. 15, p. 240-244, 1984.

FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; KONDO, E.; MIKI, K.; TACHIBANA, T.; NOGUCHI, K. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. **Pain**, v. 78, p. 13-26, 1998.

GARRET, C.; CARRUETTE, A.; FARDIN, V.; MOUSSAOUI, S.; PEYRONEL, J. F.; BLANCHARD, J. C.; LADURON, P. M. Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 10208-10212, 1991.

HAANPAA, M. L.; GOURLAY, G. K.; KENT, J. L.; MIASKOWSKI, C.; RAJA, S. N.; SCHMADER, K. E.; WELLS, C. D. Treatment considerations for patients with neuropathic pain and other medical comorbidities. **Mayo Clin Proc.**, v. 85, p. S15-S25, 2010.

HABIB, A.; GAN, T. Role of analgesic adjuncts in postoperative pain management. **Anesthesiology Clinics of North America**, v. 23, p. 85-107, 2005.

HAMITY, M. V.; WHITE, S. R.; HAMMOND, D. L. Effects of neurokinin-1 receptor agonism and antagonism in the rostral ventromedial medulla of rats with acute or persistent inflammatory nociception. **Neuroscience**, v. 165, p. 902-913, 2010.

HERSH, E. V.; BALASUBRAMANIAM, R.; PINTO, A. pharmacologic management of temporomandibular disorders. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v. 20, p. 197-210, 2008.

HERSHEY, A. D.; KRAUSE, J. E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. **Science**, v. 247, p. 958-962, 1990.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 83-91, 2001.

JENSEN, T. S.; MADSEN, C. S.; FINNERUP, N. B. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. **Curr Opin Neurol**, v. 22, p. 467-474, 2009.

KATO, M. T.; KOGAWA, E. M.; SANTOS, C. N.; CONTI, P. C. R. Tens and low-level laser therapy in the management of temporomandibular disorders. **J Appl Oral Sci.**, v. 14, n. 2, p. 130-135, 2006.

KATUSIC, S.; BEARD, C. M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L. T. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia. **Ann Neurol.**, v. 27, n. 1, p. 89-95, 1990.

KHAWAJA, A. M.; ROGERS, D. F. Tachykinins: receptor to effector. **Int J. Biochem. Cell Biol**, v. 28, n. 7, p. 721-738, 1996.

KEEBLE, J.; BLADES, M.; PITZALIS, C.; ROCHA, F. A. C.; BRAIN, S. D. The role of substance P in microvascular responses in murine joint inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 1059-1066, 2005.

KEISER, K.; HARGREAVES, K. M. Building effective strategies for the management of endodontic pain. **Endodontic Topics**, v. 3, p. 93–105, 2002.

KHALIL, Z.; HELME, R. D. Serotonin modulates substance P-induced plasma extravasation and vasodilatation in rat skin by an action through capsaicin-sensitive primary afferent nerves. **Brain Research**, v. 527, p. 292-298, 1990.

KRAFFT, R. M. Trigeminal neuralgia. **Am Fam Physician**, v. 77, n. 9, p. 1291-1296, 2008.

KRANEVELD, A. D; NIJKAMP, F. P. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. **Int Immunopharmacol**, v. 1, p.1629–1650, 2001.

LACERDA, J. T.; RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, D. M.; TRAEBERT, J. Prevalência da dor orofacial e seu impacto no desempenho diário em trabalhadores das indústrias têxteis do município de Laguna, SC. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 16, n. 10, p. 4275-4282, 2011.

LECCI, A.; MAGGI, C. A. Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. **Expert Opinion in Therapeutic Targets** , v. 7, n. 3, 343–362, 2003.

LEMONS, L.; FLORES, S.; OLIVEIRA, P.; ALMEIDA, A. Gabapentin supplemented with ropivacain block of trigger points improves pain control and quality of life in trigeminal neuralgia patients when compared with gabapentin alone. **Clin J Pain**, v. 24, p. 64-75, 2008.

LEEUEW, R. **Orofacial pain: guidelines for classification, assessment, and management**. Chicago: Quintessence, 2008.

LINDSAY, R. M.; HARMAR A. J. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. **Nature**, v. 337, p. 362-364, 1989.

LOCKER, D.; GRUSHKA, M. Prevalence of oral and facial pain and discomfort: preliminary results of a mail survey. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.15, n. 3, p. 169-172, 1987.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-447, 2008.

LOTZ, M.; CARSON, D. A.; VAUGHAN, J. H. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. **Science**, v. 235, p. 893-895, 1987.

MA, W.; BISBY, M. A. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. **Eur J Neurosci**, v. 10, p. 2388-2399, 1998.

MA, W.; RAMER, M. S.; BISBY, M. A. Increased calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in gracile nucleus after partial sciatic nerve injury: age-dependent and originating from spared sensory neurons. **Exp Neurol**, v. 159, p. 459-473, 1999.

MAGGI, C. A. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. **Regul Pept**, v. 93, p. 53-64, 2000.

MAGLOIRE, H.; MAURIN, J. C.; COUBLE, M. L.; SHIBUKAWA, Y.; TSUMURA, M.; THIVICHON-PRINCE, B.; BLEICHER, F. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. **J Orofacial Pain**, v. 24, n. 4, p. 335-3349, 2010.

MARCHAND, J. E.; WURM, W. H.; KATO, T.; KREAM, R. M. Altered tachykinin expression by dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 58, p. 219-231, 1994.

MATTHEWS, M. A.; McDONALD, G. K.; HERNANDEZ, T. V. GABA distribution in a pain-modulating zone of trigeminal subnucleus interpolaris. **Somatosens Res.**, v. 5, p. 205-217, 1988.

MEERT, T. F.; VISSERS, K.; GEENEN, F.; KONTINEN, V. K. Functional role of exogenous administration of substance P in chronic constriction injury model of neuropathic pain in gerbils. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 76, p.17-25, 2003.

MIKI, K.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; NOGUCHI, K. Calcitonin gene-related peptide increase in the rat spinal dorsal horn and dorsal column nucleus following peripheral nerve injury: up-regulation in a subpopulation of primary afferent sensory neurons. **Neuroscience**, v. 82, p. 1243-1252, 1998.

MOORE, P. A. Pain management in dental practice: tramadol vs. codeine combinations. **JADA**, v. 130, p. 1075-1079, 1999.

MOORE, L. Evaluation of the patient for temporomandibular joint surgery. **CAN**, v. 18, p. 291-303, 2006.

NAHIN, R. L.; REN, K.; DE LEÓN, M.; RUDA, M. Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 58, p. 95-108, 1994.

NILSSON, J.; VON EULER, A. M.; DALSGAARD, C. J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. **Nature**, v. 315, p. 61-63, 1985.

OBERMANN, M. Treatment options in trigeminal neuralgia. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 3, p. 107-115, 2010.

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, p. 174-181, 2008.

OKESON, J. P.; LEEUW, R. Differential diagnosis of temporomandibular disorders and other orofacial pain disorders. **Dent Clin N Am**, v. 55, p. 105-120, 2011.

PAGE, N. M.; BELL, N. J. The human tachykinin NK1 (short form) and tachykinin NK4 receptor: a reappraisal. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 437, p. 27-30, 2002.

PATACCHINI, R.; MAGGI, C. A. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 13-21, 2001.

PENNEFATHER, J. N.; LECCI, A.; LUZ CANDENAS, M.; PATAK, E.; PINTO, F. M.; MAGGI, C. A. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sciences**, v. 74, p. 1445-1463, 2004.

QUARTARA, L.; MAGGI, C. A. The tachykinin NK receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. **Neuropeptides**, v. 31, n. 6, p. 537-563, 1997.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat Med.**, v. 16, n. 11, p. 1267-1276, 2010.

ROBINSON, M. E.; RILEY, J. L. III; MYERS, C. D. Psychosocial contributions to sex-related differences in pain responses. In: FILLINGIM, R. B. **Sex, gender, and pain**. Seattle: IASP Press, p. 41-68, 2000.

RUSSELL, M. B.; RASMUSSEN, B. K.; THORVALDSEN, P.; OLESEN, J. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. **International Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 612-618, 1995.

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 Anesthesiol.**, v. 71, p. 117-136, 2005.

SHINAL, R. M.; FILLINGIM, R. B. Overview of Orofacial Pain: Epidemiology and Gender Differences in Orofacial Pain. **Dent Clin N Am**, v. 51, p. 1-18, 2007.

SIO, S. W. S.; PUTHIA, M. J.; LU, J.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. The Neuropeptide Substance P Is a Critical Mediator of Burn-Induced Acute Lung Injury. **J. Immunol**, v. 180, p. 8333-8341, 2008.

SMITH, P.; MOSSCROP, D.; DAVIES, S.; SLOAN, P.; AL-AN, Z. The efficacy of acupuncture in the treatment of temporomandibular joint myofascial pain: A randomised controlled trial. **Journal of Dentistry**, v. 35, p. 259-263, 2007.

SNIDER, R. M.; LONGO, K. P.; DROZDA, S. E.; LOWE, J. A. D.; LEEMAN, S. E. Effect of CP 96,345, a nonpeptide substance P receptor antagonist, on salivation in rats. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 10042-10044, 1991.

SOMMER, C.; MYERS, R.R. Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. **Acta Neuropathol**, v. 90, p. 478-485, 1990.

STEER, J. M. Some observations on the fine structure of rat dorsal spinal nerve roots. **J Anat**, v. 109, p. 467-487, 1971.

STOHLER, C. S. Chronic Orofacial Pain: Is the Puzzle Unraveling? **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 12, p. 1383-1393, 2001.

SUGIMOTO, T.; TAKEMURA, M. Tooth pulp primary neurons: Cell size analysis, central connection, and carbonic anhydrase activity. **Brain Research Bulletin**, v. 30, p. 221-226, 1993.

SUGIMOTO, T.; WAKISAKA, S.; TAKEMURA, M.; AOKI, M. Cell size and Nissl pattern analyses of primary afferent neurons innervating the molar tooth pulp and cornea of the rat. In: CERVERO, F.; BENNETT, G. J.; HEADLEY, P. M. **Processing of sensory information in the superficial dorsal horn of spinal cord**. New York: Plenum Publishing Corp, 1989. p. 95-98.

TAKEMURA, M.; SUGIYO, S.; MORITANI, M.; KOBAYASHI, M.; YONEHARA, N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. **Arch Histol Cytol**, v. 69, p. 79-100, 2006.

TSUBOI, Y.; TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; MATSUMOTO, S.; KITAGAWA, J.; TERAMOTO, K.; SIMIZUA, K.; YAMAZAKIE, Y.; SHIMA, A.; RENF, K.; IWATA, K. Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. **Pain**, v. 111, p. 323-334, 2004.

TSUZUKI, K., FUKUOKA, T., SAKAGAMI, M., NOGUCHI K. Increase of preprotachykinin mRNA in the uninjured mandibular neurons after rat infraorbital nerve transection. **Neurosci Lett.**, v. 345, n. 1, p. 57-60, 2003.

TULUC, F.; LAI, J. P.; KILPATRICK, L. E.; EVANS, D. L.; DOUGLAS, S. D. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 271-277, 2009.

TURP, J. C.; GOBETTI, J. P. Trigeminal neuralgia versus atypical facial pain. A review of the literature and case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 81, p. 424-32, 1996.

VOISIN, D. L.; DOMÈJEAN-ORLIAGUET, S.; CHALUS, M.; DALLEL, R.; WODA, A. Ascending connections from the caudal part to the oral part of the spinal trigeminal nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 109, p. 183-193, 2002.

von EULER, U. S.; GADDUM, J. H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J Physiol Lond**, v. 72, p. 74-87, 1931.

WAITE, P. M. Trigeminal Sensory System. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. USA: Elsevier, 2003. p. 817-851.

WAITE, P. M., ASHWELL, K. W. Trigeminal Sensory System. In: PAXINOS, G.; MAI, J. K. **The Human Nervous System**. USA: Elsevier, 2004. p. 1093 – 1124.

YOSHIMURA, M.; YONEHARA, N. Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. **Neurosci Res**, v. 56, p. 21-28, 2006.

YOUNG, R. F.; KING, R. B. Fiber spectrum of the trigeminal sensory root of the baboon determined by electron microscopy. **Journal of Neurosurgery**, v. 38, p. 65-72, 1973.

ZAKRZEWSKA, J. M.; CHAUDHRY, Z.; NURMIKKO, T. J.; PATTON, D.W.; MULLENS, E. L. Lamotrigine (Lamictal) in refractory trigeminal neuralgia: results from a double-blind placebo controlled crossover trial. **Pain**, v. 73, p. 223-230, 1997.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; PACINI, M.; GEPPETTI, P.; ALESSANDRI, G.; MAGGI, C. A. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. **Microvasc Res**, v. 40, p. 264-278, 1990.