

[Digite texto]

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**SUELLEN CRISTINA COELHO**

O FATOR DE NECROSE TUMORAL  $\alpha$  PARTICIPA DA HIPERALGESIA TÉRMICA E  
MECÂNICA OROFACIAL RELACIONADA À INFLAMAÇÃO E CONSTRIÇÃO DO  
NERVO INFRAORBITAL EM RATOS

CURITIBA  
2012

[Digite texto]

SUELLEN CRISTINA COELHO

O FATOR DE NECROSE TUMORAL  $\alpha$  PARTICIPA DA HIPERALGESIA TÉRMICA E  
MECÂNICA OROFACIAL RELACIONADA À INFLAMAÇÃO E CONSTRIÇÃO DO  
NERVO INFRAORBITAL EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Geremias Chichorro

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Coelho, Suellen Cristina

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  participa da hiperalgesia térmica e mecânica orofacial relacionada à inflamação e constrição do nervo infraorbital em ratos. / Suellen Cristina Coelho. – Curitiba, 2012.

75f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio  
Co-orientadora: Juliana Geremias Chichorro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Hiperalgesia. 2. Neuralgia facial. 3. Dor orofacial. 4. Inflamação. I. Título II. Zamprônio, Aleksander Roberto. III. Chichorro, Juliana Geremias. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615



## PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "O FATOR DE NECROSE TUMORAL  $\alpha$  PARTICIPA DA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA OROFACIAL RELACIONADA À INFLAMAÇÃO E CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL EM RATOS.", de autoria da pós-graduanda **SUELLEN CRISTINA COELHO**, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e composta pelos professores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joice Maria da Cunha (Farmacologia-UFPR) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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 pelo seu orientador. Em Curitiba, 23 de abril de 2012.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Orientador - UFPR)

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

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

*Aos meus amados pais Luiz Gonzaga Coelho e Maria Novaes de Lima Coelho pelo suporte incondicional ao longo da minha vida e ao meu querido irmão Luiz Henrique. Ao meu querido noivo Vinícius Medeiros Fava pela participação e amor intenso.*

## *Agradecimentos*

*Aos meus pais pelo carinho, esforço e dedicação durante toda a minha vida pessoal e profissional.*

*Ao meu noivo que sempre esteve ao meu lado cujas dicas sobre a pós-graduação foram sempre muito valiosas.*

*Agradeço ao meu orientador Aleksander Roberto Zampronio pela orientação, contribuição científica, apoio e suporte que foram indispensáveis para a minha formação e à minha co-orientadora Juliana Geremias Chichorro pelas importantes sugestões científicas e apoio.*

*Agradeço também aos meus colegas de laboratório pela amizade, sugestões e ajudas, principalmente a Amanda Leite Bastos Pereira e Daniel Fraga pela contribuição realizada a este trabalho.*

*À Caroline Machado Kopruszinski por ser sempre muito atenciosa e por ter ensinado a cirurgia e os experimentos de hiperalgesia térmica.*

*Ao Prof. Dr.º Marcelo Muscará e seu grupo pela hospitalidade, atenção e disponibilidade em ensinar o experimento de hiperalgesia mecânica.*

*Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 MECANISMOS GERAIS DA TRSMISSÃO NOCICEPTIVA.....	13
1.2 DOR INFLAMATÓRIA.....	17
1.3 DOR NEUROPÁTICA.....	19
1.3.1 NEUROPATIA TRIGEMINAL E DOR OROFACIAL .....	21
1.3.2 PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS NEURONAIIS E NÃO NEURONAIIS NA DOR NEUROPÁTICA.....	23
1.3.3 PAPEL DO TNF- $\alpha$ NA DOR NEUROPÁTICA.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1 MATERIAIS .....	30
3.1.2 ANIMAIS.....	30
3.1.3 REAGENTES, DROGAS E SOLUÇÕES .....	30
3.2 MÉTODOS.....	31
3.2.1 ESTIMULAÇÃO POR CARRAGENINA.....	31
3.2.2 CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CNIO) .....	31
3.2.3 ESTIMULAÇÃO TÉRMICA POR CALOR .....	32

<b>3.2.4 ESTIMULAÇÃO TÉRMICA POR FRIO.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.5 ESTIMULAÇÃO MECÂNICA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>40</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA CNIO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CNIO.....</b>	<b>53</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1 – Protocolo para avaliação da hiperalgesia térmica no modelo de dor inflamatória.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 2 – Protocolo para avaliação da hiperalgesia térmica no modelo de dor neuropática.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 3 – Protocolo para avaliação da hiperalgesia mecânica no modelo de dor inflamatória.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4 – Protocolo para avaliação da hiperalgesia mecânica no modelo de dor neuropática.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6 – Efeito do tratamento diário com dexametasona sobre a hiperalgesia ao calor induzida pela CNIO.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 7 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na fase inicial do processo neuropático sobre a hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 8 – Efeito do tratamento tardio com dexametasona na hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9 – Efeito do tratamento tardio com etanercept na hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.....</b>	<b>48</b>

<b>Figura 10 – Efeito do tratamento inicial ou tardio com etanercept em animais falso-operados sobre a estimulação ao calor.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 11 – Hiperlgesia mecânica induzida por carragenina.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 12 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na hiperlgesia mecânica induzida pela carragenina.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 13 – Hiperlgesia mecânica induzida por CNIO.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 14 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na fase inicial do processo neuropático sobre a hiperlgesia mecânica induzida pela CNIO.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 15 – Efeito do tratamento tardio com dexametasona ou etanercept na hiperlgesia mecânica induzida pela CNIO.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASIC – Canal iônico sensível ao ácido

ATP – Adenosina trifosfato

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CGRP – Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

CNIO – Constricção do nervo infraorbital

COX – Enzima cicloxigenase

CRPS – Síndrome de dor regional complexa.

Dex – Dexametasona

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

Eta – Etanercept

FADD - Domínio de morte associado ao Fas

FDA – “Food and Drug Administration” – Administração de alimentos e drogas

IASP – “International Association for the Study of Pain” – Associação internacional de estudo da dor.

IL – Interleucina

JNK – Proteína terminal N c-Jun

KC – quimiocina derivado de queratinócito

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MT5MMP – Enzima metaloproteinase

NGF – Fator de crescimento neural.

NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato.

NO – Óxido nítrico

NK – Receptor de neurocinina

PG – Prostaglandinas

RAIDD – Domínio de morte associado ao RIP

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

s.c. – subcutâneo

TACE - Enzima conversora de TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF – Fator associado ao receptor de TNF

TRPA1 – Receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPM8 – Receptor de potencial transitório melastatina 8

TRPV – Receptor de potencial transitório do tipo vanilóide.

## RESUMO

A neuralgia trigeminal (NT) é um exemplo de uma forma de dor neuropática limitada à região orofacial inervada pelo nervo trigêmeo e é relativamente menos estudada e compreendida que outras formas de dor neuropática. Nestas outras formas de dor neuropática já é bastante conhecido que a ativação do sistema imune exerce um papel crucial em ambos os processos sensoriais anormais, periférico e central, durante o estado de dor neuropática. Entre as citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é considerado um fator importante na iniciação da cascata de ativação de citocinas e iniciação da dor neuropática de maneira geral. No entanto, não existem estudos que avaliem com detalhes a participação desta citocina na dor neuropática trigeminal. O objetivo desse trabalho foi avaliar o envolvimento do TNF- $\alpha$  na hiperalgesia térmica e mecânica orofacial induzida pela constrição crônica do nervo infraorbital (CNIO), um modelo de dor neuropática na região orofacial, utilizando o etanercept (Eta), um anticorpo quimérico que bloqueia a ação do TNF- $\alpha$ . Para efeitos comparativos, foi avaliado o efeito deste anticorpo sobre a hiperalgesia térmica e mecânica inflamatória induzida pela carragenina (Cg, 50 e 100  $\mu$ g/sítio) administrada no lábio superior dos mesmos. Os animais foram tratados com Eta (0,5 e 5,0 mg/kg, s.c.) ou com Dexametasona (Dex, 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg, s.c.) em diferentes esquemas terapêuticos. O tratamento dos animais com Eta (0,5 e 5,0 mg/kg) e Dex (1,0 mg/kg) 1h e 2h antes da administração de Cg, respectivamente, aboliu a hiperalgesia térmica e mecânica inflamatória. Da mesma forma, o tratamento sistêmico de ambas as drogas no dia da cirurgia e no dia subsequente (dias 0 e 1) foi efetivo em abolir a hiperalgesia ao calor e frio observada 4 dias após a CNIO. De maneira similar, ambos os tratamentos administrados no dia da cirurgia e nos 2 dias subsequentes (dia 0, 1 e 2) foram efetivos em reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO avaliada nos dias 10 e 13 após a cirurgia. Entretanto, diferente da Dex, o Eta administrado nos dias 2, 3 e 4 ou dias 10, 11 e 12 após a CNIO aboliu a hiperalgesia térmica (frio e calor) e mecânica, respectivamente. Esses resultados sugerem que o TNF- $\alpha$  tem um papel importante na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por inflamação ou neuropatia na região orofacial. No caso da dor neuropática trigeminal esta participação parece ser importante não somente na fase inicial, mas também para a manutenção da hiperalgesia térmica e mecânica. Estes dados podem contribuir para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para controlar a dor orofacial, especialmente a NT.

Palavras chave: Dor trigeminal, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , etanercept, hiperalgesia térmica, hiperalgesia mecânica.

## ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (TN) is an example of an extreme form of neuropathic pain limited to the orofacial region innervated by the trigeminal nerve and it is less studied and understood than other forms of neuropathic pain. On these other forms of neuropathic pain it is well known that immune system activation plays a crucial role in both central and peripheral abnormal sensory processes during neuropathic pain states. Among pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is considered to play a key role in the initiation of cytokines activation cascade and in the initiation of neuropathic pain in general. However, there are no studies that evaluate more specifically the role of this cytokine in the trigeminal neuropathic pain. The aim of this study was to evaluate the involvement of TNF- $\alpha$  in orofacial thermal and mechanical hyperalgesia induced by chronic constriction of the infraorbital nerve (CION), a model for neuropathic pain in the orofacial region, using etanercept (Eta), a chimeric antibody that blocks TNF- $\alpha$  action. For comparative purposes, it was also evaluated the effect of this antibody on the thermal and mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (Cg, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) administered in the upper lip. Animals were treated with Eta (0.5 and 5.0 mg/kg, s.c.) or with Dexamethasone (Dex, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg, s.c.) in different therapeutic protocols. The treatment of the animals with Eta (0.5 and 5.0 mg/kg) and Dex (1.0 mg/kg) 1 h and 2h before the administration of Cg, respectively, abolished the inflammatory thermal and mechanical hyperalgesia. Also, the systemically treatment with both drugs at the day of the surgery and subsequent day (days 0 and 1), was effective to abolish heat and cold hyperalgesia observed 4 days after CION. Similarly, both treatments given at the day of the surgery and 2 subsequent days (days 0, 1, and 2) were effective to reduce mechanical hyperalgesia induced by CION measured on day 10 and 13 after the surgery. However, different from Dex, Eta given at days 2, 3 and 4 or days 10, 11 and 12 after the CION abolished thermal (cold and heat) and mechanical hyperalgesia, respectively. These results suggest that TNF- $\alpha$  has an important role in thermal and mechanical hyperalgesia induced by inflammation or neuropathy in the orofacial region. Considering trigeminal neuropathic pain, this role seems to be important not only on the initial phase but also in the maintenance phase of the thermal and mechanical hyperalgesia. These data may contribute for the establishment of new therapeutic strategies to control orofacial pain, especially TN.

Keywords: Trigeminal pain, tumor necrosis factor-  $\alpha$ , etanercept, thermal hyperalgesia, mechanical hyperalgesia.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MECANISMOS GERAIS DA TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA

Vários tipos de estímulos físicos, químicos ou biológicos de certa intensidade e potencialmente nocivos podem causar a sensação de dor e eventualmente provocar lesão tecidual. A correlação complexa entre estímulo nocivo, lesão tecidual e a consciência de dor ocorre devido a uma série de mecanismos, de maneira que o estímulo uma vez captado por terminações nervosas sensoriais possa ser codificado como uma mensagem nociceptiva e progressivamente transmitido e processado no sistema nervoso central (MILLAN, 1999).

A dor é classificada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP do inglês, *International Association for the Study of Pain*) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (LOESER e TREEDE, 2008).

A dor pode estar envolvida em diferentes processos fisiológicos, inflamatórios e lesões nervosas e, portanto, será caracterizada conforme o processo envolvido. O termo dor nociceptiva tem sido utilizado para denominar a dor gerada pela ativação de fibras nociceptivas. A dor associada a um processo inflamatório (dor inflamatória) encaixa-se na mesma categoria de dor nociceptiva, embora se saiba que o sistema nociceptivo pode estar alterado em resposta a ativação de células imunes. Contudo, quando a nocicepção é devido a uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial periférico ou central, esta será do tipo neuropática (LOESER e TREEDE, 2008).

Em relação à dor nociceptiva, mais evidente na pele, os estímulos nocivos de várias modalidades ativam diretamente e indiretamente diferentes receptores presentes nas membranas das terminações nervosas de fibras periféricas nociceptivas (MARCHAND *et al.*, 2005). Essas fibras nervosas são caracterizadas conforme a anatomia e funcionalidade. As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, com diâmetro e velocidade de condução média enquanto que as fibras C não são mielinizadas, de

pequeno diâmetro e com baixa velocidade de condução. A fibra A $\delta$  medeia à dor de ocorrência rápida, aguda e localizada, enquanto que a fibra C é responsável pela dor de ocorrência mais lenta, prolongada e difusa quanto a sua localização e portanto, são responsáveis em conduzir a dor primária e secundária, respectivamente. As terminações nervosas livres destas fibras são geralmente silenciosas na ausência de uma estimulação e respondem somente aos estímulos potencialmente nocivos. Porém, com uma lesão nervosa, as mesmas se tornam anormalmente sensíveis desenvolvendo uma atividade ectópica (BARON, 2006). Além disso, existem fibras A $\alpha$  e A $\beta$  responsáveis pelo estímulo inócuo na pele, musculatura e articulações sem capacidade de contribuir com a resposta nociceptiva em situações fisiológicas. Essas fibras são extremamente mielinizadas com diâmetro largo e condução rápida (JULIUS e BASBAUM, 2001; KUNER, 2010).

Os receptores presentes nessas fibras nociceptivas são ativados na presença de estímulos térmicos, mecânicos e alguns estímulos químicos. Caterina *et al.* em 1997 mostraram que o estímulo térmico é capaz de ativar o receptor de potencial transitório (TRP) vanilóide 1 (V1) evocando a hiperalgesia ao calor (CATERINA *et al.*, 1997). Além do TRPV1, os receptores TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1 também fazem parte da superfamília dos TRP e estão presentes em mamíferos (NUMAZAKI e TOMINAGA, 2004). Acredita-se que esses receptores exibem limiar de ativação diferente frente a distintos estímulos nocivos. Além dos receptores TRPV1, os receptores TRPV2 e TRPV3 também podem ser ativados por um estímulo térmico como o calor, enquanto que, o receptor TRPM8 pode ser ativado por um estímulo térmico como o frio, evocando a hiperalgesia ao frio (SCHOLZ e WOOLF, 2002). O estímulo mecânico pode desencadear a hiperalgesia mecânica ao ativar diretamente canais iônicos do tipo TRPA1 presentes em fibras nociceptivas (FRENCH, 1992) ou indiretamente ao liberar moléculas como o ATP (MARCHAND *et al.*, 2005). Liberado através da lise de células devido ao estímulo mecânico, o ATP ativa receptores ionotrópicos purinérgicos do tipo P2X (COOK *et al.*, 1997) e P2Y (NAKAMURA e STRITTMATTER, 1996) desencadeando potenciais de ação (LEWIN e MOSHOURAB, 2004). O estímulo químico, por exemplo a capsaicina, componente presente em pimentas vermelhas, pode atuar em neurônios sensoriais tanto ativando o receptor



TRPV1 quanto aumentando a sua responsividade ao estímulo térmico (CATERINA *et al.*, 1997). Assim como, o estímulo químico em decorrência a um estímulo inflamatório ou processo isquêmico pode desencadear nocicepção ao ligar-se à canais iônicos do tipo ASIC (WALDMANN *et al.*, 1997).

Em seguida, a ativação desses receptores presentes em fibras sensoriais primárias deve atingir um limiar de excitação mínima para desencadear a sensação dolorosa. Esse limiar é alto o suficiente para não interferir na atividade normal dos seres vivos, mas baixo de forma aceitável para provocar a dor antes que estímulo nocivo promova algum dano. Porém, esse limiar não é fixo e pode sofrer modificações após lesão tecidual ou nervosa de forma mal adaptativa promovendo uma plasticidade neuronal no sistema somatosensorial. A plasticidade afeta as fibras nervosas tanto a nível periférico quanto central, alterando a responsividade destas fibras, de tal forma, que um estímulo inócuo passa a desencadear a dor (alodinia) ou a sensibilidade ao estímulo doloroso torna-se maior (hiperalgesia) (SCHOLZ e WOOLF, 2002). Assim, o limiar de excitação da fibra para uma resposta dolorosa encontra-se menor, portanto, a resposta aos estímulos será maior do que normalmente deveria ser (MILLAN, 1999; ZHUO, 2007).

Após o estímulo sensorial atingir o limiar de excitação das fibras sensoriais primárias há a tradução e codificação desse estímulo nocivo externo em atividade elétrica (MELZACK e WALL, 1965; HUNT e MANTYH, 2001; JULIUS e BASBAUM, 2001; SCHOLZ e WOOLF, 2002). A atividade elétrica é amplificada pela abertura dos canais de sódio gerando um potencial de ação, promovendo então o transporte da mensagem nociceptiva da terminação periférica para os seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal e em seguida para a terminação central do neurônio sensorial de primeira ordem (BASBAUM e JESSELL, 2000).

A terminação central do neurônio de primeira ordem, localizado nas lâminas superiores I e II do corno da raiz dorsal da medula espinhal, libera neurotransmissores como substância P (HUNT e ROSSI, 1985) e aminoácidos excitatórios (AANONSEN *et al.*, 1990). Esses mediadores excitatórios, através de conexões monossinápticas, atuam em neurônios de segunda ordem ativando receptores de neuroquinina 1 (NK-1) e ácido amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), respectivamente. O

receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), presente no neurônio de segunda ordem, está inativo devido a sua ligação estável com o íon magnésio (WATKINS e MAIER, 2003). Porém, durante o estado patológico, a liberação contínua de substância P e aminoácidos excitatórios despolariza o neurônio de segunda ordem com conseqüentemente saída do íon magnésio do canal NMDA permitindo o influxo do cálcio extracelular. O cálcio pode aumentar a produção de NO, o qual se difunde para fora da terminação nervosa, promovendo um aumento da liberação de substância P e aminoácidos excitatórios do neurônio de primeira ordem (WOOLF e SALTER, 2000).

Concomitantemente à comunicação entre o neurônio de primeira e segunda ordem, a célula da glia que em estado de dor fisiológica encontra-se quiescente (WATKINS *et al.*, 2001) pode ser ativada após o estímulo inflamatório (FU *et al.*, 1999) ou neuropático (COLBURN *et al.*, 1999).

Após a sinapse entre os neurônios nociceptivos de primeira ordem com aqueles de segunda ordem, o axônio do neurônio secundário então cruza a medula espinhal para a região ventral do corno dorsal. De forma ascendente, esse neurônio de segunda ordem transporta a mensagem nociceptiva para o sistema nervoso central por diversas vias, como: espinotalâmica lateral, espinoparabraquial, espinomesencefálica, espinoreticular, espinolímbico e espinocervical (WILLIS e WESTLUND, 1997). A mensagem nociceptiva é conduzida por essas vias e pode ser enviada para o tálamo e posteriormente para o córtex somatosensorial onde os aspectos sensoriais e discriminativos da dor são processados. Ao mesmo tempo, a mensagem nociceptiva pode ser encaminhada para o centro límbico, onde o estímulo será convertido à aspectos emocionais e aversivos (KUNER, 2010). A experiência dolorosa, percebida no córtex, é encaminhada para a medula espinhal e de forma descendente é conduzida para a fibra motora gerando uma resposta. Esse reflexo tem como objetivo descontinuar a exposição dolorosa, e assim, finalizar o estímulo (MELZACK e WALL, 1965; MILLAN, 1999). Deste modo, a dor desencadeada no estado fisiológico é importante para sobrevivência dos seres humanos e animais, uma vez que, a experiência relacionada com a sensação desagradável ajuda a formar uma memória de aversão aos estímulos potencialmente nocivos com o objetivo de proteção (ZHUO, 2007).

A transmissão dolorosa envolvendo o nervo trigeminal ocorre de forma distinta àquela observada na pele. As fibras sensoriais aferentes trigeminais transmitem a informação neural através do gânglio trigeminal para os neurônios de segunda ordem. Esses neurônios de segunda ordem localizam-se no tronco cerebral em um complexo nuclear trigeminal. Essa estrutura é a principal região do cérebro, em que, a informação sensorial craniofacial é primeiramente processada e então retransmitida para outras regiões do sistema nervoso central (SNC). Portanto, em seguida, os neurônios de segunda ordem projetam a informação sensorial ao tálamo ou para regiões do tronco encefálico, que inclui a formação reticular e núcleo motor. Desta forma, a informação sensorial transmitida ao SNC fornece informações sobre as qualidades espaciais e temporais dos estímulos nocivos (SESSLE, 2000).

## 1.2 DOR INFLAMATÓRIA

Lesões teciduais, reações auto-imunes e exposições à produtos bacterianos ou toxinas são alguns eventos que desencadeiam reações inflamatórias promovendo sinais e sintomas como migração celular, edema, eritema e dor (MARCHAND *et al.*, 2005). Durante o desenvolvimento da dor inflamatória pode ocorrer a hiperalgesia primária ou secundária. A hiperalgesia primária é decorrente da ativação de nociceptores de fibras primárias aferentes presentes no local do tecido inflamado, enquanto que a hiperalgesia secundária ocorre devido ativação de nociceptores presentes em tecidos intactos cercados pelos tecidos lesionados (MILLAN, 1999).

A ação de substâncias algogênicas em fibras aferentes primárias promove a liberação de mediadores pelas terminações periféricas. Dentre esses mediadores, a substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) induzem a vasodilatação e extravasamento plasmático, assim como, ativação de mastócitos e neutrófilos. Da mesma forma, a bradicinina pode ser ativada no plasma através da clivagem proteolítica de seu precursor, o cininogênio de alto peso molecular (MILLAN, 1999). Além disso, há a participação de células imunológicas que contribuem para a instalação da dor inflamatória. Essas células liberam mediadores inflamatórios capazes de ativar ou sensibilizar os nociceptores (MARCHAND *et al.*, 2005).

Os mastócitos são células residentes, presentes no tecido periférico, que participam da resposta imune inata e reações alérgicas (STASSEN *et al.*, 2002). Essas células em um processo inflamatório liberam uma série de mediadores inflamatórios estocados em grânulos citoplasmáticos como a histamina e outros mediadores que contribuem com a vasodilatação (LAWRENCE *et al.*, 2002). Acredita-se que a degranulação dos mastócitos ocorra através da interação direta do mesmo com a terminação nervosa periférica mediada por uma molécula de adesão, a N-caderina. Folgueras *et al.* mostraram que camundongos com deleção gênica para a metaloproteinase (MT5-MMP) apresentaram um aumento na expressão de N-caderina e conseqüentemente um aumento da interação entre mastócitos e terminação nervosa aumentando a responsividade à hiperalgesia térmica (FOLGUERAS *et al.*, 2009). Os mastócitos também são capazes de liberar citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (RIBEIRO *et al.*, 2000). Essas citocinas quando clivadas se tornam ativas e então exercem suas ações nas terminações nervosas periféricas (GALLI *et al.*, 2005).

Além dos mastócitos, os macrófagos contribuem significativamente para o desenvolvimento da dor inflamatória. A depleção de macrófagos do tecido periférico reduz a resposta nociceptiva de camundongos submetidos à aplicação intraperitoneal de zimosan e ácido acético (RIBEIRO *et al.*, 2000). Os macrófagos derivados de monócitos circulantes recrutados da circulação sanguínea ou residentes no tecido liberam vários mediadores inflamatórios (THACKER *et al.*, 2007). Esses mediadores como o fator de crescimento neural (NGF), o óxido nítrico (NO), os prostanóides e as citocinas pró-inflamatórias, particularmente o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, promovem o desenvolvimento do estado doloroso (THOMAZZI *et al.*, 1997; OHISHI, 2000)

Além disso, a ativação de macrófagos parece estar relacionada com a ativação e recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação, uma vez que, a depleção de macrófagos bloqueia significativamente a migração de neutrófilos induzida pela carragenina, zimosan ou endotoxina por *E. coli* (SOUZA *et al.*, 1988). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas da circulação sanguínea para o tecido inflamado, portanto, são responsáveis pela resposta inflamatória inicial e aguda. A diminuição da infiltração de neutrófilos pode reduzir a hiperalgesia térmica induzida pela injeção de carragenina na pata de ratos (CHOU *et al.*, 2003). Posteriormente, Cunha *et*

*al.* observaram que o pré-tratamento com inibidor de adesão de leucócitos reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. Porém, a atividade nociceptiva dos neutrófilos não estava associada à liberação de citocinas. O efeito dependeu da migração de neutrófilos e da sua habilidade em liberar mediadores como PGE<sub>2</sub> (CUNHA *et al.*, 2008).

Finalmente, o efeito álgico é observado quando os mediadores como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NGF, histamina, bradicinina e prostanóides interagem com os seus respectivos receptores presentes nas terminações das fibras nervosas que inervam o tecido inflamado (MARCHAND *et al.*, 2005), desencadeando uma série de sinalização em cascata. Em relação à cascata de sinalização observada em camundongos submetidos a um estímulo com carragenina, Cunha *et al.* demonstraram que a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e quimiocina derivado de queratinócito (KC) desencadeiam duas vias inflamatórias capazes de promover a sensibilização de fibras nociceptivas através da liberação de PG e aminas simpáticas. A liberação de PG pode ser estimulada pela IL-1 $\beta$  uma vez que esse efeito foi bloqueado por um inibidor da cicloxigenase (COX). O TNF- $\alpha$  e a KC também pode promover a liberação de PG. Além disso, a KC promoveu a liberação de aminas simpáticas, uma vez que, o tratamento com guanetidina inibiu a hiperalgesia induzida pela KC e pela carragenina (CUNHA *et al.*, 1992; CUNHA *et al.*, 2005).

### 1.3 DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática pode ser uma consequência direta de uma lesão nervosa ou doença que afeta o sistema somatosensorial (LOESER e TREEDE, 2008). A dor neuropática, portanto, denota uma patologia do sistema somatosensorial, seja tanto nos seus elementos periféricos (dor neuropática periférica) quanto no sistema nervoso central (dor neuropática central) (LOESER E TREED, 2008).

A maioria dos indivíduos acometidos por essa patologia encaixam-se entre as 4 classificações etiológicas das dores neuropáticas:

- Lesão nervosa periférica focal e multifocal que inclui dor do membro fantasma, diabetes mononeuropática e neuralgia pós-herpética, pós-traumática, isquêmica e do nervo trigêmeo;
- Polineuropatia periférica generalizada que ocorre no *diabetes mellitus*, neuropatia por HIV, plasmocitoma, hipotireoidismo, neuropatia sensorial hereditária, doença de Fabry e neuropatia tóxica;
- Lesão do sistema nervoso central como lesão da medula espinhal, esclerose múltipla e infarto;
- Desordens neuropáticas complexas que compreende a atrofia *Sudeck* ou síndrome de dor regional complexa (CRPS), a qual pode ser classificada em síndrome do tipo I e tipo II. O tipo I geralmente ocorre após trauma sem lesão de nervo. Em contrapartida, a síndrome do tipo II ocorre após uma lesão nervosa (BARON, 2006).

Os três tipos de dores neuropáticas mais comuns são: neuralgia pós-herpética, diabética e trigeminal (LEUNG e CAHILL, 2010).

A neuralgia pós-herpética é o tipo de neuralgia causada pela reativação do vírus *herpes zoster* da varicela-zoster que se encontrava na forma latente nos gânglios sensoriais da medula espinhal e craniana após a infecção primária por varicela. A reativação pode acontecer em qualquer estágio da vida, mas também está associada ao envelhecimento e ao declínio da imunidade. Apesar de não ser fatal, a doença está associada com *rash* cutâneo e dor (JOHNSON, 2010). O *rash* pode ser curado, porém a dor pode tornar-se contínua. Portanto, a alodinia é uma característica proeminente da neuralgia pós-herpética.

A neuropatia diabética é uma das complicações mais comuns em pacientes com *diabetes mellitus*, tanto do tipo I quanto no tipo II. A prevalência de dor varia entre 10 a 20 % em pacientes com *diabetes mellitus* e 40 a 50 % em indivíduos com neuropatia diabética (DOGRUL *et al.*, 2011). Existem vários tipos de neuropatia associadas à *diabetes mellitus*, algumas estão claramente associadas com a hiperglicemia, mudanças metabólicas e processos inflamatórios ou imunológicos. As fibras longas, as quais inervam os pés, são as primeiras afetadas e com o passar do tempo, os joelhos e os dedos também são afetados. Mas além dessas fibras, outros

tipos de nervos podem ser afetados incluindo fibras sensoriais pequenas, fibras autonômicas ou motoras (TRACY e DYCK, 2008; VINCENT *et al.*, 2011).

O terceiro tipo de neuropatia que causa dor crônica e intensa é a neuropatia trigeminal, que descreveremos abaixo com mais detalhes por se tratar do objeto de estudo nesta dissertação.

### **1.3.1 Neuropatia trigeminal e dor orofacial**

A lesão do nervo trigêmeo pode desencadear a dor crônica, ou seja, neuralgia trigeminal, sendo esta uma síndrome orofacial extremamente debilitante (XU *et al.*, 2008). A neuralgia do trigêmeo, apesar de ser uma condição pouco prevalente, é a forma mais comum de dor neuropática crânio-facial, sendo limitada pela área inervada por um ou mais ramos do nervo (TURP e GOBETTI, 1996). Muitas vezes, os pacientes relatam este tipo de dor como sendo “a pior dor no mundo”. Também é descrita como lancinante, que usualmente perdura por alguns segundos a dois minutos, paroxística, na forma de choque elétrico ou queimação (BENNETTO *et al.*, 2007). A neuralgia trigeminal é um estado patológico de difícil tratamento e não é bem controlado pelos analgésicos clássicos. Os anticonvulsivantes são amplamente utilizados como opção terapêutica, como a carbamazepina que é a droga de primeira escolha, seguida de outros anticonvulsivantes. A administração dessas drogas alivia a dor em grande parte dos casos, mas uma parcela dos pacientes torna-se refratários ao tratamento ou são necessárias altas doses da medicação e conseqüentemente há o aumento de efeitos adversos. Outra forma terapêutica é a intervenção cirúrgica cuja conduta somente será realizada após análise de comorbidade uma vez que o procedimento é extremamente invasivo (LEMOS *et al.*, 2011).

Além da neuralgia trigeminal, existem outros fatores que podem desencadear a dor facial como dor inflamatória proveniente da polpa dentária, dor na articulação temporomandibular, neuralgia pós-herpética afetando o nervo trigêmeo (FRIED *et al.*, 2001).

O nervo trigêmeo é composto de três grandes ramos: oftálmico, maxilar e mandibular, os quais juntamente com outras inúmeras ramificações presentes fornecem

a inervação somato-sensorial da cabeça e da face. O ramo oftálmico, o qual é predominantemente sensorial, inerva a parte superior da pele da face e partes da mucosa nasal e paranasal. O ramo maxilar, também sensorial, inerva a arcada dentária e lábio superior, porção lateral nasal, a mucosa e sinus maxilar e nasofaringe. O nervo infraorbital é o principal ramo sensorial encontrado na divisão maxilar do nervo trigeminal. O ramo mandibular possui axônios motores responsáveis pela inervação músculos mastigatórios além de inervar a arcada dentária e lábio inferior, dois terços anteriores da língua, a mucosa mandibular e pele que a cobre e articulação temporomandibular. Semelhantemente ao ramo maxilar, o ramo mandibular possui predominantemente o nervo alveolar inferior como o ramo sensorial (BONGENHIELM *et al.*, 1999; FRIED *et al.*, 2001).

A maioria dos neurônios sensoriais trigeminais possuem seus corpos celulares no gânglio trigeminal, também denominado como gânglio semilunar ou gânglio Gasser. Em humanos, o gânglio trigeminal está localizado na superfície cerebral do osso temporal, lateralmente à ponte e à artéria carótida interna (SESSLE, 2000; FRIED *et al.*, 2001). Em cerca de 60% dos casos de neuralgia trigeminal há o envolvimento somente do ramo maxilar ou mandibular e 35% dos casos ambos os ramos podem estar envolvidos. Contudo, o envolvimento do ramo oftálmico é raro (TURP e GOBETTI, 1996).

O sistema trigeminal possui algumas características particulares que o difere de outros nervos periféricos, como: a origem embrionária, a quantidade de fibras simpáticas e a proporção de fibras mielinizadas e não mielinizadas, a qual é menor no nervo trigêmeo do que em outros nervos periféricos. Essas diferenças podem resultar em algumas respostas à lesão de forma diferente aos outros sistemas (FRIED *et al.*, 2001). Portanto, nem todas as evidências encontradas em outros nervos periféricos podem ser extrapoladas para o sistema trigeminal.

Na neuralgia do trigêmeo, os episódios de dor são normalmente desencadeados por uma estimulação de áreas específicas inervadas pelo nervo trigêmeo, denominadas também como zonas de gatilho (“*trigger zones*”). Ocasionalmente, por exemplo, o leve toque da face ou ativação de nervos motores dos músculos mastigatórios provocam dores tão severas que impedem o paciente comer,



beber e falar (BENNETTO *et al.*, 2007). Esses episódios de dor intensa podem ser seguidos por um período refratário e quando os mesmos se tornam muito frequentes prejudicam as atividades gerais dos pacientes (TURP e GOBETTI, 1996). A etiologia desta patologia e os mecanismos subjacentes são pouco entendidos. A teoria mais aceita sobre a causa da patologia refere-se à compressão vascular das raízes nervosas do trigêmeo na altura da ponte que pode causar uma desmielinização das fibras nervosas que então passam a disparar ectopicamente (JANNETTA, 1967; 1980)

Vários modelos de dor neuropática em animais foram desenvolvidos com o objetivo de elucidar o mecanismo e etiologia das dores neuropáticas. Entre eles, os modelos com lesão do nervo espinal, ciático ou trigeminal (FRIED *et al.*, 2001). Vos *et al.* desenvolveram um modelo de dor neuropática trigeminal em ratos, que consiste da constrição do nervo infraorbital (ramo da divisão maxilar do nervo trigeminal) através de 2 amarras frouxas ao redor do mesmo. Após a cirurgia de constrição do nervo infraorbital, os animais desenvolveram sinais de parestesias, disestesia e alodinia mecânica na região inervada pelo nervo trigeminal lesionado (VOS *et al.*, 1994). Interessantemente, os animais submetidos ao modelo de dor neuropática trigeminal desenvolveram hiperalgesia térmica (calor e frio) e mecânica em diferentes tempos, sendo a última desencadeada tardiamente (CHICHORRO, 2006).

### **1.3.2 Participação de células neuronais e não neuronais na dor neuropática**

A nível de medula espinhal, a liberação de neurotransmissores e neuromoduladores como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), substância P e ATP pelas terminações pré-sinápticas de neurônios de primeira ordem podem ativar os astrócitos e a micróglia potencializando a transmissão nociceptiva entre os neurônios de primeira e segunda ordem. Portanto, as células da glia apresentam um papel importantíssimo para o início e manutenção da hiperalgesia e alodinia. (REN e DUBNER, 2008).

Além da função de sustentação de neurônios, os astrócitos são ativados após uma lesão nervosa. Essas modificações estão relacionadas quanto à hipertrofia e aumento da produção de filamentos e conseqüentemente, alteram diretamente a

comunicação neural por encapsular as sinapses (HAYDON, 2001). Os astrócitos aumentam a expressão de vários receptores como receptores ionotrópicos NMDA e não-NMDA, assim como, receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR3 e mGluR5), purinérgicos e neurocininérgicos (NK). A ativação desses receptores desencadeia sinalizações intracelulares reguladas pela ERK e JNK e consequentemente aumento da síntese de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , prostaglandinas E<sub>2</sub> e NO (MILLIGAN e WATKINS, 2009)

Diferentemente dos astrócitos, a micróglia encontra-se quiescente no SNC normal. Então, após o início de um processo neuropático, essas células ativadas apresentam características de hipertrofia, morfologia amebóide, capacidade fagocítica, proliferação e aumento da expressão de vários marcadores de superfícies e receptores. Também há um aumento na produção e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras substâncias como óxido nítrico, ATP, prostaglandinas (SUTER *et al.*, 2007). Esses componentes inflamatórios modulam o processo de dor através do aumento da liberação de mediadores pré-sinápticos como substância P e aminoácidos excitatórios pelos neurônios de primeira ordem (WATKINS e MAIER, 2003; MARCHAND *et al.*, 2005). Da mesma forma, o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras substâncias como óxido nítrico, ATP, prostaglandinas modulam a transmissão dolorosa através da alteração da excitabilidade pós-sináptica ao modificar a expressão de receptores AMPA e aumentar a sua permeabilidade ao sódio, assim como, ativar de receptores NMDA (KUNER, 2010).

A relação entre a ativação da glia com o comportamento de dor foi descrito pela primeira vez em 1991 em ratos submetidos à constrição do nervo ciático (GARRISON *et al.*, 1991). A ativação da glia tem sido estudada em diferentes modelos animais de dor neuropática após a lesão de nervos periféricos (COLBURN *et al.*, 1997), medula espinhal (HAINS e WAXMAN, 2006) e dor orofacial (SESSLE, 2007). Posteriormente, Marchand *et al.* observaram que a administração de inibidores específicos da ativação microglial, como a minociclina, reduzia significativamente o desenvolvimento da nocicepção em ratos submetidos à lesão da medula espinhal. Além disso, a minociclina atenuou a indução de c-Fos promovida pela estimulação nociva (MARCHAND *et al.*, 2009).

Em relação ao local da lesão, ocorre o recrutamento e proliferação de elementos não neuronais como células de Schwann, mastócitos, macrófagos, células T que liberam fatores como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocinas, prostaglandinas e fator de crescimento neural (NGF) (MARCHAND *et al.*, 2005). Durante a degeneração Walleriana, as células de Schwann sofrem mudanças na sua funcionalidade e começam a sintetizar uma gama de moléculas, principalmente NGF e TNF- $\alpha$ . Esses fatores iniciam e mantêm as anormalidades sensoriais por atuarem tanto em axônios lesionados quanto nos axônios intactos adjacentes. Além disso, os mesmos também podem ser transportados retrogradamente para os corpos celulares do gânglio da raiz dorsal, onde eles alteram a expressão proteica dos neurônios presentes (SCHOLZ e WOOLF, 2002; MARCHAND *et al.*, 2005). Ressaltaremos a seguir a participação de uma destas substâncias, o TNF- $\alpha$ , que parece ter um papel crucial no desenvolvimento de neuropatias.

### **1.3.3 Papel do TNF- $\alpha$ na dor neuropática**

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular com tempo de meia vida relativamente pequeno. As mesmas são secretadas principalmente, mas não exclusivamente, por células imunológicas como macrófagos, neutrófilos e células T. Outras células responsáveis em liberar citocinas são os queratinócitos, células dendríticas da pele, células de Schwann e células da glia (LEUNG e CAHILL, 2010). As citocinas podem ser caracterizadas com diferentes nomes como: linfocinas (citocina sintetizada por linfócitos), monocinas (citocina sintetizada por monócitos), quimiocinas (citocinas com atividade quimioatrativa) e interleucinas (citocinas sintetizada por um leucócito com atividade em outros leucócitos) (ZHANG e AN, 2007). Mas, atualmente, as citocinas são caracterizadas em 5 categorias principais: interleucinas, interferons, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento e quimiocinas (LEUNG e CAHILL, 2010).

As citocinas podem atuar de forma autócrina ou parácrina, e em algumas instâncias, as citocinas podem deslocar-se a pequenas distâncias para promover sua atividade. A atividade das citocinas pode ocorrer de forma sinérgica como outras

citocinas pró-inflamatórias liberadas em um processo inflamatório ou neuropático. Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias podem controlar a resposta de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG e AN, 2007).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$  é considerado o principal fator em iniciar a cascata de ativação de citocinas (MARCHAND *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  foi descoberto em 1891 por William Coley ao utilizar um extrato de uma mistura de *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens* para tratar tumores. Mas foi somente em 1975 que uma substância do tipo endotoxina foi descrita e nomeada como TNF- $\alpha$  (LEUNG e CAHILL, 2010). O TNF- $\alpha$  é constituído de duas formas ativas, um deles é o TNF- $\alpha$  transmembrânico, o qual é encontrado em membranas das células responsáveis pela sua síntese e apresentado na forma de homotrímero com 26 kDa. O mesmo, após ser clivado pela enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE), dará origem a segunda forma ativa, o TNF- $\alpha$  solúvel com 17 kDa (TRACEY *et al.*, 2008). Acredita-se que ambas as formas interagem com os dois tipos de receptores para o TNF- $\alpha$ : receptor de TNF- $\alpha$  do tipo 1 (TNFR1, p55) ou do tipo 2 (TNFR2, p75), que são constitutivamente expressos e induzíveis, respectivamente (LEUNG e CAHILL, 2010). Embora os domínios extracelulares de ambos os receptores sejam homólogos e a afinidade ao TNF- $\alpha$  seja semelhante, as regiões citoplasmáticas deles são distintas e medeiam eventos diferentes (MAZZON *et al.*, 2008). A ativação desses receptores pode desencadear mecanismos que controlam tanto a sobrevivência quanto a morte celular, dependendo do estado metabólico em que a célula se encontra. O TNFR1 transmite o sinal de apoptose celular através do recrutamento e ligação de proteínas adaptadoras TRAF, RAIDD, FADD e RIP ao domínio citoplasmático do receptor e da ativação de duas vias distintas: caspase e proteína quinase JUN. O sinal de sobrevivência é desencadeado pela ativação de TNFR1 e 2 dependentes da via TRAF promovendo a fosforilação de MAPK p38 e quinases reguladoras de sinais extracelulares (ERK 1 e 2) e liberação da forma ativa do fator nuclear  $\kappa$ B e conseqüentemente, a regulação da expressão gênica de citocinas (SHUBAYEV e MYERS, 2001; TRACEY *et al.*, 2008; MYERS e SHUBAYEV, 2011). A via da MAPK p38 recebe uma merecida atenção, pois a administração de inibidores da p38 reduz a alodinia mecânica induzida pela ligação do nervo espinal. Ainda, a administração de Ac-anti-TNF- $\alpha$  além de reduzir a hiperalgesia

mecânica demonstrada no mesmo trabalho também bloqueou a ativação da MAPK p38 (SCHAFERS *et al.*, 2003).

Existe um grande debate em relação ao papel dos receptores do TNF- $\alpha$  na dor neuropática. Alguns autores sugerem que o receptor de TNFR2 não apresenta papel principal na sinalização envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia após lesão nervosa, uma vez que, somente a administração de Ac-Anti-TNFR1 foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela constrição do nervo ciático (SOMMER *et al.*, 1998). Posteriormente, outros autores mostraram que, após a constrição do nervo ciático, a expressão gênica de ambos os receptores estavam aumentada nos dias 3 e 7, contudo, a expressão do TNFR2 manteve-se elevada por 28 dias (GEORGE *et al.*, 2005). Além disso, Vogel *et al.* implicam a relação da ausência de desenvolvimento de hiperalgesia ao calor em camundongos TNFR1<sup>-/-</sup> e redução da alodinia mecânica e ao frio em camundongos TNFR1<sup>-/-</sup> e TNFR2<sup>-/-</sup> após a lesão do nervo ciático, comparando-os com animais do tipo selvagem (VOGEL *et al.*, 2006).

Como mencionado anteriormente, a neuralgia trigeminal é uma patologia de difícil tratamento e atualmente novas estratégias farmacológicas têm sido exploradas para o tratamento de condições patológicas que não respondem aos analgésicos comumente utilizados. Evidências apontam para a importante participação de citocinas, particularmente do TNF- $\alpha$ , em desencadear a dor neuropática como foi observado em modelo de lesão de nervo sural (JUNGER e SORKIN, 2000) e em modelo de artrite em ratos (BOETTGER *et al.*, 2008). Além disso, acredita-se que a expressão proteica do TNF- $\alpha$  e seu RNAm possa ocorrer dentro de 1 semana, com pico no local da lesão entre o dia 1 e 5 após lesão do nervo ciático (SHUBAYEV e MYERS, 2001). Portanto, uma terapia anti-citocinas pode ser uma nova forma de tratamento. Entre essas terapias, destaca-se o etanercept (Eta), um dímero, cuja fusão proteica do domínio de ligação extracelular da região Fc(p75) do receptor tipo 2 do TNF- $\alpha$  com o domínio Fc da imunoglobulina (Ig) G1 humana confere a droga a capacidade de ligar ao TNF- $\alpha$  impedindo a interação do mesmo com seus receptores e então bloqueando a atividade biológica do TNF- $\alpha$  (MOHLER *et al.*, 1993).

Existem evidências sobre a efetividade dessa droga em reduzir a dor provocada pela artrite reumatóide em modelos animais (BOETTGER *et al.*, 2008) e em humanos

(MORELAND *et al.*, 1997; COMBE *et al.*, 2009). Em adição, a terapia anti-TNF- $\alpha$  em humanos também é efetiva na psoríase moderada e severa (SEGAERT, 2009). O uso dessa droga nessas patologias foi aprovado pelo órgão regulamentador de alimentos e drogas dos Estados Unidos da América, o FDA (*Food and Drug Administration*). Porém, essa agência já identificou alguns casos raros de reações cutâneas sérias incluindo eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica associada ao uso de terapias anti-TNF- $\alpha$ , principalmente ao infliximabe, excluindo a priori a relação desses eventos com o uso etanercept e adalimumabe, pois mais estudos são necessários com essas últimas drogas (BONNEL, 2008). Outros eventos adversos relatados em um estudo clínico duplo-cego em pacientes tratados com terapia anti-TNF- $\alpha$  foram leucopenia, neutrofilia, trombocitopenia e pancitopenia (COMBE *et al.*, 2009)

O etanercept é efetivo também em modelos animais de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático (SOMMER, SCHAFERS *et al.*, 2001), compressão do gânglio da raiz dorsal (WATANABE *et al.*, 2011) e associada à diabetes (DOGRUL *et al.*, 2011). Além disso, em um estudo randomizado, observou-se que o efeito do etanercept na polimialgia foi muito discreto, indicando que a participação do TNF- $\alpha$  possa ser pequena (KREINER e GALBO, 2010). Porém, não há dados na literatura sobre a efetividade dessa droga na neuropatia trigeminal.

Esses dados sugerem que, embora a síntese e liberação de TNF- $\alpha$  possa ser crucial no estabelecimento de alguns processos nociceptivos (particularmente neuropáticos) como, por exemplo, na constrição do nervo ciático e neuropatia diabética, esse fato pode não ocorrer em todas as condições patológicas. Portanto, a nocicepção observada em diferentes condições clínicas pode ter características próprias que influenciam na terapêutica a ser utilizada.

## 2 OBJETIVOS

Considerando as evidências de que citocinas participam no desenvolvimento da dor neuropática em modelos que não envolvem o nervo trigêmeo e que a nocicepção orofacial pode apresentar características diferentes daquela observada em outros locais, por sua anatomia ser diferenciada, este estudo objetivou avaliar a participação de citocinas, particularmente o TNF- $\alpha$ , na dor neuropática trigeminal em ratos. Para fins comparativos, avaliamos também a participação de TNF- $\alpha$  em um modelo de dor inflamatória na região orofacial. Para tanto, foi verificada a efetividade do Etanercept comparando com os efeitos da Dexametasona, um antiinflamatório esteroidal. A preferência pelo uso desse anticorpo anti-TNF- $\alpha$  neste modelo é devido à disponibilidade desta droga para o tratamento em outras patologias, como artrite reumatóide, na qual há eficácia comprovada.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação do TNF- $\alpha$  na hiperalgesia térmica (calor e frio) e mecânica no modelo de dor inflamatória na região orofacial induzida pela carragenina após o tratamento com etanercept (anti-TNF- $\alpha$ , Enbrel<sup>®</sup>) e comparar com os resultados obtidos com a dexametasona.

- Analisar a participação do TNF- $\alpha$  na hiperalgesia térmica (calor e frio) e mecânica no modelo de dor neuropática trigeminal, através da constrição do nervo infraorbital em animais tratados com etanercept (anti-TNF- $\alpha$ , Enbrel<sup>®</sup>) e comparar com os resultados obtidos com a dexametasona antes ou após do processo neuropático estar instalado.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, que pesavam entre 170-240 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Paraná e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, com temperatura e luz controlada, respeitando o ciclo claro e escuro de 12/12 h e com acesso livre a ração e água. No mínimo 2 dias antes dos experimentos os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação e agrupados em 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa e durante a fase clara do ciclo do animal, mantendo o controle de temperatura do ambiente entre  $22 \pm 1$  °C. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob o número de autorização 499.

##### 3.1.3 Reagentes, drogas e soluções

Foram empregados os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- Carragenina Lambda tipo IV (Sigma, St Louis, MO, EUA)
- Dexametasona (Cort-Trat<sup>®</sup>, Química Santa Marina S.A, RJ, Brasil)
- Enrofloxacino 10% (Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda, PR, Brasil)
- Etanercept, Anticorpo Anti-TNF- $\alpha$  (Enbrel<sup>®</sup>, gentilmente fornecida pela AMGEN Indústria de Biotecnologia)



- Cloridrato de Xilasina (Kensol<sup>®</sup>, Laboratório König S.A., Avellaneda, Argentina)
- Quetamina Injetável Vetnil (Vetecia Laboratório de Produtos Veterinários Ltda, SP, Brasil)
- Solução salina estéril 0,9% (Samtec Biotecnologia, SP, Brasil)

As soluções de carragenina, dexametasona, enrofloxacino, etanercept, quetamina e xilasina foram preparadas em solução salina estéril.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Estimulação por Carragenina

O modelo de dor inflamatória segue o método proposto previamente por Chichorro *et al.* (CHICHORRO, ZAMPRONIO, SOUZA *et al.*, 2006). Para tanto, os limiares basais para estimulação térmica ou mecânica foram determinados, conforme descrito a seguir, no dia do estímulo. Em seguida, os animais foram tratados com as diferentes drogas e após o tratamento receberam uma injeção subcutânea no lábio superior de Cg (50 ou 100 µg /sítio) ou o mesmo volume de salina (50 µl). Após a aplicação do agente flogístico, foram avaliadas as mudanças de comportamentos dos animais através da estimulação térmica (frio e calor) ou mecânica.

### 3.2.2 Construção do nervo infraorbital (CNIO)

A CNIO foi realizada conforme proposto por Chichorro *et al.* (CHICHORRO, 2006). Para tanto, os limiares basais para estimulação térmica ou mecânica foram determinados conforme descrito a seguir. Em seguida, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (90 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e após a tricotomia da região orofacial realizou-se a assepsia com

álcool iodado. Em seguida realizou-se uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevados do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que o nervo infraorbital fosse exposto próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi cuidadosamente dissecado dos tecidos adjacentes e posteriormente, foram realizadas duas amarras frouxas ao seu redor, com fio de seda 4.0 e separadas entre si por aproximadamente 2 mm. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio de seda. Os animais do grupo falso-operados (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém as amarras não foram colocadas no nervo infraorbital (CHICHORRO, 2006). Após o término da cirurgia, os animais foram mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia e tratados com antibiótico enrofloxacino, 5 mg/kg por via s.c., 1 vez ao dia por 3 dias (MITCHELL, 2006).

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

Durante a estimulação ao calor, os animais foram imobilizados pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante de aproximadamente 50 °C foi posicionada há 1,0 cm da área de inserção das vibrissas. Em seguida, registrou-se o tempo de latência, ou seja, o tempo decorrido entre o início da estimulação térmica e o momento em que os animais afastaram a cabeça da fonte de calor ou apresentaram movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas. Foram incluídos nos experimentos apenas os animais que apresentaram tempos de latência entre 9 – 15 s (média de 2 avaliações) e o período máximo de exposição (tempo de corte) foi 20 s para evitar danos teciduais (IMAMURA *et al.*, 1997; CHICHORRO, 2006; LUIZ *et al.*, 2010). A redução do tempo de reação após a injeção com Cg ou CNIO foi considerada como indicativo de hiperalgesia ao calor.

### 3.2.4 Estimulação térmica por frio

Os animais foram previamente habituados em caixas de observação de vidro por aproximadamente 40 min e posteriormente, aplicou-se o spray de tetrafluoretano, por cerca de 1,0 s na região inervada pelo nervo infraorbital. Imediatamente após a aplicação, foi contabilizado o tempo que o animal permaneceu executando o comportamento de *grooming* facial bilateral (movimentos de limpeza) dentro de um período de 2 min utilizando um cronômetro. O estímulo foi realizado duas vezes com um intervalo de no mínimo 15 min e a média entre os 2 resultados foi calculada. Os animais que apresentaram a média de tempo de *grooming*  $\leq 15$  s foram incluídos no estudo (CHICHORRO, 2006). O aumento do tempo executando o movimento de *grooming* facial após a injeção com Cg ou CNIO foi considerado como indicativo de hiperalgesia ao frio.

### 3.2.5 Estimulação mecânica

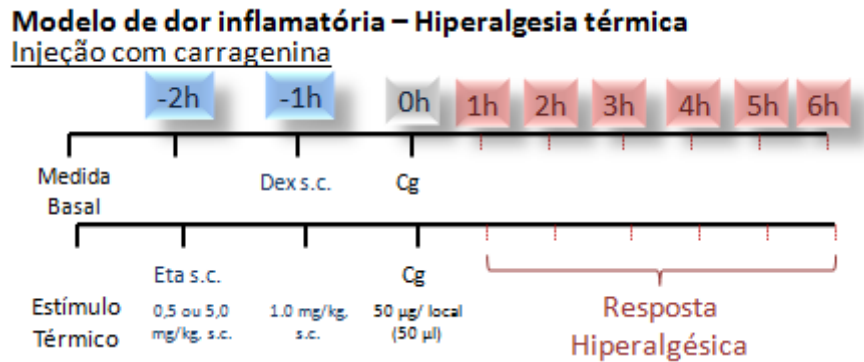
O método para a estimulação mecânica foi realizado com algumas modificações da metodologia apresentada por Denadai-Souza e colaboradores (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Assim, os animais foram previamente habituados em caixas de observação por 30 min. Os ratos foram imobilizados parcialmente pelo experimentador e utilizando um analgesímetro eletrônico foi observada a força, em g, necessária para provocar o comportamento de retirada da cabeça do animal frente ao estímulo mecânico. O procedimento consiste da aplicação de 3 estímulos mecânicos sucessivos na área de inserção das vibrissas. Este procedimento foi realizado por 2 dias a fim de acostumar o animal com o procedimento e portanto reduzir o estresse decorrente da manipulação dos mesmos. No terceiro dia, foi observado o limiar mecânico desses animais. Foram incluídos nos experimentos apenas os animais que apresentaram respostas entre 20 – 30 g a partir da aplicação do estímulo. A redução do limiar mecânico após a aplicação de Cg ou CNIO foi considerada indicativo de hiperalgesia mecânica.

### 3.2.6 Protocolo experimental.

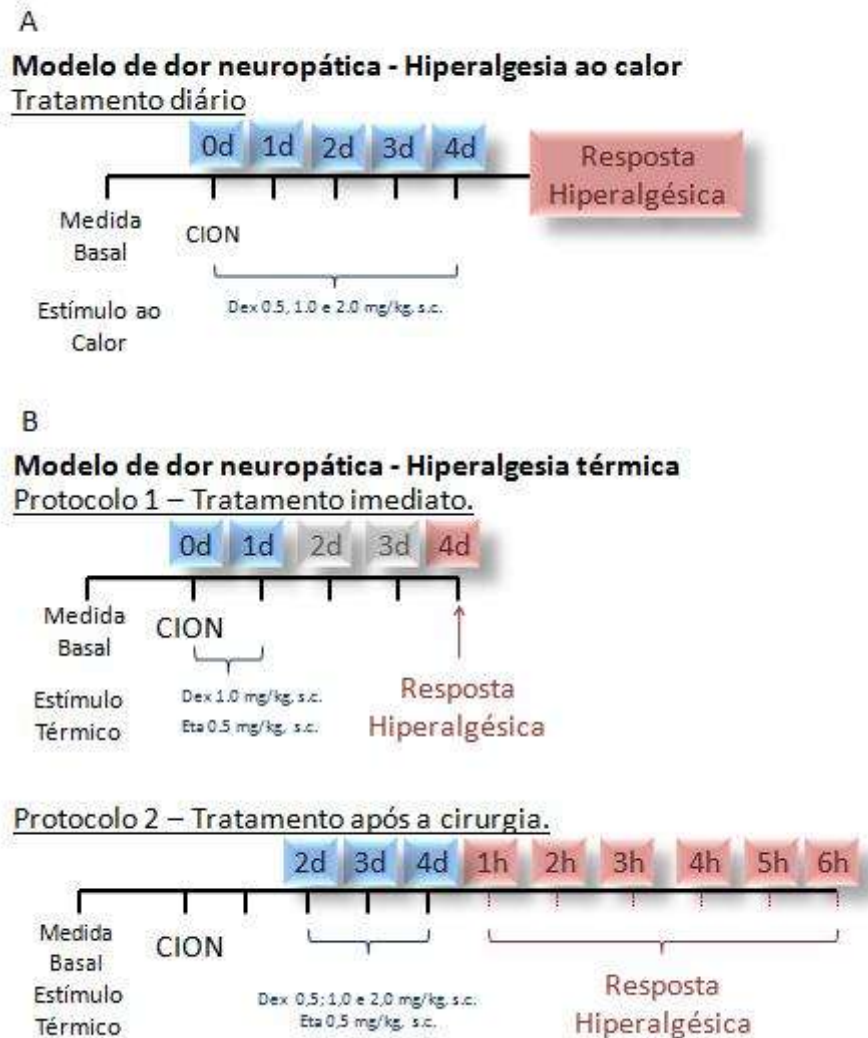
O primeiro objetivo foi avaliar o envolvimento das citocinas, particularmente o papel do TNF- $\alpha$ , na hiperalgesia térmica induzida pela injeção com Cg em um estímulo inflamatório. Para isso, foi determinado o limiar basal de diferentes grupos de animais para a hiperalgesia ao calor e frio. Antes da aplicação do agente flogístico, esses animais foram tratados com uma dose padrão de Dex (1,0 mg/kg, s.c.) ou diferentes doses de Eta (0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.), conforme descrito anteriormente (MAZZON *et al.*, 2008). Uma hora após o tratamento com Dex ou 2 h após o tratamento com Eta os animais receberam uma injeção de Cg na dose de 50  $\mu$ g/sítio em 50  $\mu$ l no lábio superior ou o mesmo volume de veículo. Então, após a aplicação de Cg, observou-se a variação da resposta hiperalgésica ao calor ou frio dos animais a cada hora por 6 h (Figura 1).

Para estabelecer um protocolo efetivo para os tratamentos com Dex e Eta na hiperalgesia térmica após CNIO, primeiramente foi realizado um experimento de hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO. Os mesmos foram tratados com diferentes doses de Dex (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg, s.c.) ou veículo no dia da cirurgia e nos dias subsequentes até o 4º dia. A hiperalgesia ao calor foi mensurada somente no lado ipsilateral no 4º dia, 1 h após a última dose por 6 h (Figura 2 A). Nos experimentos subsequentes, com o objetivo de avaliar em qual fase do processo neuropático haveria o envolvimento das citocinas, foram executados 2 protocolos. Primeiramente, os animais foram tratados com a menor dose efetiva de Dex, determinada pelo experimento anterior somente no dia da cirurgia (dia 0) e no dia subsequente (dia 1) (tratamento na fase inicial do processo neuropático) e a hiperalgesia térmica foi avaliada no 4º dia (Figura 2 B). Alternativamente, os animais foram tratados nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia (tratamento tardio) com a mesma dose de Dex. A hiperalgesia térmica foi avaliada, somente no lado ipsilateral, no 4º dia 1 h após o último tratamento em intervalos de 1 h por 6 h (Figura 2 B). Uma vez que, o tratamento com Dex na fase inicial (dias 0 e 1) foi efetivo enquanto que o tratamento tardio (dias 2, 3 e 4) foi inefetivo, esses protocolos foram utilizados para avaliar o efeito do Eta (0,5 mg/kg, s.c) na hiperalgesia ao calor e da Dex e Eta na hiperalgesia ao frio.

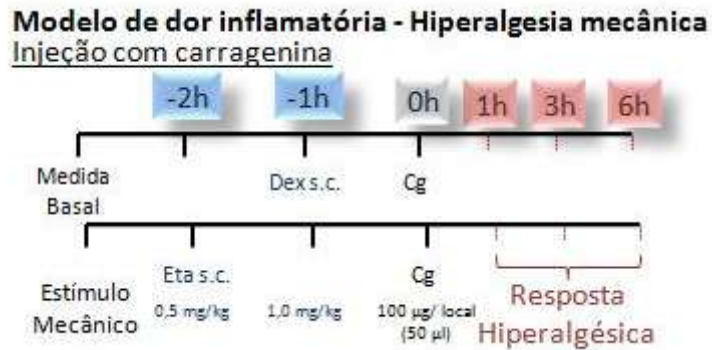
A avaliação do papel do TNF- $\alpha$  na hiperalgesia mecânica seguiu de forma semelhante aos protocolos experimentais utilizados na hiperalgesia térmica. Para isso, avaliou-se o limiar mecânico em diferentes grupos de animais e subsequentemente os mesmos foram tratados com veículo ou a dose padrão de Dex (1,0 mg/kg, s.c.) ou com a menor dose efetiva de Eta (0,5 mg/kg, s.c.). Após 1 h do tratamento com Dex e 2 h com Eta, os animais receberam uma injeção de Cg na dose de 100  $\mu$ g/ sítio em 50  $\mu$ l ou veículo (salina 0.9%) no lábio superior. As mudanças do limiar mecânico foram avaliadas 1, 3 e 6 h após a aplicação do agente flogístico, somente no lado ipsilateral (Figura 3). Para avaliar a hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO, os animais foram submetidos aos protocolos de tratamento na fase inicial ou tardia do processo neuropático. O primeiro consistiu do tratamento com Dex (1,0 mg/kg, s.c.), Eta (0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) ou veículo (salina para ambas as drogas, s.c.) somente no dia da cirurgia e no dia subsequente. A hiperalgesia mecânica foi mensurada nos dias 6, 10 e 13 somente no lado ipsilateral (Figura 4). O segundo protocolo consistiu do início do tratamento com Dex (1,0 mg/kg, s.c.) ou Eta (0,5 mg/kg, s.c.), no dia em que hiperalgesia mecânica encontrou-se significativamente instalada (dia 10) e nos dias subsequentes (dia 11 e 12). A hiperalgesia mecânica foi avaliada no lado ipsilateral no dia 13 e a cada 3 dias até o 22<sup>o</sup> dia após o procedimento cirúrgico (Figura 4).



**Figura 1 – Protocolo para avaliação da hiperalgisia térmica no modelo de dor inflamatória.** O limiar basal para o estímulo térmico (calor ou frio) foi determinado em diferentes grupos de animais antes da aplicação das drogas. Esses animais então foram tratados com diferentes doses de etanercept (Eta, 0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) duas horas antes da aplicação do agente flogístico ou com uma dose padrão de dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.) uma hora antes da aplicação da Cg. Posteriormente, os mesmos receberam uma injeção de Cg na dose de 50 µg/sítio em 50 µl no lábio superior. Em seguida, foi observada a variação da resposta hiperalgésica ao calor ou frio dos animais a cada hora por 6 h.

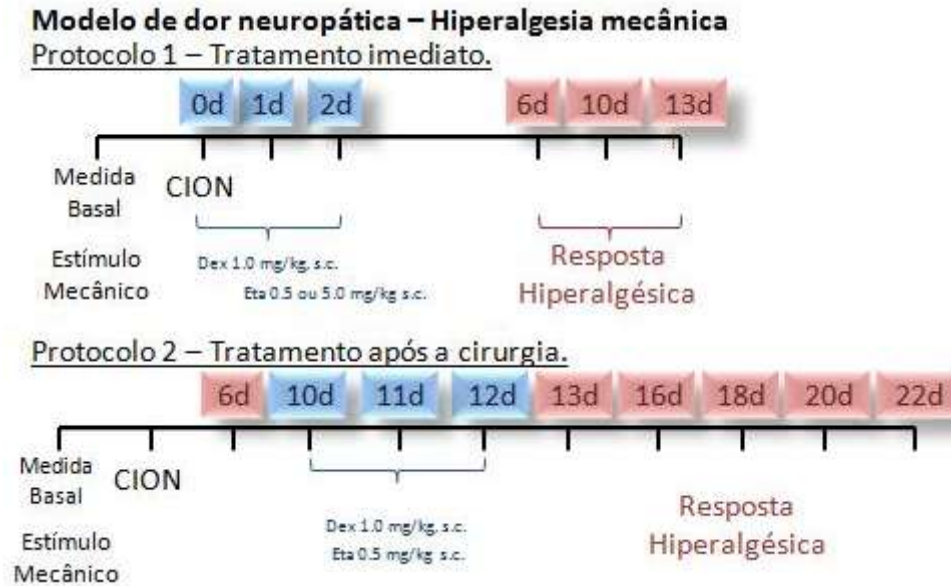


**Figura 2 – Protocolo para avaliação da hiperalgésia térmica no modelo de dor neuropática.** (A) O limiar basal para o estímulo ao calor foi determinado em diferentes animais antes de qualquer procedimento. Posteriormente, os mesmos foram tratados diariamente com diferentes doses de dexametasona (Dex, 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg, s.c.) a partir do dia da cirurgia e nos 4 dias subsequentes. No 4º dia avaliou-se a hiperalgésia térmica dos animais, 1 h após o último tratamento. (B) O protocolo 1 (tratamento imediato) consiste da avaliação da resposta basal ao estímulo térmico (calor e frio) antes de qualquer procedimento e tratamento dos animais com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.) ou etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.) no dia da cirurgia (dia 0) e no dia subsequente (dia 1). No 4º dia avaliou-se a resposta hiperalgésica térmica dos animais. Alternativamente, o protocolo 2 (tratamento após a cirurgia) representa a avaliação da resposta basal ao estímulo térmico (calor e frio) antes de qualquer procedimento e tratamento dos animais nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia com diferentes doses de dexametasona (Dex, 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg, s.c.) ou etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.). A hiperalgésia térmica foi avaliada, no 4º dia 1 h após o último tratamento em intervalos de 1 h por 6 h.



**Figura 3 – Protocolo para avaliação da hiperalgisia mecânica no modelo de dor inflamatória.** O limiar basal para o estímulo térmico (calor ou frio) foi determinado em diferentes grupos de animais antes da aplicação das drogas. Esses animais então foram tratados com etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.) duas horas antes da aplicação do agente flogístico ou com a dose padrão de dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.) uma hora antes da aplicação da Cg. Posteriormente, os mesmos receberam uma injeção de Cg na dose de 100 µg/sítio em 50 µl no lábio superior. Em seguida, foi observada a variação da resposta hiperalgésica ao calor ou frio dos animais 1, 3 e 6 h após a aplicação.





**Figura 4 – Protocolo para avaliação da hiperalgisia mecânica no modelo de dor neuropática.** O limiar basal para o estímulo térmico (calor e frio) foi determinado em diferentes animais antes de qualquer procedimento em ambos os protocolos. Para avaliar em qual fase do processo neuropático haveria o envolvimento das citocinas, foram executados 2 protocolos. O protocolo 1 (tratamento imediato) consiste da avaliação da resposta basal antes de qualquer procedimento e tratamento dos animais com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.) ou diferentes doses de etanercept (Eta, 0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) no dia da cirurgia (dia 0) e nos 2 dias subsequentes (dia 1 e 2). Avaliou-se a resposta hiperalgésica mecânica dos animais nos dias 6, 10 e 13 após a CION. Alternativamente, o protocolo 2 (tratamento após a cirurgia) representa a avaliação da resposta basal antes de qualquer procedimento e tratamento dos animais nos dias 10, 11 e 12 após a cirurgia com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.) ou etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.). A hiperalgisia mecânica foi avaliada nos dias 6, 10, 13, 16, 18, 20 e 22.

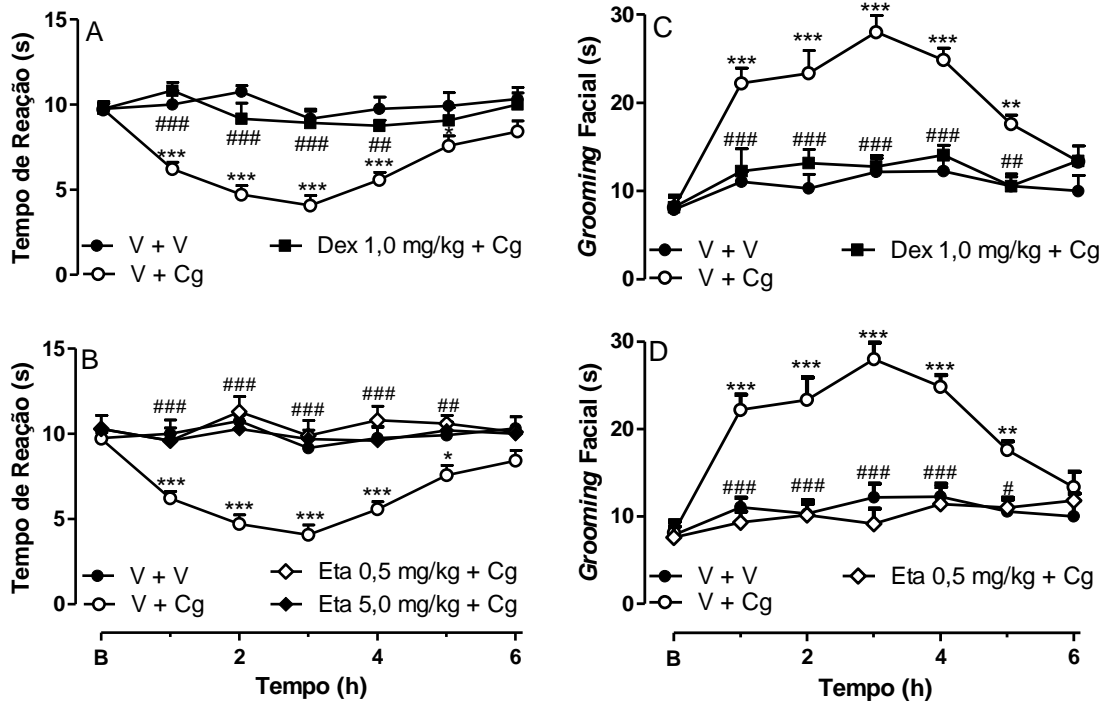
### 3.2.7 Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de reação (em s) para a hiperalgesia ao calor, do tempo despendido realizando o *grooming* facial (em s) para a hiperalgesia ao frio e limiar mecânico para a hiperalgesia mecânica (em g). Os dados experimentais obtidos foram analisados pelo teste estatístico de ANOVA de duas vias de medida repetidas seguida do teste de Bonferroni para verificar a influência de diferentes tratamentos na mudança comportamental em diferentes tempos. Para verificar o efeito de diferentes tratamentos na mudança comportamental em um tempo específico (4º dia) foi utilizado o teste estatístico de ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. Em todas as análises, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.

A fim de avaliar a participação das citocinas, principalmente do TNF- $\alpha$ , em uma condição inflamatória, foi analisada a variação da resposta hiperalgésica térmica induzida pela Cg em animais tratados com Eta e Dex. A administração de veículo não reduziu o tempo de reação e não aumentou o *grooming* facial dos animais estimulados ao calor e frio, respectivamente, durante todo o tempo analisado comparado com os níveis basais. Contudo, a administração de Cg induziu hiperalgesia frente a ambos os estímulos térmicos, a qual foi significativa a partir da 1<sup>a</sup> hora, perdurando até a 5<sup>a</sup> hora e retornando aos níveis basais na 6<sup>a</sup> hora (Figura 5). O tratamento dos animais com Dex (1,0 mg/kg, s.c.) (Figura 5 A) ou diferentes doses de Eta (0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) (Figura 5 B) aboliu a hiperalgesia ao calor induzida pela Cg na região orofacial. De forma semelhante, o tratamento com Dex ou Eta, na menor dose efetiva observada no experimento anterior, também foi capaz de abolir a hiperalgesia ao frio neste modelo (Figura 5 C e D, respectivamente).



**Figura 5 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina.** O estímulo ao calor (A e B) ou ao frio (C e D) foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Posteriormente, os animais foram tratados com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c., 1 h), etanercept (Eta, 0,5 ou 5,0 mg/kg s.c., 2 h) ou o mesmo volume de veículo (V, salina, s.c.) antes da injeção de carragenina (Cg, 50 µg) ou veículo (V, 50 µl) no lábio superior. A hiperalgesia térmica foi avaliada a cada hora por 6 h. Os valores representam a média ± erro padrão da média do tempo de reação (A e B) ou do tempo despendido executando o *grooming* facial bilateral (C e D), em s após o estímulo ao calor e frio, respectivamente (n= 6 - 7). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 quando comparado com os valores do grupo tratado somente com veículo e # P < 0,05; ## P < 0,01; ### P < 0,001 quando comparado com os valores do grupo tratado com V + Cg (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

## 4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA CNIO.

Os animais falso-operados tratados somente com veículo (salina) não mostraram nenhuma mudança no tempo de reação frente ao estímulo de calor ou no *grooming* facial bilateral para o estímulo ao frio no 4º dia após a CNIO (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10). Todavia, os animais submetidos à CNIO e tratados com veículo mostraram uma diminuição do tempo de reação e aumento do *grooming* facial bilateral (Figuras 6, 7, 8 e 10), no 4º dia após a cirurgia, sendo indicativo de hiperalgesia ao calor e frio, respectivamente.

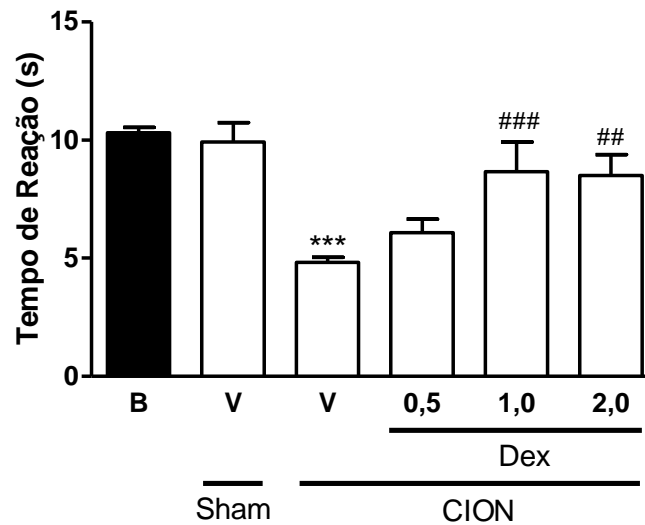
O tratamento diário dos animais com Dex na dose de 0,5 mg/kg por via subcutânea (5 injeções, iniciando no dia da cirurgia até o 4º dia) não modificou a hiperalgesia ao calor induzida por CNIO (Figura 6). Contudo, maiores doses de Dex (1,0 e 2,0 mg/kg, s.c.) aboliram esta resposta (Figura 6). Portanto, o passo seguinte foi avaliar se o tratamento com Dex realizado somente na fase inicial ou somente na fase tardia seria capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor e frio induzida por CNIO. Desta forma, o tratamento na fase inicial (no dia da cirurgia e no dia subsequente) com Dex na menor dose efetiva (1,0 mg/kg) reverteu a hiperalgesia ao calor induzida pela CNIO (Figura 7A). Este protocolo foi aplicado para o tratamento com Eta cuja dose de 0,5mg/kg também reverteu a hiperalgesia ao calor induzida pela CNIO (Figura 7A). Da mesma forma, a administração de ambas as drogas na fase inicial também diminuiu a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CNIO quando comparado a ratos tratados somente com veículo (salina) (Figura 7B).

Contrastando com o resultado anterior, o tratamento tardio com diferentes doses de Dex (0,5; 1,0 ou 2,0 mg/kg, s.c.) foi inefetivo em reverter a resposta hiperalgésica térmica induzida pela CNIO (Figura 8). Sendo assim, para os demais experimentos realizou-se o tratamento dos animais com Dex, na menor dose efetiva observada no tratamento na fase inicial, ou seja, 1,0 mg/kg.

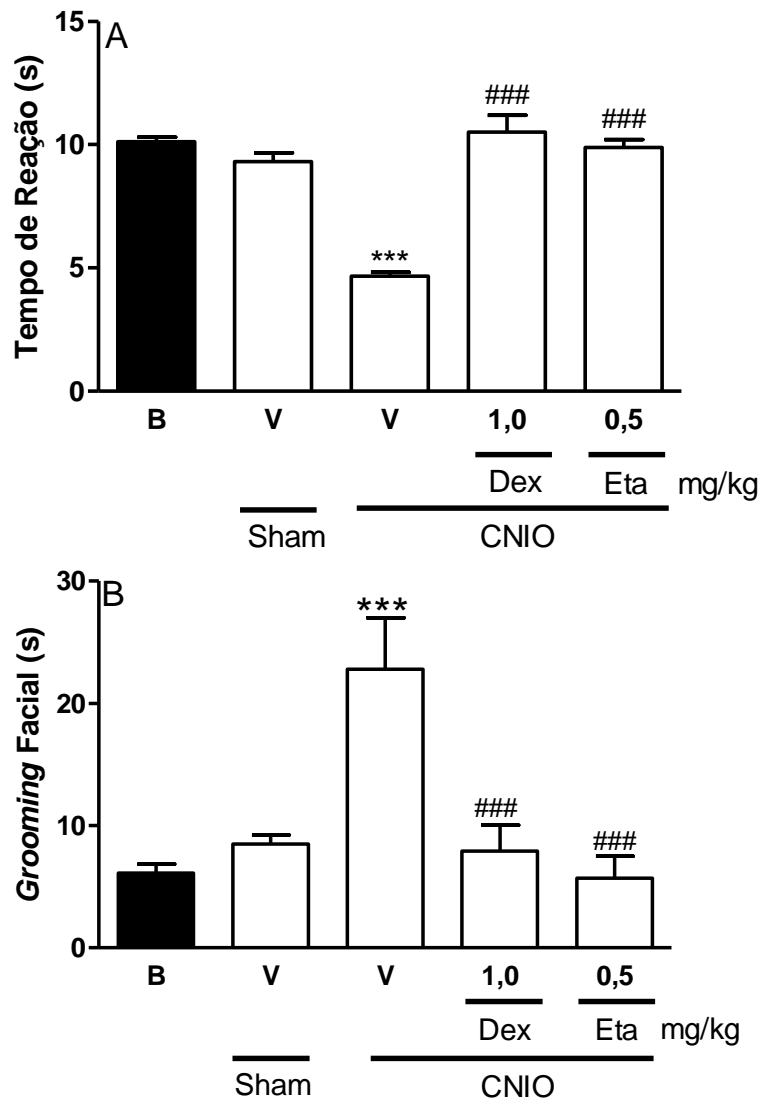
Surpreendentemente, o tratamento tardio com Eta (0.5 mg/kg, s.c.) aboliu a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CNIO (Figura 9 A). De maneira similar, diferente do tratamento com Dex, a administração de Eta reverteu completamente o

aumento do *grooming* facial bilateral induzido pela estimulação ao frio em ratos submetidos à CNIO (Figura 9 B). É importante destacar que a administração de Eta tanto na fase inicial como tardia não alterou a resposta comportamental induzida pelo calor em animais falso-operados (sham) quando comparados aos seus níveis basais (Figura 10 A e B).

É importante ressaltar, para melhor compreensão dos gráficos que representam o tratamento na fase inicial, a justificativa pela qual foi realizada somente uma única medida da resposta hiperalgésica no quarto dia. O tratamento realizado na fase inicial foi finalizado dias antes de medir a alteração comportamental, portanto, esperava-se que não houvesse modificações comportamentais além daquela detectada no quarto dia. Diferentemente do experimento subsequente, onde o tratamento tardio foi concluído no dia em que se mensurava a alteração comportamental havendo necessidade de avaliar a resposta por algumas horas após a última administração de Dex ou Eta.

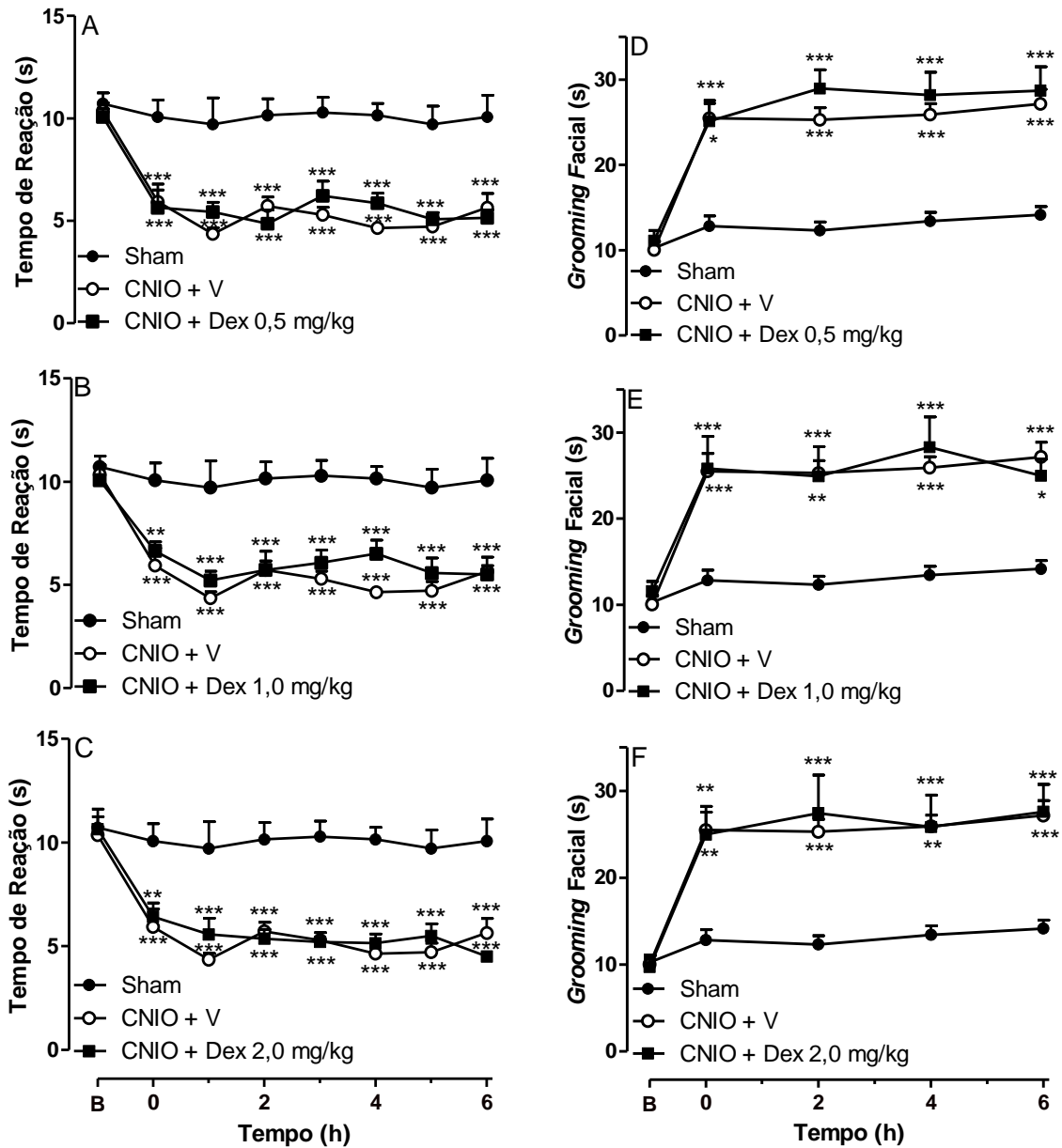


**Figura 6 – Efeito do tratamento diário com dexametasona sobre a hiperalgesia ao calor induzida pela CNIO.** O estímulo de calor foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Então, os animais foram submetidos à CNIO e tratados com diferentes doses de dexametasona (Dex, 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) no dia da cirurgia e nos dias 1, 2, 3 e 4 após a cirurgia. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A resposta hiperalgésica ao calor foi avaliada no 4º dia, 1 h após o último tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de reação, em s, após o estímulo ao calor (n= 5 - 12). \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo Sham e ## P < 0,01; ### P < 0,001 quando comparado ao grupo CION + V (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).

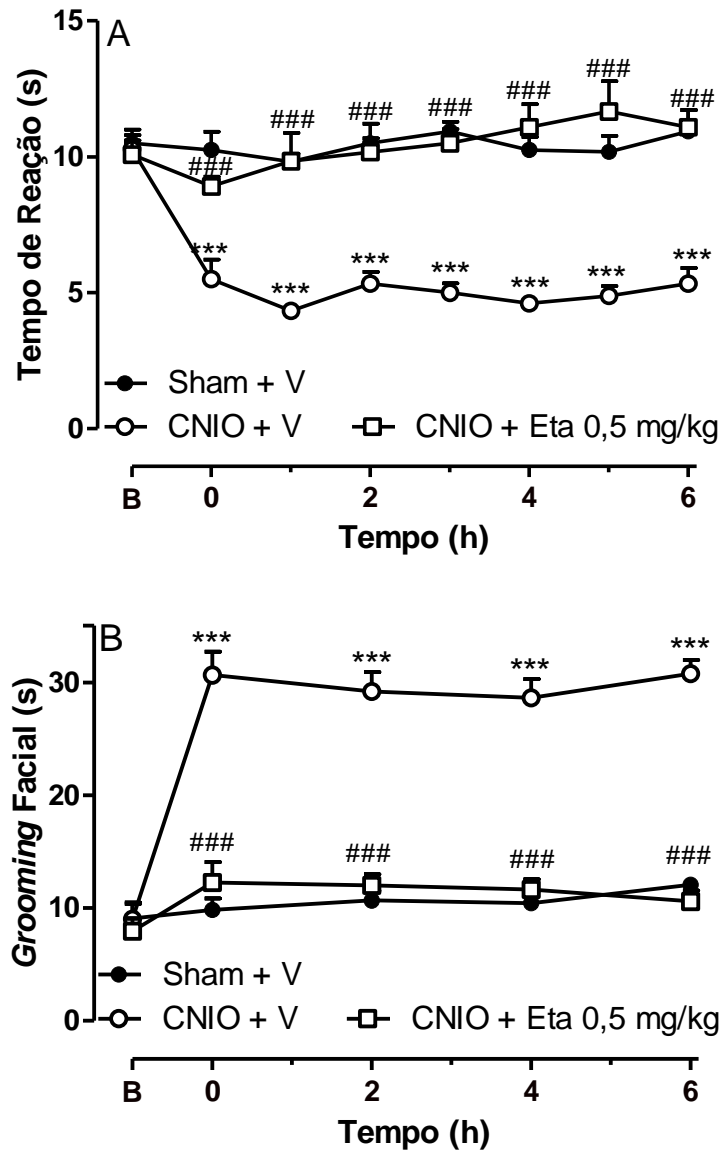


**Figura 7 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na fase inicial do processo neuropático sobre a hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.** Os estímulos de calor (A) ou frio (B) foram aplicados na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (basal, B). Os animais foram então submetidos à CNIO e em seguida tratados com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.), etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) no dia da cirurgia e no dia subsequente. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A hiperalgesia térmica foi avaliada no 4º dia após a cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de reação (A) ou do tempo despendido executando *grooming* facial bilateral (B), ambos em s, após o estímulo ao calor e frio, respectivamente (n= 6 - 13). \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo Sham e ### P < 0,001 quando comparado ao grupo CNIO + V (ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni).



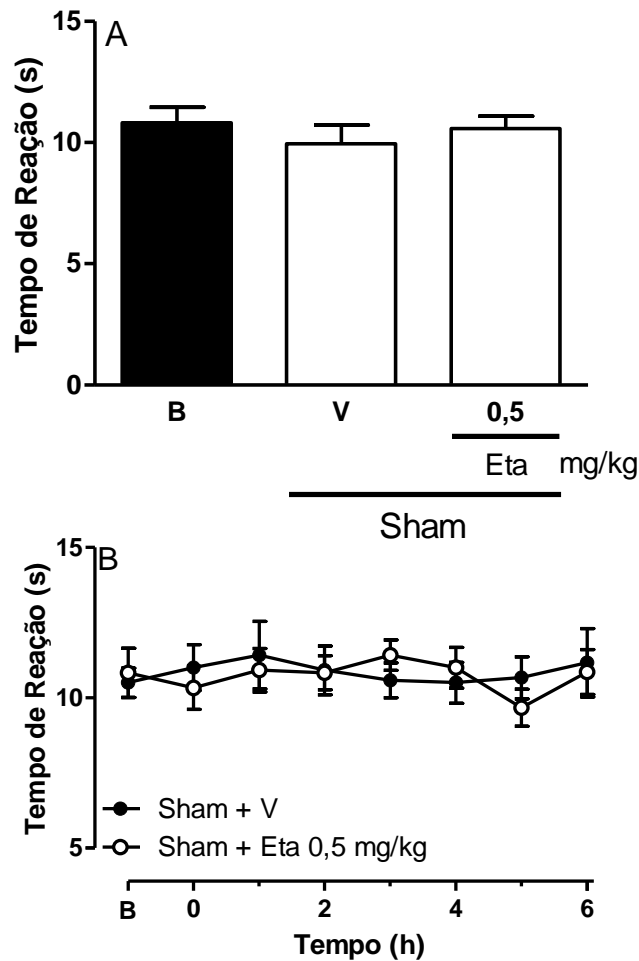


**Figura 8 – Efeito do tratamento tardio com dexametasona na hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.** Os estímulos de calor (A, B e C) ou frio (D, E e F) foram aplicados na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (basal, B). Em seguida os animais foram submetidos à CNIO e então tratados com diferentes doses de dexametasona (Dex, 0,5; 1,0 ou 2,0 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A hiperalgesia térmica foi avaliada no 4º dia a cada hora ou 2 h, respectivamente, por 6 h. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de reação (A, B e C) ou do tempo despendido executando *grooming* facial bilateral (D, E e F), ambos em s, após o estímulo ao calor e frio, respectivamente (n= 6 - 16). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo Sham (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).



**Figura 9 – Efeito do tratamento tardio com etanercept na hiperalgesia térmica induzida pela CNIO.**

Os estímulos de calor (A) ou frio (B) foram aplicados na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (basal, B). Os animais foram então submetidos à CNIO e em seguida tratados com etanercept (0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (salina, s.c.) nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A hiperalgesia térmica foi avaliada no 4º dia a cada hora ou 2 h, respectivamente, por 6 h. Os valores representam a média ± erro padrão da média do tempo de reação (A) ou tempo despendido executando o *grooming* facial bilateral (B), ambos em s, após o estímulo ao calor e frio, respectivamente (n= 6 - 9). \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo Sham e ### P < 0,001 quando comparado com ao grupo CION + V (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

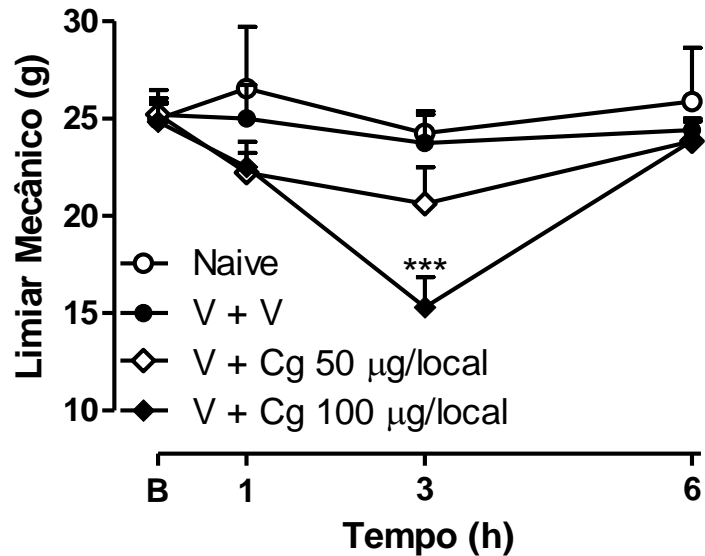


**Figura 10 – Efeito do tratamento inicial ou tardio com etanercept em animais falso-operados sobre a estimulação ao calor.** O estímulo de calor foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Os animais foram submetidos a cirurgia sem constrição do nervo infraorbital (grupo sham) e em seguida foram tratados com etanercept (0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) no dia da cirurgia no dia subsequente (A) ou nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia (B). A hiperalgesia ao calor foi avaliada somente uma vez no 4º dia a cada hora por 6 h, respectivamente. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de reação (A e B), em segundos, após o estímulo ao calor (n= 6 - 8). (A, ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni e B, ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

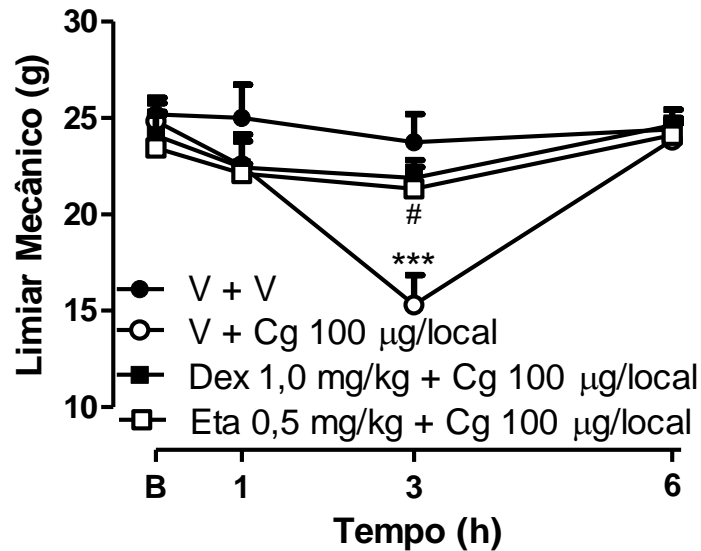
### 4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.

A administração de veículo no lábio superior dos animais não alterou o limiar mecânico dos mesmos, durante todo o tempo analisado (Figura 11). De maneira similar, animais *naive* submetidos à avaliação de hiperalgesia mecânica não apresentaram alteração da resposta comportamental (Figura 11). De forma interessante e diferente da qual foi encontrada na hiperalgesia térmica, a aplicação de Cg na dose de 50 µg/ sítio não foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica nos animais, quando comparados com o grupo tratado somente com veículo. Por outro lado, a aplicação de Cg em uma dose maior (100µg/ sítio) não alterou o limiar mecânico dos animais na primeira hora após a administração, mas promoveu uma diminuição significativa do limiar mecânico desses animais na 3ª hora (Figura 11). Na sexta hora a sensibilidade dos animais a estímulos mecânicos voltou a valores comparáveis aos basais. Portanto, para o experimento seguinte foi utilizada a dose de 100 µg do agente flogístico.

A administração de veículo (salina) a animais tratados com veículo (salina) não alterou significativamente o limiar mecânico dos animais. Como observado anteriormente, a administração de Cg a animais tratados com veículo resultou em uma redução do limiar mecânico somente na terceira hora após administração do agente flogístico (Figura 8). Ambos os tratamentos com Dex ou Eta reduziram significativamente a hiperalgesia mecânica, observada na 3ª h, induzida pela Cg (Figura 12).



**Figura 11 – Hiperalgisia mecânica induzida por carragenina.** O estímulo mecânico foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Em seguida, os animais foram tratados com veículo (V, salina, s.c.) 1 h antes da aplicação de carragenina (Cg, 100 µg/ sítio) ou veículo no lábio superior. Os animais naïve não receberam nenhum tratamento ou aplicação de Cg. A resposta hiperalgésica foi avaliada nas horas 1, 3 e 6 h após a aplicação do agente inflamatório. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do limiar mecânico, em g (n= 4 - 6). \*\* P < 0,01 quando comparado ao grupo V + V (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).



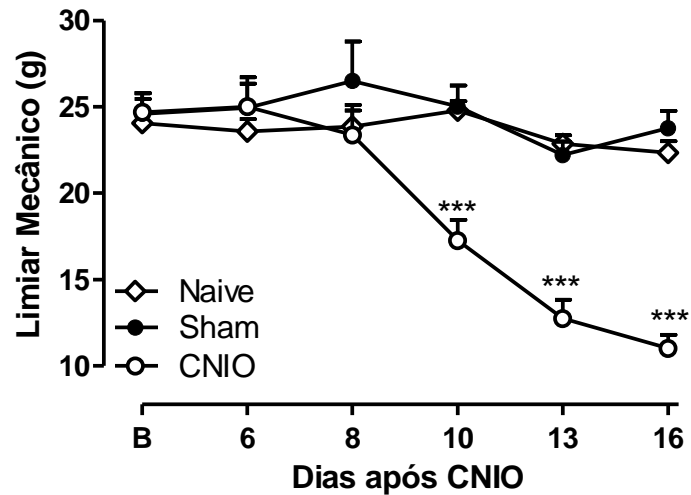
**Figura 12 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.** O estímulo mecânico foi aplicado na na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Em seguida, os animais foram tratados com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c., 1 h), etanercept (Eta, 0,5 mg/kg s.c., 2 h) ou o mesmo volume de veículo (V, salina, s.c.) antes da injeção de carragenina (Cg, 100 µg) ou veículo (50 µl) no lábio superior. A resposta hiperalgésica foi avaliada 1, 3 e 6 h após a aplicação do agente inflamatório. Os valores representam a média ± erro padrão da média do limiar mecânico, em gramas (n= 5 - 6). \*\*\* P < 0,001 quando comparado ao grupo tratado somente com veículo e # P < 0,05; quando comparado ao grupo tratado com V + Cg (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

#### 4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU ETANERCEPT NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA CNIO.

A avaliação do limiar mecânico em grupos de animais *naive*, falso-operados (sham) ou submetidos à CNIO demonstrou que os animais submetidos à CNIO apresentavam uma redução significativa do limiar mecânico no dia 10 persistindo até o dia 16, após a cirurgia, quando comparado com os outros grupos analisados (Figura 13). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos *naive* e falso-operados durante todo o período observado.

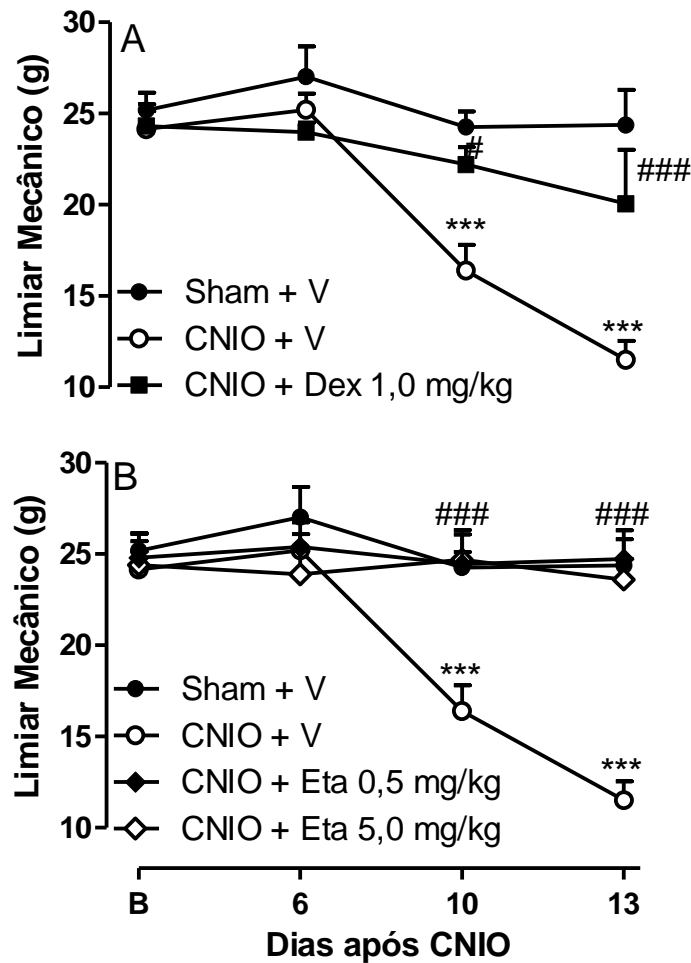
Semelhante ao protocolo com tratamento na fase inicial realizado nos experimentos de hiperalgesia térmica, ratos foram tratados com diferentes doses de Eta (0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) ou Dex (1,0 mg/kg, s.c.) no dia da cirurgia e nos 2 dias subsequentes. Ambos os tratamentos aboliram a hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO nos dias 10 e 13 (Figura 14).

Para executar o protocolo com tratamento tardio, primeiramente foi confirmado se os animais submetidos à CNIO apresentavam uma diminuição do limiar mecânico no 10º dia. Após, os mesmos foram tratados com a menor dose efetiva de Eta observada no experimento anterior ou com a dose padrão de Dex no dia 10, 11 e 12. Surpreendentemente, enquanto o tratamento com Dex não promoveu nenhum efeito antihiperálgico (Figura 15 A), o tratamento com Eta reverteu completamente a hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO no dia 13 perdurando até o dia 16, apesar de não haver tratamento adicional (Figura 15 B). No dia 19 os animais começaram a apresentar uma resposta hiperálgica que no dia 22 encontrava-se semelhante àquele dos animais submetidos à CNIO e tratados com veículo (Figura 15 B).

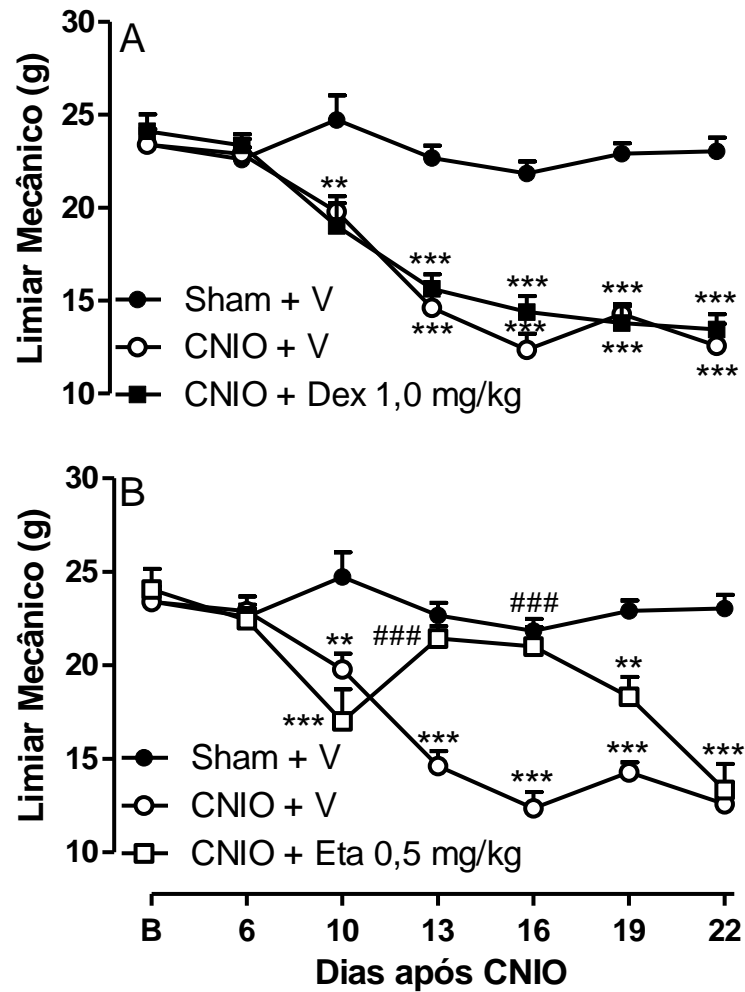


**Figura 13 – Instalação da hiperalgesia mecânica induzida por CNIO.** O estímulo mecânico foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Um grupo de animais permaneceu sem manipulação cirúrgica (naïve) ou enquanto outro foi submetido à falsa operação (sham) ou à CNIO. Nenhum grupo recebeu tratamento. A hiperalgesia mecânica foi avaliada nos dias 6, 8, 10, 13 e 16 após a CNIO. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do limiar mecânico, em gramas ( $n = 6 - 9$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo sham (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).





**Figura 14 – Efeito do tratamento com dexametasona ou etanercept na fase inicial do processo neuropático sobre a hiperálgia mecânica induzida pela CNIO.** O estímulo mecânico foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Os animais foram então submetidos à CNIO e em seguida tratados com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.), etanercept (Eta, 0,5 ou 5,0 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) no dia da cirurgia e nos 2 dias subsequentes. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A hiperálgia mecânica foi avaliada nos dias 6, 10 e 13 após à CNIO. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do limiar mecânico, em gramas ( $n = 5 - 7$ ). \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo sham e ###  $P < 0,001$ ; quando comparado ao grupo CNIO + V (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).



**Figura 15 – Efeito do tratamento tardio com dexametasona ou etanercept na hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO.** O estímulo mecânico foi aplicado na área de inserção das vibrissas no lado ipsilateral antes de qualquer procedimento (B, basal). Os animais foram então submetidos à CNIO e em seguida tratados com dexametasona (Dex, 1,0 mg/kg, s.c.), etanercept (Eta, 0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, salina, s.c.) nos dias 10, 11 e 12. Os animais falso-operados (Sham) receberam somente veículo. A hiperalgesia mecânica foi avaliada nos dias 6, 10, 13, 16, 19 e 22 após à CNIO. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média do limiar mecânico, em gramas ( $n=6-9$ ). \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  quando comparado ao grupo sham e ###  $P < 0,001$ ; quando comparado ao grupo CNIO tratado com veículo (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

## 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo apresentamos evidências que demonstram a importante participação do TNF- $\alpha$  na nocicepção orofacial contribuindo com o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e mecânica decorrente de uma resposta inflamatória aguda ou da constrição do nervo infraorbital. Portanto, o uso de drogas atuando na atividade do TNF- $\alpha$  pode ser uma nova estratégia a ser abordada para controlar a dor orofacial.

O sistema trigeminal apresenta diferenças anatômicas e fisiológicas se comparado com outros nervos periféricos (BONGENHIELM *et al.*, 1999; FRIED *et al.*, 2001), portanto as consequências das lesões no nervo trigeminal podem ser diferentes. Assim, apesar de não haver evidências sobre a participação do TNF- $\alpha$  em modelo de dor inflamatória na região orofacial induzida pela Cg, as informações sobre a nocicepção utilizando modelos de dor inflamatória em pata de animais ou dor neuropática induzida pela constrição de nervos espinhais não devem ser diretamente extrapoladas para a nocicepção orofacial sem avaliações complementares.

Chichorro *et al.* demonstraram o envolvimento de citocinas, entre elas o TNF- $\alpha$ , na dor orofacial. A administração de TNF- $\alpha$  no lábio superior de ratos aumentou o comportamento nociceptivo na fase inflamatória induzida pela aplicação de baixas doses de formalina. Além disso, a injeção de um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de reduzir a fase inflamatória induzida por uma dose mais alta de formalina (CHICHORRO *et al.*, 2004). Posteriormente, Seadi Pereira *et al.* corroboraram e estenderam as observações anteriores demonstrando que o uso de anticorpo anti-TNF- $\alpha$  resultou em diferentes desfechos na nocicepção orofacial induzida pela formalina, uma vez que a injeção local de infliximabe foi capaz de bloquear além da fase neurogênica a fase inflamatória associada à nocicepção induzida por formalina (SEADI PEREIRA *et al.*, 2009). Em adição, Watanabe *et al.* corroboraram os dados sobre a participação de citocinas na dor inflamatória na região orofacial, pois os autores detectaram altos níveis de citocinas no músculo masseter após a inflamação induzida pelo CFA (adjuvante completo de Freund) (WATANABE *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que o TNF- $\alpha$  pode possuir um papel importante em diferentes formas de dor orofacial.

Ainda considerando a dor inflamatória, os resultados seguintes indicam que a participação do TNF- $\alpha$  na nocicepção orofacial induzida pela Cg pode ser semelhante à nocicepção envolvendo os nervos periféricos. Está bem documentado que esta citocina participa da dor inflamatória induzida tanto pela formalina quanto pela Cg, avaliada na pata dos animais (CUNHA *et al.*, 1992; CHICHORRO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2006; SEADI PEREIRA *et al.*, 2009). Mais especificamente, considerando a hiperalgesia ao calor induzida pela Cg, Chou relaciona a redução da hiperalgesia ao calor com a diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  na pata (CHOU, 2003). Posteriormente, Russel *et al.* mostraram que a administração de TNF- $\alpha$  na pata também poderia causar hiperalgesia ao calor (RUSSELL *et al.*, 2009). Em relação à hiperalgesia ao frio, há menos informações disponíveis. Considerando somente modelos que envolvam respostas inflamatórias, foi detectada hiperalgesia ao frio na pata de ratos após a injeção do adjuvante completo de Freund (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Posteriormente, Chichorro *et al.* demonstraram que a hiperalgesia ao frio induzida pela Cg na região orofacial particularmente, está claramente dependente da ocorrência do processo inflamatório uma vez que a resposta hiperalgésica foi bloqueada pela administração de antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (CHICHORRO, ZAMPRONIO, SOUZA *et al.*, 2006). Entretanto, até o presente momento, não foram encontradas informações sobre o papel do TNF- $\alpha$  na hiperalgesia ao frio induzida pela Cg. Portanto, nossos resultados corroboram e estendem os dados anteriores, mostrando que o TNF- $\alpha$  tem uma participação importante na indução tanto da hiperalgesia ao calor quanto da hiperalgesia ao frio na região orofacial, uma vez que, a inibição do TNF- $\alpha$  endógeno pelo tratamento com Eta aboliu a resposta hiperalgésica térmica induzida pela Cg. A administração do controle positivo, a Dex, também foi capaz de abolir essas respostas. Portanto, é possível que outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios sintetizados previamente, além do TNF- $\alpha$ , estejam envolvidos no estabelecimento da hiperalgesia térmica induzida pela carragenina na região orofacial, uma vez que, a atividade farmacológica da Dex ocorra através do bloqueio da síntese de vários mediadores inflamatórios (WANG *et al.*, 2003). Assim, com relação à hiperalgesia térmica em uma condição inflamatória, nossos dados evidenciam pela primeira vez a participação do

TNF- $\alpha$  na região orofacial. Além disso, nossos dados sugerem que o envolvimento dessa citocina pode ser semelhante à sua participação envolvendo outros locais.

O modelo de dor neuropática trigeminal, com constrição do nervo infraorbital foi proposto inicialmente por Vos e Maciewicz em 1991 (VOS e MACIEWICZ, 1991 ). Em 1994, os mesmos autores demonstraram alteração da resposta comportamental ao estímulo mecânico em animais submetidos a esse procedimento (VOS *et al.*, 1994). Em 2006, Chichorro e colaboradores propuseram algumas alterações ao modelo anterior (CHICHORRO, ZAMPRONIO e RAE, 2006), a qual foi seguida para realizar este trabalho e analisar a resposta hiperalgésica térmica e mecânica dos animais.

Em relação à resposta temporal dos animais, Imamura *et al.* mostraram que o pico para a hiperalgesia ao calor ocorreu no 4º dia e perdurou até o 8º dia após a CNIO realizada através de um acesso intraoral (IMAMURA *et al.*, 1997). Corroborando esses dados, Chichorro *et al.* observaram que animais submetidos a CNIO, sendo a cirurgia realizada através de um acesso externo na região posterior às vibrissas, desenvolveram hiperalgesia térmica (calor e frio). Essa alteração sensorial comum em modelos animais de dor neuropática trigeminal ocorreu no 2º dia após a constrição e que persistiu até o 10º dia para o estímulo ao calor e até o 12º dia para o frio (CHICHORRO, 2006). Em adição, os mesmos autores demonstraram que o pico da hiperalgesia ao frio ocorreu do 4º ao 6º dia após a CNIO (CHICHORRO, ZAMPRONIO, SOUZA *et al.*, 2006). Portanto, neste presente trabalho analisou-se a hiperalgesia térmica dos animais no 4º dia após a CNIO para avaliar os efeitos do Eta e da Dex.

Uma vez que a dor neuropática é refratária a vários tratamentos, o primeiro objetivo do presente trabalho foi construir uma curva dose-resposta do tratamento com a Dex, utilizada como controle positivo dos experimentos. Os animais foram tratados com diferentes doses de Dex, no dia da cirurgia e nos 4 dias subsequentes. No 4º dia, 1 h após o último tratamento, avaliou-se a resposta hiperalgésica dos animais ao calor. O tratamento com Dex na dose de 0,5 mg/kg não alterou a resposta hiperalgésica ao calor dos animais submetidos à CNIO. Porém, a administração de maiores doses de Dex foi capaz de abolir completamente essa resposta sugerindo que, durante estes 4 dias iniciais, em algum momento, a síntese de citocinas pode ser importante para o desenvolvimento e estabelecimento da hiperalgesia ao calor. Para determinar se o

efeito da Dex foi devido ao bloqueio da síntese de citocinas que ocorre no início do processo foram utilizados os protocolos de tratamento inicial ou tardio conforme mencionado anteriormente.

O tratamento inicial dos animais com Dex reverteu completamente a hiperalgesia térmica induzida pela CNIO (Figura 7) enquanto que o tratamento tardio não foi capaz de reverter esta resposta (Figura 8). Esses resultados sugerem que a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios nas primeiras horas após a constrição de nervos é essencial para a instalação da hiperalgesia ao calor. Os resultados do presente estudo estão de acordo com Han *et al.* que também demonstraram que somente o tratamento na fase inicial com Dex reduziu a dor neuropática trigeminal induzida por implantes dentários mal posicionados (HAN *et al.*, 2010). Comparativamente, os dados da hiperalgesia ao calor na região orofacial desse estudo estão de acordo com o trabalho de Maves *et al.*, os quais utilizaram um outro modelo de dor neuropática. Esses autores sugerem que o ambiente inflamatório contribui para a instalação da hiperalgesia ao calor (MAVES *et al.*, 1993). Além disso, há evidências sobre a eficácia do tratamento diário com Dex na hiperalgesia ao calor induzida pela constrição do nervo ciático (CLATWORTHY *et al.*, 1995).

Os mesmos protocolos foram testados para a hiperalgesia ao frio e os resultados obtidos foram semelhantes, ou seja, o tratamento com Dex no início do processo foi efetivo em reduzir a hiperalgesia orofacial ao frio, porém o tratamento tardio não obteve o mesmo efeito (Figuras 7 e 8). Contudo, Chichorro *et al.*, em estudos anteriores demonstraram que a administração de Dex no 4º dia em animais submetidos à CNIO reduziu a hiperalgesia ao frio, porém a redução do *grooming* facial bilateral foi extremamente sutil e observada somente nas duas primeiras horas após a administração (CHICHORRO, ZAMPRONIO, SOUZA *et al.*, 2006). Entretanto, no presente estudo, mesmo utilizando uma dose maior ou um tratamento mais prolongado de Dex nenhuma redução significativa foi observada. Portanto, de modo geral, esses resultados em conjunto sugerem que a Dex é efetiva se administrada nas primeiras horas após a CNIO, mas apresenta pequeno ou nenhum efeito em reduzir a hiperalgesia ao calor e ao frio quando a administração é realizada após a neuropatia encontrar-se instalada. Estes resultados podem ser explicados através do estudo

realizado por Uceyler que observou um aumento de RNAm do TNF- $\alpha$  e de outras citocinas nas primeiras horas após a constrição do nervo ciático (UCEYLER *et al.*, 2007) e talvez o perfil da expressão das citocinas na região orofacial possa ser o mesmo. Conseqüentemente, o tratamento com Dex realizado no início do processo neuropático poderia estar inibindo a síntese de citocinas que ocorre neste momento.

Posteriormente, foi avaliado o efeito do Eta na hiperalgesia ao calor e frio induzida pela CNIO executando os mesmos protocolos utilizados anteriormente. Como esperado, o tratamento inicial com Eta na menor dose utilizada, aboliu a hiperalgesia ao frio e ao calor induzida pela CNIO (Figura 7). Watanabe *et al.* observaram resultados semelhantes em pata de ratos após a compressão do gânglio da raiz dorsal. A aplicação local de etanercept no gânglio da raiz dorsal, logo após a cirurgia, diminuiu a hiperalgesia ao calor observada na pata durante 14 dias (WATANABE *et al.*, 2011).

Surpreendentemente, o tratamento tardio com Eta, nos dias 2, 3 e 4 após a cirurgia, também aboliu a hiperalgesia ao calor e frio induzida pela CNIO (Figura 9). De maneira similar, a administração de um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  no 4<sup>o</sup> dia após a cirurgia também reduziu a hiperalgesia ao calor nos modelos de constrição e transecção parcial do nervo ciático (SOMMER, LINDENLAUB *et al.*, 2001). Em outro modelo de dor crônica, Inglis *et al.* mostraram que a administração de Eta, tanto antes quanto depois da indução de artrite em animais, reduziu a hiperalgesia ao calor (INGLIS *et al.*, 2005). Esses resultados em conjunto sugerem que o TNF- $\alpha$  recém-sintetizado não está envolvido somente no estabelecimento da hiperalgesia térmica na região orofacial em ratos, mas também na manutenção da mesma após a CNIO.

A justificativa mais plausível para a diferença de resultados entre a Dex e o Eta é que a expressão de RNAm do TNF- $\alpha$  seja induzida nas primeiras horas após o início do processo neuropático, mas de alguma forma, parte desta citocina pode ser armazenada e liberada posteriormente, como por exemplo, entre o dia 2 e 4. Como a atividade farmacológica da Dex é através do bloqueio da transcrição de RNAm do TNF- $\alpha$ , a sua ação estará restrita somente nas primeiras horas do processo inflamatório após a cirurgia. Por outro lado, a atividade do Eta ocorre através da ligação do anticorpo ao TNF- $\alpha$  endógeno liberado, impedindo a sua ligação com os receptores TNFR1 e TNFR2, portanto, bloqueando sua atividade. Assim o efeito da droga pode ser

evidenciado mesmo após 4 dias. De fato, existem alguns dados na literatura que suportam a nossa hipótese como Loram *et al.* observaram que a concentração de TNF- $\alpha$ , avaliado no local da incisão, encontrava-se significativamente aumentada 48 h após a cirurgia e manteve-se elevada até o 8º dia, em uma relação tempo-dependente, em modelo de dor pós-operatória em ratos (LORAM *et al.*, 2007). Em adição, Üceyler mostrou que expressão de RNAm do TNF- $\alpha$  também encontrava-se aumentada, na região ipsilateral, desde a 1ª hora até 1ª semana após constrição do nervo ciático em camundongos (UCEYLER *et al.*, 2007). Ainda, em 2010, Kato *et al.* também demonstraram o aumento da expressão de RNAm do TNF- $\alpha$  24 h após a lesão do nervo ciático em ratos, aumento este que persistiu até o 5º dia (KATO *et al.*, 2010). Estes dados em conjunto sugerem que os níveis de TNF- $\alpha$  podem manter-se elevados por vários dias. Além disso, em 2001, Shubayev e Myers detectaram um transporte axonal de ambas as formas solúveis de TNF- $\alpha$  (14 kDa e 17 kDa) após a constrição do nervo ciático, deslocando-se do local da lesão para o gânglio da raiz dorsal entre os dias 2 e 5. No dia 7, não se detectou a presença de TNF- $\alpha$  na porção medial do axônio midaxonal. Portanto, esse resultado sugere que a síntese de TNF- $\alpha$  é induzida nas primeiras horas após a constrição do nervo ciático, mas de alguma forma o TNF- $\alpha$  pode ser transportado, em um processo que leva dias, para o gânglio da raiz dorsal para exercer a sua ação. Além disso, a presença do precursor do TNF- $\alpha$ , uma proteína transmembrana de 26 kDa, pode funcionar como suprimento da forma ativa de TNF- $\alpha$  (SHUBAYEV e MYERS, 2001). Se esses mecanismos observados em outros nervos periféricos forem semelhantes ao processo neuropático orofacial após a CNIO, esses resultados podem explicar por que o tratamento tardio com Dex não reduziu a hiperalgia térmica na região orofacial enquanto que o Eta aboliu, uma vez que a administração foi realizada sistemicamente e poderia bloquear a ação do TNF- $\alpha$  no gânglio trigeminal.

Finalmente, foi analisado o mecanismo envolvendo a participação das citocinas, principalmente do TNF- $\alpha$ , na hiperalgia mecânica induzida pela carragenina e CNIO. Para isso, foi realizada uma adaptação do método descrito por Denadai-Souza *et al.* 2009. A metodologia empregada não foi capaz de detectar a hiperalgia mecânica induzida pela Cg na dose utilizada na hiperalgia térmica, 50  $\mu$ g/ sítio. Então, uma



dose maior de Cg (100 µg) foi utilizada, o que causou uma alteração no limiar mecânico na 3ª hora após a aplicação. A administração de Dex ou Eta nos animais bloqueou a hiperalgesia mecânica induzida pela Cg. Esse resultado corrobora estudo anterior descrito por Cunha *et al.* que, apesar do emprego de uma metodologia diferente, mostraram que o TNF- $\alpha$  tem um papel importante no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica na pata de ratos. Uma vez que, o tratamento dos animais com anticorpo contra o TNF- $\alpha$  bloqueou completamente a hiperalgesia induzida pela carragenina administrada na pata desses animais (CUNHA *et al.*, 1992). Em adição, Rocha *et al.* mostraram que o tratamento com talidomida e anticorpo-anti-TNF- $\alpha$  5 min antes da aplicação de Cg reduziu a hiperalgesia mecânica na pata de camundongos (ROCHA *et al.*, 2006). Esses mesmos autores também mostraram que a hiperalgesia mecânica, induzida pela injeção de Cg na pata de animais *knockout* para o receptor de TNF- $\alpha$  p55<sup>-/-</sup>, estava reduzida quando comparados com camundongos do tipo selvagem. Ainda nesse sentido, Oliveira *et al.* também demonstraram que a Cg aumenta os níveis de TNF- $\alpha$  concomitantemente com a indução de hiperalgesia mecânica (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Deste modo, parece que esses mecanismos operam de forma semelhante na região orofacial e o TNF- $\alpha$  exerce, da mesma forma, um papel muito importante no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica frente a um estímulo inflamatório.

Para verificar a hiperalgesia mecânica em animais submetidos à CNIO foi necessário primeiramente padronizar a metodologia empregada. Os grupos naïve e sham não apresentaram alteração do limiar mecânico, diferente dos animais submetidos à CNIO, cuja diminuição da resposta ao estímulo mecânico teve início no 10º dia persistindo até o 13º dia após a cirurgia (Figura 14). Esses resultados são semelhantes aos observados por outros autores utilizando filamentos de Von Frey (G. *et al.*, 2006). Por fim, foi observado o efeito do Eta e da Dex na hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO, conduzindo os experimentos de forma semelhante aos protocolos com tratamentos inicial e tardio, utilizados anteriormente. O tratamento inicial foi realizado no dia da cirurgia e nos 2 dias subsequentes e a hiperalgesia foi observada nos dias 6, 10 e 13, como padronizado anteriormente. A administração de Eta e Dex nesses dias bloqueou completamente a hiperalgesia mecânica induzida pela CNIO. Esses resultados são interessantes, uma vez que, o tratamento foi realizado somente

no início da fase inicial da instalação da dor neuropática. Então, aparentemente os mediadores inflamatórios, particularmente o TNF- $\alpha$ , liberados nos primeiros dias após a CNIO são importantes para o estabelecimento da sensibilização ao estímulo mecânico que somente ocorrerá alguns dias mais tarde. Esses resultados relacionados com a região orofacial estão de acordo com os dados descritos anteriormente por Watanabe *et al.* utilizando o modelo de compressão do gânglio da raiz dorsal, os quais mostraram que a hiperalgisia mecânica foi significativamente inibida pela aplicação local de Eta (WATANABE *et al.*, 2011). Da mesma forma, a administração do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , no dia da cirurgia, atenuou a hiperalgisia mecânica nos modelos de constrição e transecção parcial do nervo ciático (SOMMER, LINDENLAUB *et al.*, 2001).

Interessantes também foram os efeitos dos tratamentos com Eta e Dex após o desenvolvimento da hiperalgisia mecânica. No 10<sup>o</sup> dia após a cirurgia ambos os grupos mostraram uma diminuição significativa da hiperalgisia mecânica. O tratamento com Dex, aplicado no dia 10 e nos 2 dias subsequentes, não foi efetivo em reduzir a hiperalgisia mecânica na região orofacial. Esses resultados são semelhantes às respostas obtidas por Han *et al.*, que mostraram que a Dex só é capaz de reduzir a hiperalgisia mecânica induzida pelo implante dentário mal posicionado em ratos quando administrada no início da instalação do processo neuropático (HAN *et al.*, 2010). Surpreendentemente, o tratamento com Eta realizado nos dias 10, 11 e 12, bloqueou completamente a hiperalgisia mecânica mensurada no dia 13. O efeito continuou evidente até o dia 16 e sua redução começou a ser observada a partir do dia 19 (Figura 15 B). Esses resultados são semelhantes aos que foram encontrados na hiperalgisia térmica. Este resultado pode não ser necessariamente o mesmo observado em outras formas de dor crônica ou processo neuropático envolvendo outras regiões de nervos periféricos, uma vez que as características das lesões e as diferenças anatômicas do nervo trigêmeo podem contribuir para os diferentes efeitos encontrados. Inglis *et al.* observaram que o Eta foi efetivo em reduzir a hiperalgisia mecânica em modelo de artrite em animais induzida pelo CFA, somente quando administrada antes do início do processo inflamatório (INGLIS *et al.*, 2005). Schafers *et al.* mostrou que o tratamento com Eta iniciado nos dias 1 ou 7 após a constrição do nervo espinhal foi inefetivo em atenuar a hiperalgisia mecânica (SCHAFERS *et al.*,

2003). Contudo, o mesmo grupo observou em estudo prévio, utilizando o mesmo modelo, que a aplicação sistêmica de Eta, 6 dias após a cirurgia, reduziu a hiperalgesia mecânica (SOMMER, SCHAFERS *et al.*, 2001). Portanto, são necessários mais estudos para verificar a efetividade do Eta em neuropatias periféricas.

Portanto, pode-se sugerir que a liberação tardia do TNF- $\alpha$ , não previamente sintetizado, mas sim transportado pelo axônio até o gânglio trigeminal (como observado por Shubayev e Myers no gânglio da raiz dorsal) ou a presença do precursor de TNF- $\alpha$ , servindo como suprimento para forma ativa do mesmo, (SHUBAYEV e MYERS, 2001) pode ser importante para a manutenção da hiperalgesia mecânica na região orofacial. Neste sentido, as terapias anti-citocinas, em especial a terapia anti-TNF- $\alpha$ , pode ser mais efetiva para reduzir a dor durante condições neuropáticas do que drogas esteroidais, podendo representar uma importante estratégia a ser avaliada e empregada no controle da dor neuropática na região orofacial.

## 6 CONCLUSÃO

✓ O TNF- $\alpha$  é importante no desenvolvimento da hiperalgesia orofacial térmica (calor e frio) e mecânica, tanto associado a um estímulo inflamatório quanto induzido por lesão do nervo infraorbital.

✓ Os eventos inflamatórios iniciais envolvidos no processo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo infraorbital parecem ser importantes para o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia térmica e mecânica na região orofacial.

✓ A Dex é efetiva em bloquear a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela CNIO quando aplicada no estágio inicial do desenvolvimento da dor neuropática, porém, o tratamento tardio não apresenta a mesma resposta.

✓ O Eta bloqueia efetivamente a hiperalgesia térmica e mecânica independente do momento do processo de dor neuropática em que o fármaco é administrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L. M.; LEI, S.; WILCOX, G. L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*, v. 41, n. 3, p. 309-21, Jun 1990.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol*, v. 2, n. 2, p. 95-106, Feb 2006.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, M., T. (Ed.). *Principle of neuroscience*. New York, 2000. p. 472-491.

BENNETTO, L.; PATEL, N. K.; FULLER, G. Trigeminal neuralgia and its management. *BMJ*, v. 334, n. 7586, p. 201-5, Jan 27 2007.

BOETTGER, M. K.; HENSELLEK, S.; RICHTER, F.; GAJDA, M.; STOCKIGT, R.; VON BANCHET, G. S.; BRAUER, R.; SCHAIBLE, H. G. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 8, p. 2368-78, Aug 2008.

BONGENHIELM, U.; BOISSONADE, F. M.; WESTERMARK, A.; ROBINSON, P. P.; FRIED, K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain*, v. 82, n. 3, p. 283-8, Sep 1999.

BONNEL, R. A. FDA drug safety newsletter. 2008.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 816-24, Oct 23 1997.

CHICHORRO, J. G. *Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental*. (2006). 164 f. (Doctor) - Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2006.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol*, v. 141, n. 7, p. 1175-84, Apr 2004.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 231, n. 6, p. 1136-40, Jun 2006.

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

CHOU, T. C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, v. 139, n. 6, p. 1146-52, Jul 2003.

CHOU, T. C.; CHANG, L. P.; LI, C. Y.; WONG, C. S.; YANG, S. P. The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesth Analg*, v. 97, n. 6, p. 1724-9, Dec 2003.

CLATWORTHY, A. L.; ILLICH, P. A.; CASTRO, G. A.; WALTERS, E. T. Role of periaxonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*, v. 184, n. 1, p. 5-8, Jan 16 1995.

COLBURN, R. W.; DELEO, J. A.; RICKMAN, A. J.; YEAGER, M. P.; KWON, P.; HICKEY, W. F. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol*, v. 79, n. 2, p. 163-75, Nov 1997.

COLBURN, R. W.; RICKMAN, A. J.; DELEO, J. A. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol*, v. 157, n. 2, p. 289-304, Jun 1999.

COMBE, B.; CODREANU, C.; FIOCCO, U.; GAUBITZ, M.; GEUSENS, P. P.; KVIEN, T. K.; PAVELKA, K.; SAMBROOK, P. N.; SMOLEN, J. S.; KHANDKER, R.; SINGH, A.; WAJDULA, J.; FATENEJAD, S. Efficacy, safety and patient-reported outcomes of combination etanercept and sulfasalazine versus etanercept alone in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised 2-year study. *Ann Rheum Dis*, v. 68, n. 7, p. 1146-52, Jul 2009.

COOK, S. P.; VULCHANOVA, L.; HARGREAVES, K. M.; ELDE, R.; MCCLESKEY, E. W. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*, v. 387, n. 6632, p. 505-8, May 29 1997.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, v. 107, n. 3, p. 660-4, Nov 1992.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A., JR.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol*, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A., JR.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory

hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO LDE, L.; RIBELA, M. T.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K.; MUSCARA, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain*, v. 13, n. 8, p. 812-9, Sep 2009.

DOGRUL, A.; GUL, H.; YESILYURT, O.; ULAS, U. H.; YILDIZ, O. Systemic and spinal administration of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, blocks tactile allodynia in diabetic mice. *Acta Diabetol*, v. 48, n. 2, p. 135-42, Jun 2011.

FOLGUERAS, A. R.; VALDES-SANCHEZ, T.; LLANO, E.; MENENDEZ, L.; BAAMONDE, A.; DENLINGER, B. L.; BELMONTE, C.; JUAREZ, L.; LASTRA, A.; GARCIA-SUAREZ, O.; ASTUDILLO, A.; KIRSTEIN, M.; PENDAS, A. M.; FARINAS, I.; LOPEZ-OTIN, C. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 38, p. 16451-6, Sep 22 2009.

FRENCH, A. S. Mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, v. 54, p. 135-52, 1992.

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

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MATSUSHIMA, G. K.; MAIXNER, W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res*, v. 825, n. 1-2, p. 59-67, Apr 17 1999.

G., C. J.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 231, n. 6, p. 1136-40, Jun 2006.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v. 6, n. 2, p. 135-42, Feb 2005.

GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; KAJANDER, K. C.; CARLTON, S. M. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res*, v. 565, n. 1, p. 1-7, Nov 22 1991.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol*, v. 192, n. 1, p. 163-6, Mar 2005.

HAINS, B. C.; WAXMAN, S. G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, v. 26, n. 16, p. 4308-17, Apr 19 2006.

- HAN, S. R.; YEO, S. P.; LEE, M. K.; BAE, Y. C.; AHN, D. K. Early dexamethasone relieves trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res*, v. 89, n. 9, p. 915-20, Sep 2010.
- HAYDON, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 3, p. 185-93, Mar 2001.
- HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 2, p. 83-91, Feb 2001.
- HUNT, S. P.; ROSSI, J. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 308, n. 1136, p. 283-9, Feb 19 1985.
- IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*, v. 116, n. 1, p. 97-103, Aug 1997.
- INGLIS, J. J.; NISSIM, A.; LEES, D. M.; HUNT, S. P.; CHERNAJOVSKY, Y.; KIDD, B. L. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, v. 7, n. 4, p. R807-16, 2005.
- JANNETTA, P. J. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. *J Neurosurg*, v. 26, n. 1, p. Suppl:159-62, Jan 1967.
- JANNETTA, P. J. Neurovascular compression in cranial nerve and systemic disease. *Ann Surg*, v. 192, n. 4, p. 518-25, 1980.
- JOHNSON, R. W. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. *Expert Rev Vaccines*, v. 9, n. 3 Suppl, p. 21-6, Mar 2010.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.
- JUNGER, H.; SORKIN, L. S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain*, v. 85, n. 1-2, p. 145-51, Mar 2000.
- KATO, K.; LIU, H.; KIKUCHI, S.; MYERS, R. R.; SHUBAYEV, V. I. Immediate anti-tumor necrosis factor-alpha (etanercept) therapy enhances axonal regeneration after sciatic nerve crush. *J Neurosci Res*, v. 88, n. 2, p. 360-8, Feb 1 2010.
- KREINER, F.; GALBO, H. Effect of etanercept in polymyalgia rheumatica: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*, v. 12, n. 5, p. R176, 2010.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*, v. 16, n. 11, p. 1258-66, Nov 2010.



LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, v. 2, n. 10, p. 787-95, Oct 2002.

LEMOS, L.; ALEGRIA, C.; OLIVEIRA, J.; MACHADO, A.; OLIVEIRA, P.; ALMEIDA, A. Pharmacological versus microvascular decompression approaches for the treatment of trigeminal neuralgia: clinical outcomes and direct costs. *J Pain Res*, v. 4, p. 233-44, 2011.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation*, v. 7, p. 27, 2010.

LEWIN, G. R.; MOSHOURAB, R. Mechanosensation and pain. *J Neurobiol*, v. 61, n. 1, p. 30-44, Oct 2004.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008.

LORAM, L. C.; THEMISTOCLEOUS, A. C.; FICK, L. G.; KAMERMAN, P. R. The time course of inflammatory cytokine secretion in a rat model of postoperative pain does not coincide with the onset of mechanical hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 85, n. 6, p. 613-20, Jun 2007.

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

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005.

MARCHAND, F.; TSANTOULAS, C.; SINGH, D.; GRIST, J.; CLARK, A. K.; BRADBURY, E. J.; MCMAHON, S. B. Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain*, v. 13, n. 7, p. 673-81, Aug 2009.

MAVES, T. J.; PECHMAN, P. S.; GEBHART, G. F.; MELLER, S. T. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 54, n. 1, p. 57-69, Jul 1993.

MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; GENOVESE, T.; CAMINITI, R.; MELI, R.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S. Effect of tumour necrosis factor-alpha receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clin Exp Immunol*, v. 153, n. 1, p. 136-49, Jul 2008.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 19 1965.

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

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009.

MITCHELL, M. A. Enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v. 15, p. 66-69, 2006/01/01 2006.

MOHLER, K. M.; TORRANCE, D. S.; SMITH, C. A.; GOODWIN, R. G.; STREMLER, K. E.; FUNG, V. P.; MADANI, H.; WIDMER, M. B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol*, v. 151, n. 3, p. 1548-61, Aug 1 1993.

MORELAND, L. W.; BAUMGARTNER, S. W.; SCHIFF, M. H.; TINDALL, E. A.; FLEISCHMANN, R. M.; WEAVER, A. L.; ETTLINGER, R. E.; COHEN, S.; KOOPMAN, W. J.; MOHLER, K.; WIDMER, M. B.; BLOSCH, C. M. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*, v. 337, n. 3, p. 141-7, Jul 17 1997.

MYERS, R. R.; SHUBAYEV, V. I. The ology of neuropathy: an integrative review of the role of neuroinflammation and TNF-alpha axonal transport in neuropathic pain. *J Peripher Nerv Syst*, v. 16, n. 4, p. 277-86, Dec 2011.

NAKAMURA, F.; STRITTMATTER, S. M. P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 19, p. 10465-70, Sep 17 1996.

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, M. Nociception and TRP Channels. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, v. 3, n. 6, p. 479-85, Dec 2004.

OHISHI, S. [Evaluation of time course and inter-relationship of inflammatory mediators in experimental inflammatory reaction]. *Yakugaku Zasshi*, v. 120, n. 5, p. 455-62, May 2000.

OLIVEIRA, M. C.; PELEGRINI-DA-SILVA, A.; TAMBELI, C. H.; PARADA, C. A. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X<sub>3,2/3</sub> receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*, v. 141, n. 1-2, p. 127-34, Jan 2009.

REN, K.; DUBNER, R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol*, v. 21, n. 5, p. 570-9, Oct 2008.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 387, n. 1, p. 111-8, Jan 3 2000.

ROCHA, A. C.; FERNANDES, E. S.; QUINTAO, N. L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol*, v. 148, n. 5, p. 688-95, Jul 2006.

RUSSELL, F. A.; FERNANDES, E. S.; COURADE, J. P.; KEEBLE, J. E.; BRAIN, S. D. Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. *Pain*, v. 142, n. 3, p. 264-74, Apr 2009.

SCHAFERS, M.; SVENSSON, C. I.; SOMMER, C.; SORKIN, L. S. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci*, v. 23, n. 7, p. 2517-21, Apr 1 2003.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, v. 5 Suppl, p. 1062-7, Nov 2002.

SEADI PEREIRA, P. J.; NORONHA DORNELLES, F.; SANTIAGO SANTOS, D.; BATISTA CALIXTO, J.; BUENO MORRONE, F.; CAMPOS, M. M. Nociceptive and inflammatory responses induced by formalin in the orofacial region of rats: effect of anti-TNFalpha strategies. *Int Immunopharmacol*, v. 9, n. 1, p. 80-5, Jan 2009.

SEGAERT, S. Etanercept, improved dosage schedules and combinations in the treatment of psoriasis: an update. *J Inflamm Res*, v. 2, p. 29-36, 2009.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.

SESSLE, B. J. Glia: non-neural players in orofacial pain. *J Orofac Pain*, v. 21, n. 3, p. 169-70, Summer 2007.

SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol*, v. 114, n. 1-2, p. 48-56, Mar 1 2001.

SOMMER, C.; LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; SCHAFERS, M.; HARTUNG, T.; TOYKA, K. V. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res*, v. 913, n. 1, p. 86-9, Sep 14 2001.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M.; MARZINIAK, M.; TOYKA, K. V. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, v. 6, n. 2, p. 67-72, Jun 2001.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol*, v. 151, n. 1, p. 138-42, May 1998.

SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions*, v. 24, n. 3-4, p. 377-80, Jul 1988.

STASSEN, M.; HULTNER, L.; SCHMITT, E. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev Immunol*, v. 22, n. 2, p. 115-40, 2002.

SUTER, M. R.; WEN, Y. R.; DECOSTERD, I.; JI, R. R. Do glial cells control pain? *Neuron Glia Biol*, v. 3, n. 3, p. 255-268, Aug 2007.

TAKAHASHI, K.; SATO, J.; MIZUMURA, K. Responses of C-fiber low threshold mechanoreceptors and nociceptors to cold were facilitated in rats persistently inflamed and hypersensitive to cold. *Neurosci Res*, v. 47, n. 4, p. 409-19, Dec 2003.

THACKER, M. A.; CLARK, A. K.; MARCHAND, F.; MCMAHON, S. B. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg*, v. 105, n. 3, p. 838-47, Sep 2007.

THOMAZZI, S. M.; RIBEIRO, R. A.; CAMPOS, D. I.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. *Mediators Inflamm*, v. 6, n. 3, p. 195-200, 1997.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*, v. 117, n. 2, p. 244-79, Feb 2008.

TRACY, J. A.; DYCK, P. J. The spectrum of diabetic neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, v. 19, n. 1, p. 1-26, v, Feb 2008.

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, n. 4, p. 424-32, Apr 1996.

UCEYLER, N.; TSCHARKE, A.; SOMMER, C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun*, v. 21, n. 5, p. 553-60, Jul 2007.

VINCENT, A. M.; CALLAGHAN, B. C.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol*, v. 7, n. 10, p. 573-83, Oct 2011.

VOGEL, C.; STALLFORTH, S.; SOMMER, C. Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice. *J Peripher Nerv Syst*, v. 11, n. 4, p. 294-303, Dec 2006.

VOS, B. P.; MACIEWICZ, R. J. (Eds.) **Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain.** Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain,. Amsterdam:: Elsevier, p.147-158, Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain,ed. 1991

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci*, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2708-23, May 1994.

WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; BASSILANA, F.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, v. 386, n. 6621, p. 173-7, Mar 13 1997.

WANG, Z. F.; PAN, C. E.; LU, Y.; LIU, S. G.; ZHANG, G. J.; ZHANG, X. B. The role of inflammatory mediators in severe acute pancreatitis and regulation of glucocorticoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, v. 2, n. 3, p. 458-62, Aug 2003.

WATANABE, K.; YABUKI, S.; SEKIGUCHI, M.; KIKUCHI, S.; KONNO, S. Etanercept attenuates pain-related behavior following compression of the dorsal root ganglion in the rat. *Eur Spine J*, v. 20, n. 11, p. 1877-84, Nov 2011.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*, v. 2, n. 12, p. 973-85, Dec 2003.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*, v. 24, n. 8, p. 450-5, Aug 2001.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, v. 14, n. 1, p. 2-31, Jan 1997.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 9 2000.

XU, M.; AITA, M.; CHAVKIN, C. Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. *J Pain*, v. 9, n. 11, p. 1036-48, Nov 2008.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, v. 45, n. 2, p. 27-37, Spring 2007.

ZHUO, M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain*, v. 3, p. 14, 2007.