

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI

INFLUÊNCIA DE VITAMINAS B NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA
INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL DE RATOS

CURITIBA
2012

CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI

INFLUÊNCIA DE VITAMINAS B NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA
INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL DE RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro

CURITIBA
2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kopruszinski, Caroline Machado

Influência de vitaminas B na hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos. / Caroline Machado

Kopruszinski. – Curitiba, 2012.

70 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro

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

1. Neuralgia do trigêmeo 2. Hiperalgesia I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 611.8



1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

2 Ao vigésimo sexto dia do mês de abril do ano de dois mil e doze, às nove horas e
3 quinze minutos, no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências
4 Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da
5 Dissertação de Mestrado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia **CAROLINE**
6 **MACHADO KOPRUSZINSKI**, intitulada: "INFLUÊNCIA DE VITAMINAS B NA
7 HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO DO
8 NERVO INFRAORBITAL DE RATOS", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias
9 Chichorro e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro
10 (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Giles Alexander Rae (UFSC) e Prof. Dr. Roberto
11 Andreatini (Farmacologia - UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A
12 candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em
13 seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta
14 minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão Examinadora
15 emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o Regimento
16 Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada.
17 Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas
18 pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão,
19 da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais
20 Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 26 de abril de 2012.

Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Orientadora – UFPR)

Prof. Dr. Giles Alexander Rae (UFSC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR)



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



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “INFLUÊNCIA DE VITAMINAS B NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL DE RATOS”, de autoria da pós-graduanda **CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro e composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Giles Alexander Rae (UFSC) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - 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, 26 de abril de 2012.

Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Orientadora – UFPR)

Prof. Dr. Giles Alexander Rae (UFSC)

Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR)

*À minha família e amigos, pelo
apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos.

Aos meus amados pais Maria Lúcia e Glaúcio pelo amor incondicional e apoio que me fizeram seguir em frente.

Aos meus queridos tios Alberto, Rosângela e primos Gabriel e Daniel pela amizade, força e carinho.

Aos meus amigos pela paciência, apoio e compreensão.

A Professora Juliana Geremias Chichorro pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, ajuda, dedicação, compreensão, amizade, pelo carinho e por ter acreditado.

As Professoras Joice Maria da Cunha e Janaína Zanoveli pelos valiosos ensinamentos, pela ajuda e carinho sempre.

A minha amiga Renata Cristiane dos Reis pelo apoio, carinho, amizade e sua grande contribuição.

Aos meus amigos do Laboratório de Dor, Fernanda Cassanho Teodoro, Carina Fernanda Mattedi Nones, Carlos Henrique Alves Jesus pela amizade, carinho, força e apoio.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Dor e do Departamento de Farmacologia da UFPR que contribuíram com meu trabalho e tornaram a convivência prazerosa.

A todos os Professores do Departamento de Farmacologia que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários e servidores da Universidade Federal do Paraná pela contribuição.

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

Agradeço também a CAPES/REUNI pelo apoio financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

FIGURA 1. Inervação trigeminal periférica em humanos (A), em ratos (B) e suas ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular.....	14
FIGURA 2. Comparação da intensidade dolorosa entre desordens espinhais e orofaciais usando a escala ordinal <i>McGill Total Rank Pain Index</i> (PRI[T]).....	21
FIGURA 3. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia térmica ao calor induzida por constrição do nervo infraorbital.....	39
FIGURA 4. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia térmica ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital.	40
FIGURA 5. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital.	41
FIGURA 6. Efeito da carbamazepina sobre a hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital.....	43
FIGURA 7. Influência da associação de vitaminas do complexo B com carbamazepina na hiperalgesia térmica ao calor induzida por constrição do nervo infraorbital.....	46
FIGURA 8. Influência da associação da vitamina B12 com carbamazepina na hiperalgesia térmica ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital.....	47
ESQUEMA 1. Influência do tratamento com as vitaminas B1, B6 e B12 e da Carbamazepina isoladamente, ou de cada vitamina em combinação com a Carbamazepina na hiperalgesia a diferentes estímulos aplicados na face dos animais após constrição do nervo infraorbital.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	articulação temporomandibular
ATP	trifosfato de adenosina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CION	constrição do nervo infraorbital
COX-2	ciclooxigenase-2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRG	gânglio da raiz dorsal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.p.	intraperitoneal
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nav	canal de sódio operado por voltagem
NeuPSIG	Comitê de Avaliação de Interesse Especial em Dor
Neuropática	
P2X₃	purinorreceptor ionotrópico
P2Y₂	purinorreceptor metabotrópico
PRI[T]	<i>McGill Total Rank Pain Index</i>
s.c.	subcutânea
SG	substância gelatinosa
SNC	sistema nervoso central
TN	neuralgia do trigêmeo
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
TMP	monofosfato de tiamina
TPP	pirofosfato de tiamina
TRPA1	receptor de potencial transitório anquirina-1
TRPV1	receptor de potencial transitório vanilóide-1
TRPM8	receptor de potencial transitório melastatina-8
TTX	tetrodotoxina

RESUMO

Existem diversos estudos que demonstram que o uso de vitaminas do complexo B pode ajudar no controle da dor neuropática em diversos modelos. Atualmente, apenas a droga carbamazepina, um anticonvulsivante, é aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration (FDA)* para o tratamento da neuralgia trigeminal, mas a sua utilização está associada a inúmeros efeitos adversos. Este estudo fornece evidências de que o uso das vitaminas do complexo B tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) e cianocobalamina (vitamina B12), isoladamente ou em associação com a carbamazepina, atenua a hiperalgesia ao calor, ao frio e mecânica em um modelo de dor neuropática trigeminal em ratos. Nossos resultados mostram que o tratamento diário (durante 5 dias, com início no dia da cirurgia e término no dia 4 pós-cirúrgico) dos animais com as vitaminas B1, B6 e B12, isoladamente nas doses de 180, 180 e 18 mg/kg, respectivamente, por via subcutânea (s.c.), preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor após constrição do nervo infraorbital (CION). Por outro lado, apenas a vitamina B12 (18 mg/kg, s.c., durante 5 dias) foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio, e essa redução foi observada nos dias 6 e 9 após a constrição do nervo. Além disso, apenas o tratamento com a vitamina B6 (180 mg/kg, s.c., durante 5 dias, com início no dia 8 e término no dia 12 pós-cirúrgico) promoveu o aumento do limiar mecânico dos animais submetidos a CION, a partir do dia 10 após a cirurgia e manteve-se até o término do período de avaliação (dia 20 pós-cirúrgico). Adicionalmente, uma única administração intraperitoneal (i.p.) de carbamazepina (30 mg/kg) foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor e ao frio no 4º dia após a lesão do nervo, mas não foi capaz de modificar o limiar mecânico avaliado no 20º dia após o procedimento cirúrgico. A associação de baixas doses de cada vitamina, B1, B6 e B12 (18, 18 e 1,8 mg/kg, s.c., 5 administrações) com a carbamazepina (10 mg/kg, i.p., administração única) reduziu acentuadamente a hiperalgesia ao calor, enquanto a combinação da vitamina B12 com a carbamazepina (mesmas doses acima) promoveu a reversão da hiperalgesia ao frio, ambas avaliadas no dia 4 pós-cirúrgico. Em conclusão, sugerimos que as vitaminas B1, B6 e B12 podem ser uma alternativa ou ser utilizadas como adjuvantes para controlar alguns aspectos da dor em pacientes que sofrem de neuralgia trigeminal. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos antihiperalgésicos dessas vitaminas.

Palavras-chave: Neuralgia do trigêmeo, Constrição, Nervo infraorbital, Hiperalgesia térmica, Hiperalgesia mecânica, Ratos.

ABSTRACT

A growing body of evidence obtained in various pain models, suggests that the use of B complex vitamins can help control neuropathic pain. Currently, only carbamazepine, an anticonvulsant drug, is approved by the Food and Drug Administration American Agency for the treatment of trigeminal neuralgia, but its use is associated with numerous adverse effects. This study provides evidence that B1, B6 and B12 vitamins, alone or in combination with carbamazepine, ameliorate heat, cold and mechanical hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Herein, we demonstrated that repeated subcutaneous (s.c.) treatment (for 5 days, starting on the day of surgery up to day 4 after surgery) of rats with B1, B6 or B12 vitamin (180, 180 or 18 mg/kg, respectively) prevented the development of heat hyperalgesia after constriction of the infraorbital nerve (CION). On the other hand, only B12 vitamin treatment (18 mg/kg, s.c., for 5 days) was able to reduce the cold hyperalgesia and such reduction was observed on days 6 and 9 after CION surgery. Moreover, only B6 vitamin treatment (180 mg/kg, s.c., for 5 days, starting on day 8 up to day 12 post-surgery) promoted an increase in the mechanical threshold of rats submitted to CION, starting on day 10 after surgery and persisting up to day 20 post-surgery. Additionally, a single intraperitoneal (i.p.) administration of carbamazepine (30 mg/kg) was able to reduce heat and cold hyperalgesia on day 4 after nerve injury, but was not able to modify the mechanical hyperalgesia assessed on day 20 post-surgery. The combination of lower doses of all three B vitamins (B1, B6 and B12, at 18, 18 e 1.8 mg/kg, s.c., 5 injections) with carbamazepine (at 10 mg/kg, i.p., single injection) caused a marked reduction of heat hyperalgesia, while the combination of B12 with carbamazepine (same doses above) promoted the reversion of cold hyperalgesia, both evaluated on day 4 post-surgery. In conclusion, we suggest that vitamins B1, B6 and B12 could be an alternative or be used as adjuvants to control some aspects of pain in patients suffering from trigeminal neuralgia. Further studies are necessary to elucidate the mechanisms underlying the antihyperalgesic effects of B complex vitamins.

Key Words: Trigeminal neuralgia, Constriction, Infraorbital nerve, Thermal Hyperalgesia, Mechanical Hyperalgesia, Rats.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	O SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL.....	13
1.2	A NEURALGIA DO TRIGÊMEO.....	18
1.3	CONTROLE FARMACOLÓGICO DA NEURALGIA DO TRIGÊMEO.....	23
1.4	AS VITAMINAS DO COMPLEXO B.....	25
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	MATERIAIS.....	31
3.1.1	Animais.....	31
3.1.2	Reagentes, drogas e soluções.....	31
3.2	MÉTODOS.....	32
3.2.1	Construção do nervo infraorbital (CION).....	32
3.2.2	Testes comportamentais.....	32
3.2.2.1	Estimulação térmica ao calor.....	32
3.2.2.2	Estimulação térmica ao frio.....	33
3.2.2.3	Estimulação mecânica.....	33
3.2.3	Protocolos experimentais.....	34
3.2.4	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	37
4.1	INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	37
4.2	INFLUÊNCIA DA CARBAMAZEPINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	42
4.3	INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES VITAMINAS B COM CARBAMAZEPINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	44
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA SENSORIAL TRIGEMINAL

A região orofacial, incluindo a pele da cabeça e face, dentes, articulação temporomandibular (ATM), músculos, entre outras estruturas, é inervada pelo nervo trigêmeo, cujas terminações periféricas possuem receptores, os quais são responsáveis por detectar estímulos sensoriais externos (MACHADO, 1998; VOOGD *et al.*, 1998). O nervo trigêmeo possui esse nome por apresentar três principais ramificações: a oftálmica, a maxilar e a mandibular. O ramo oftálmico inerva a superfície das regiões superiores da face como testa, córnea, conjuntiva, mucosa oftálmica, e também regiões das mucosas nasais e paranasais. O ramo maxilar inerva o lábio superior, arcada dental superior, palato, parte da cavidade oral, porções laterais do nariz, seio maxilar e nasofaringe. Já o ramo mandibular inerva lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, ATM, mucosa do maxilar e músculos responsáveis pela mastigação (VOOGD *et al.*, 1998; para revisão ver FRIED *et al.*, 2001). Os dois primeiros ramos do nervo trigêmeo são ramos sensoriais, enquanto que o ramo mandibular apresenta além de ramos sensoriais, ramos motores que inervam e comandam a atividade dos músculos responsáveis pela mastigação (Figura 1) (MACHADO, 1998; VOOGD *et al.*, 1998; para revisão ver FRIED *et al.*, 2001). Os neurônios que integram esses diferentes ramos do nervo trigêmeo apresentam uma morfologia pseudounipolar, caracterizada por um único axônio que se divide em um ramo periférico e um ramo central (THALAKOTI *et al.*, 2007).

Essas mesmas características da inervação fornecida pelo nervo trigêmeo em humanos são observadas em ratos, bem como as mesmas ramificações periféricas principais: oftálmica, maxilar e mandibular. Na porção maxilar, existe um feixe nervoso denominado nervo infraorbital, o qual é responsável pela inervação da região das vibrissas, lábio superior, dentes, mucosa maxilar superior e a pele da região da órbita (Figura 1). O nervo infraorbital é constituído somente por fibras sensoriais, e cada folículo recebe cerca de 250 fibras, das quais cerca de 1/3 é amielinizada (BENOLIEL *et al.*, 2001b).

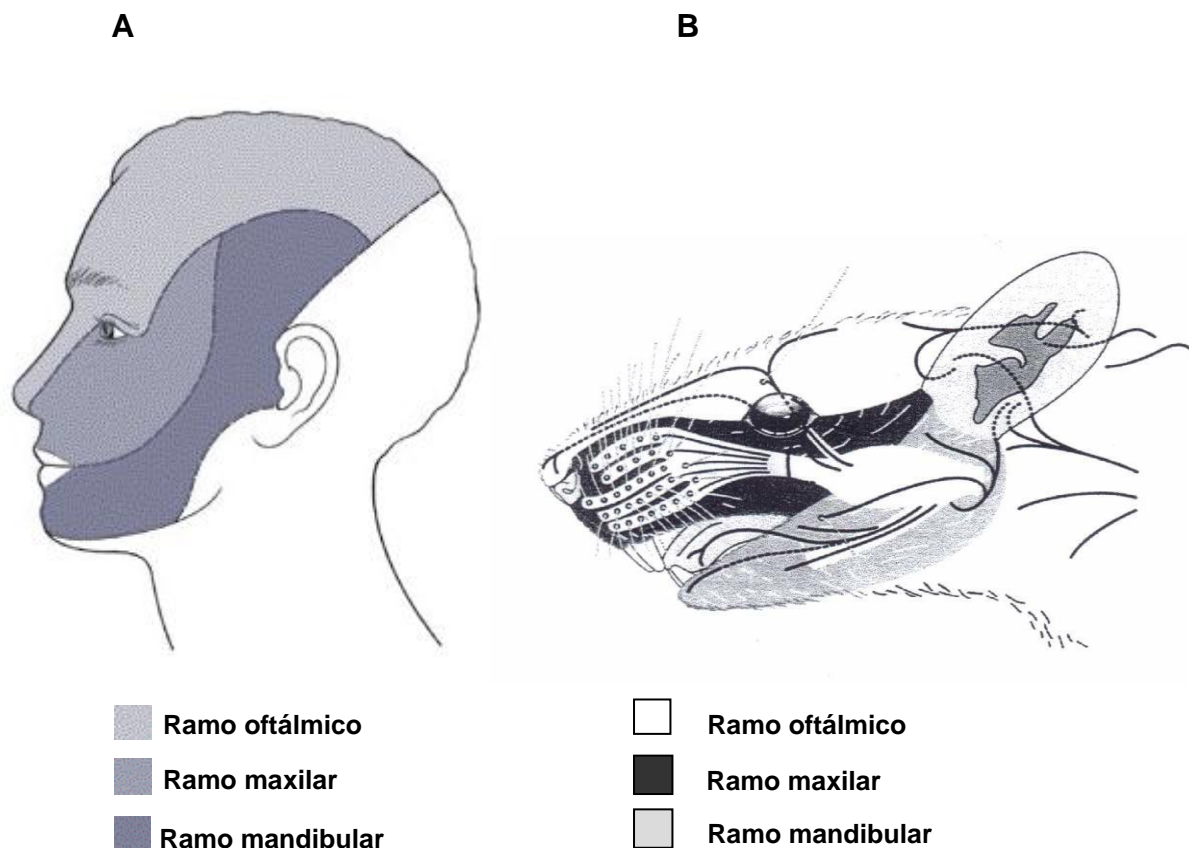


FIGURA 1. Inervação trigeminal periférica em humanos (A), em ratos (B) e suas ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular.

FONTE: Adaptado de FRIED *et al.* (2001); CHICHORRO (2002).

As fibras responsáveis pela inervação periférica orofacial podem ser divididas em três tipos $A\alpha/A\beta$, $A\delta$ e C, as quais são responsáveis por detectar estímulos inócuos ou nocivos. São assim divididas por apresentarem diâmetros/calibres, velocidade de condução axonal e envolvimento na transmissão de informação de modalidades sensoriais diferentes (DUBNER *et al.*, 1987; para revisões ver SESSLE, 2000; LAZAROV, 2002). As fibras sensoriais $A\alpha/A\beta$, são responsáveis pela condução de estímulos proprioceptivos (táteis) e estímulos mecânicos de baixo limiar, são fibras altamente mielinizadas, possuindo um grande calibre ($> 10 \mu\text{m}$) e alta velocidade de condução, que varia de 30 a 100 m/s. As fibras $A\delta$, são responsáveis pela condução de estímulos mecânicos de alto limiar, estímulos térmicos e químicos, são fibras que possuem menor calibre

(2-6 μm , por possuírem menos mielina) e velocidade de condução intermediária (12-30 m/s). As fibras C são responsáveis pela condução de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos, não possuem mielina em sua constituição, por isso apresentam um calibre menor e uma velocidade de condução mais lenta (0,4-1,2 μm e 0,5-2 m/s, respectivamente) (LAWSON, 1992; para revisão ver MILLAN, 1999).

A maioria desses neurônios sensoriais trigeminais possuem seus corpos celulares em um gânglio, localizado em humanos na superfície cerebral do osso temporal, próximo ao seu ápice na fossa craniana média, lateralmente à ponte e à artéria carótida interna, chamado principalmente de gânglio do trigêmeo, mas podendo ter outras denominações como gânglio semilunar ou gânglio de Gasser (para revisão ver SESSLE, 2006). O gânglio do trigêmeo assemelha-se ao gânglio da raiz dorsal no que diz respeito a características moleculares, neuroquímicas e funcionais, mas esses gânglios diferem entre si quanto à origem. Enquanto que o gânglio trigeminal tem sua origem na crista neural craniana, em uma região especializada da superfície ectodermal, o gânglio da raiz dorsal é formado inteiramente por crista neural craniana espinhal (THUN *et al.*, 2009).

Ainda, existem fibras simpáticas inervando regiões faciais, as quais possuem seus corpos celulares localizados no gânglio cervical superior. No entanto, a quantidade de fibras simpáticas inervando regiões faciais, é relativamente menor que a quantidade de fibras sensoriais do sistema trigeminal periférico (MATTHEWS e ROBINSON, 1980; MARFURT *et al.*, 1986; HOFFMANN e MATTHEWS, 1990; BENOLIEL *et al.*, 2001a).

Os neurônios periféricos que possuem seus corpos celulares no gânglio do trigêmeo atravessam o tronco cerebral ao nível da ponte, e se projetam para um complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo (para revisão ver SESSLE, 2006). Este complexo pode ser dividido em núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinhal. Essa divisão de núcleos é decorrente das suas diferentes funções. O núcleo sensorial principal funciona como uma estação de retransmissão dos impulsos proprioceptivos das diversas regiões orofaciais. No núcleo mesencefálico localizam-se os corpos celulares dos ramos periféricos motores. Nessa região, os neurônios projetam-se para o núcleo motor

ou para núcleos adjacentes e ativam interneurônios envolvidos na função do reflexo craniofacial. Já o núcleo do trato espinhal participa principalmente da transmissão dos estímulos periféricos nocivos dos neurônios de primeira ordem para os neurônios de segunda ordem (para revisão ver SESSLE, 2000, 2006).

O núcleo do trato espinhal é subdividido ainda em três diferentes subnúcleos, da parte rostral para a caudal: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis*. Este último subnúcleo, devido à sua continuidade e semelhança estrutural com o corno dorsal da medula espinhal, também é denominado corno dorsal bulbar (para revisão ver SESSLE, 2000, 2006). Nesses subnúcleos ocorre a comunicação entre os neurônios de primeira e segunda ordem. Os subnúcleos do complexo sensorial trigeminal (*oralis*, *interpolaris* e *caudalis*) possuem a capacidade de intercomunicação ou comunicação intrínseca, ou seja, alguns neurônios projetam-se para outros subnúcleos, permitindo assim a comunicação entre eles (para revisão ver SESSLE, 2006).

O subnúcleo *caudalis*, representa 1/3 do núcleo do trato espinhal, localiza-se no bulbo, na parte caudal do núcleo do trato espinhal. Pode-se dizer que esse subnúcleo é uma projeção da medula espinhal cervical, especificamente na altura da cervical 1 (C1), sendo uma estrutura laminada assim como a medula espinhal. Sua principal função é o processamento da maioria das informações nocivas provenientes das regiões orofaciais, pois é nesse subnúcleo, mais especificamente nas suas lâminas I, II, V e VI, que ocorrem as projeções da maioria das fibras de pequeno e médio diâmetro, responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos (fibras C e A δ) (DUBNER *et al.*, 1978; para revisão ver SESSLE, 2000, 2006; SVENSSON e SESSLE, 2004). Em adição, esse subnúcleo apresenta a maior concentração de mediadores químicos importantes na transmissão nociceptiva, tais como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), glutamato, bem como receptores importantes na modulação da condução de estímulos nociceptivos, tais como receptores gabaérgicos, serotoninérgicos e opioidérgicos. Ainda nesse subnúcleo, está presente a substância gelatinosa (SG), onde uma maior quantidade de neuromoduladores químicos nociceptivos inibitórios (ácido gama-aminobutírico-GABA, opióides endógenos, entre outros). Além da importância para a transmissão de estímulos nociceptivos, esse subnúcleo recebe ainda projeções de neurônios aferentes

primários responsáveis pela condução de estímulos proprioceptivos (fibras A α /A β) (GOBEL *et al.*, 1981, para revisão ver SESSLE, 2006).

O subnúcleo *interpolaris*, localizado entre os outros dois subnúcleos (*oralis* e *caudalis*), possui uma população neuronal bastante heterogênea, porém a maioria dos neurônios que se projetam a essa região é de pequeno a médio diâmetro (fibras A δ e C). Sabe-se também que nessa região já foram identificadas substâncias e neurotransmissores importantes para a nocicepção (CHIAIA *et al.*, 1992; para revisão ver SESSLE, 2006).

As fibras que inervam a região das vibrissas em roedores, uma região muito importante para esse trabalho, apresentam seus aferentes primários projetando-se para esses dois subnúcleos trigeminais, *caudalis* e *interpolaris*, porém o subnúcleo *caudalis* tem uma maior relevância pelo fato de receber um maior número de fibras C (para revisão ver SESSLE, 2006).

Rostralmente ao subnúcleo *interpolaris*, temos o subnúcleo *oralis*. Esse último difere do *caudalis* por não possuir a SG, com isso a modulação nociceptiva inibitória é diminuída nesse local, mas ainda existe devido à intercomunicação entre os subnúcleos. Esse subnúcleo recebe algumas projeções de neurônios periféricos motores e responsáveis pela condução de estímulos proprioceptivos, os quais são transmitidos diretamente para regiões cerebrais (para revisão ver SESSLE, 2000, 2006; WODA, 2003).

Assim como algumas informações são conduzidas através dos neurônios de primeira ordem até o corno dorsal da medula espinhal, onde os mesmos fazem sinapse com os neurônios de segunda ordem, a maioria das informações orofaciais é conduzida através de neurônios sensoriais de primeira ordem para os subnúcleos sensoriais trigeminais, onde é estabelecida a sinapse com neurônios de segunda ordem, que conduzem os estímulos para regiões cerebrais (DOSTROVSKY, 2000).

Os neurônios de segunda ordem, presentes nos diferentes subnúcleos, podem ser classificados com base nas propriedades de seu campo receptivo em três grupos principais: 1) nociceptivos específicos, que são neurônios que recebem impulsos de aferentes primários de pequeno diâmetro (fibras A δ e C) e que são ativados apenas por estímulos nocivos; 2) limiar dinâmico e amplo, que são neurônios que recebem impulsos de fibras de pequeno a grande diâmetro e

são ativados tanto por estímulos inócuos quanto nocivos; e 3) receptores mecânicos de baixo limiar, os quais são ativados por estímulo propioceptivos (para revisão ver MILLAN, 1999).

Ao deixarem os subnúcleos espinhais, as informações nociceptivas são conduzidas pelos neurônios de segunda ordem para diferentes regiões do tálamo. As informações orofaciais periféricas táteis são conduzidas para regiões medianas do tálamo, de onde são projetadas ao córtex somato-sensorial, região responsável pelas análises das informações, o qual aponta a localização dos estímulos (para revisões ver SESSLE 2006; TANG *et al.*, 2009). Já as informações nociceptivas, além de serem conduzidas para regiões medianas do tálamo também são transferidas para outras estruturas, tais como hipocampo e córtex cingulado anterior (para revisões ver SESSLE 2006; TANG *et al.*, 2009). O tálamo é uma das principais estruturas centrais envolvidas na condução dos estímulos nociceptivos. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex cerebral resultando no processamento dos aspectos cognitivos e afetivos da dor (para revisão ver JULIUS e BASBAUM, 2001).

A transmissão dos estímulos nociceptivos, pode ainda ser modulada por vias descendentes de origem no tronco cerebral. Esse sistema envolve regiões como substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes ao bulbo rostral ventromedial que, através de conexões entre si e diferentes neurotransmissores, inibem ou facilitam a transmissão nociceptiva (HAMMOND, 1986; para revisões ver MALCANGIO e BOWERY, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001).

1.2 A NEURALGIA DO TRIGÊMEO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) e o Comitê de Avaliação do Grupo de Interesse Especial em Dor Neuropática (NeuPSIG), definem dor neuropática como “dor que se origina como consequência direta de uma lesão ou doença do sistema somatossensorial” (LOESER e TREEDE, 2008; HAANPÄÄ *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento de algumas neuropatias são descritos sinais, os quais podem ser classificados em positivos ou negativos. Dentre os sinais

positivos podemos destacar: 1) alodinia, que se caracteriza por dor provocada por estímulos inócuos (não nocivos), decorrente, principalmente, da estimulação térmica ou mecânica; e 2) hiperalgesia, a qual pode ser descrita como a exacerbação da percepção dolorosa decorrente de um estímulo nocivo térmico, mecânico ou químico (LOESER e TREEDE, 2008). Dentre as diferentes formas de dor neuropática orofacial, existe uma relativamente rara que afeta agressivamente a qualidade de vida do paciente, a neuralgia do trigêmeo (TN).

Katusic *et al.* (1990) demonstraram que a incidência anual de TN era de 4,3 indivíduos a cada 100.000. Porém, estudos mais recentes observaram que a incidência aumentou significativamente nos últimos anos. Um desses estudos, realizado no Reino Unido, relatou que a incidência aumentou para 26,8 indivíduos a cada 100.000 (HALL *et al.*, 2006). Corroborando esses dados, um estudo holandês publicado em 2008 observou que a incidência de TN era de 28,9 por 100.000 habitantes (DIELEMAN *et al.*, 2008). Entretanto, esses autores sugerem que esse aumento na incidência de TN pode ser consequência de falhas no diagnóstico, pois este tipo de dor pode ser confundido com outras dores que acometem a região orofacial (para revisão ver ZAKRZEWSKA e MCMILLAN, 2011). Ainda, um trabalho europeu observou que dos 602 pacientes avaliados com dores neuropáticas, 82 (14%) sofriam de TN (MCDERMOTT *et al.*, 2006). Outra característica importante dessa patologia diz respeito à sua prevalência em indivíduos do sexo feminino, a qual é observada em todas as idades, e segue a proporção de aproximadamente 1,5 mulheres para cada homem (HALL *et al.*, 2006; para revisões ver LEWIS *et al.*, 2007; KLEEF *et al.*, 2009; HARGREAVES, 2011; ZAKRZEWSKA e MCMILLAN, 2011).

A neuralgia do trigêmeo caracteriza-se por dores fortes, agudas e lancinantes, do tipo choque elétrico e de curta duração (segundos), seguidas por um período refratário. Os episódios de dor são desencadeados geralmente por estímulos em locais específicos, em território inervado pelo trigêmeo, chamados de *trigger points* ou zonas de gatilho, os quais podem ser ativados por estímulos comuns, como escovação dos dentes, mastigação, o ato de barbear, o leve toque na face, entre outros. Devido aos episódios de dor serem desencadeados pela estimulação dos *trigger points*, os indivíduos acometidos pela TN apresentam marcante redução na qualidade de vida, uma vez que passam a evitar qualquer

tarefa cotidiana que possa gerar uma crise de dor (para revisões ver TURP e GOBETTI, 1996; DELZELL e GRELLE, 1999; LEWIS *et al.* 2007; KLEEF *et al.*, 2009).

Relatos de pacientes sugerem que a intensidade de dor dessa neuralgia é comparável ou mais intensa que dores de origem espinhal, tais como àquelas associadas ao câncer, à dor do membro fantasma, entre outras (para revisão ver HARGREAVES, 2011) (Figura 2).

Na maioria dos casos de neuralgia do trigêmeo (aproximadamente 60%), há o envolvimento apenas de um ramo do nervo trigêmeo, principalmente o maxilar, e em cerca de 40% dos casos, ambos os ramos, maxilar e mandibular estão envolvidos. Raramente observa-se o envolvimento do ramo oftálmico (menos de 3% dos casos) ou casos de neuralgia do trigêmeo bilateral (RASMUSSEN, 1991; para revisão ver BENOLIEL e ELIAV, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A TN é dividida, de acordo com a Sociedade Internacional de Cefaléia, em sintomática e clássica. Na neuralgia do trigêmeo sintomática, os pacientes apresentam compressão do nervo trigêmeo causada por um trauma, tumor ou outras anormalidades estruturais ou patologias, como por exemplo, a esclerose múltipla. Já na neuralgia do trigêmeo clássica, a causa muitas vezes se deve à compressão microvascular à zona de entrada da raiz trigeminal no tronco encefálico (para revisão ver LEWIS *et al.* 2007; BENOLIEL e SHARAV, 2010). A maioria dos pacientes que sofrem de neuralgia do trigêmeo, isto é, cerca de 90%, apresentam a neuralgia trigeminal clássica (para revisão ver LEWIS *et al.* 2007). Independente da sua etiologia, a dor associada à neuralgia do trigêmeo, quando mensurada, alcança altos índices em escalas de dor (Figura 2), o que suscita ainda mais o interesse no seu estudo (para revisão ver HARGREAVES, 2011).

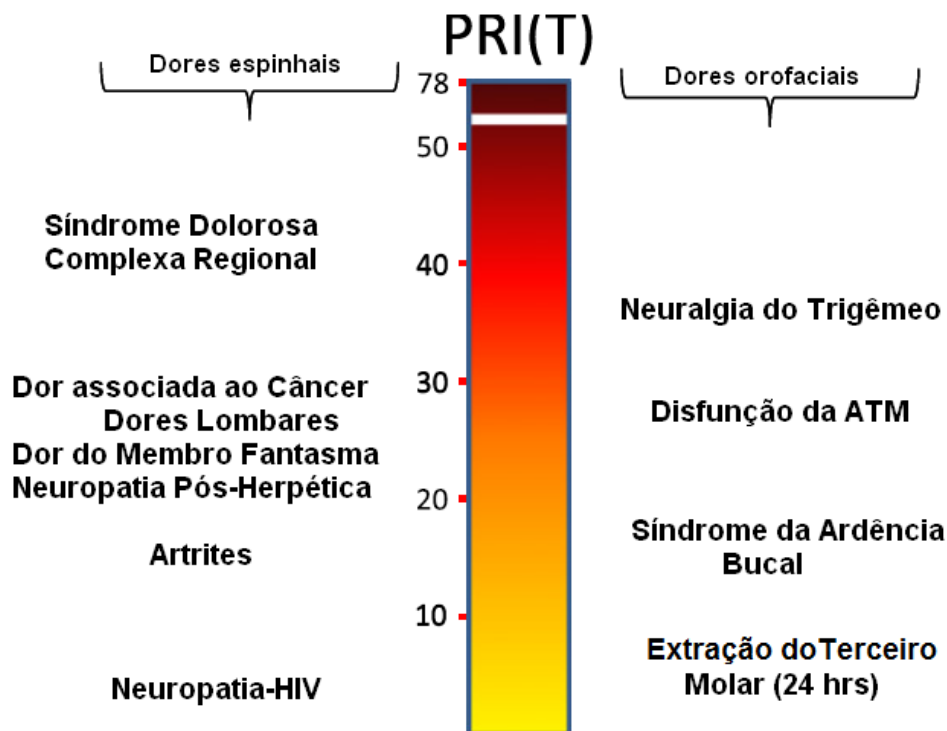


FIGURA 2. Comparação da intensidade dolorosa entre desordens espinhais e orofaciais, usando a escala ordinal *McGill Total Rank Pain Index* (PRI[T]), obtida por respostas ao questionário McGill.

FONTE: Adaptado de HARGREAVES (2011).

Na neuralgia do trigêmeo clássica, a compressão do nervo normalmente é detectada próxima ao tronco cerebral, geralmente é arterial, mas pode ser venosa ou mista (para revisão ver LEWIS *et al.* 2007). Algumas evidências também sugerem que a compressão do nervo trigêmeo possa ser devido a uma má formação vascular. No local da compressão, normalmente, ocorre desmielinização das fibras nervosas, levando à despolarização anormal e disparos ectópicos dos neurônios (para revisões ver LEWIS *et al.*, 2007; KLEEF *et al.*, 2009; BENOLIEL e SHARAV, 2010; CONFORTI *et al.*, 2012 *epub ahead of print*). O principal mecanismo responsável pelos disparos ectópicos parece estar relacionado com o acúmulo de canais de sódio nas regiões que sofreram desmielinização.

Existem três tipos principais de canais de sódio voltagem dependentes relacionados às dores neuropáticas: Nav 1.3, Nav 1.7 e Nav 1.8 (SIQUEIRA *et al.*, 2009). O subtipo Nav 1.3 é um canal sensível a tetrodotoxina (TTX), possui uma rápida ativação/inativação, bem como uma rápida recuperação após a hiperpolarização. O subtipo Nav 1.7 também é um canal de sódio sensível à TTX,

apresenta ativação e inativação rápidas, assim como o Nav 1.3. Esses canais parecem ser importantes na fase inicial da despolarização, participando, portanto, da geração dos potenciais de ação nos neurônios sensoriais. Já os canais Nav 1.8 estão presentes nas fibras sensoriais de pequeno, médio e grande diâmetro no gânglio da raiz dorsal e no gânglio do trigêmeo. São canais resistentes à TTX e possuem uma ativação rápida e uma inativação lenta. Possivelmente esses canais estejam envolvidos na manutenção dos potenciais de ação gerados nas fibras sensoriais (AKOPIAN *et al.*, 1996; DIB-HAJJ *et al.*, 1999; DJOUHRI *et al.*, 2003; HONG e WILEY, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Vários estudos têm demonstrado alterações na expressão desses canais em diferentes modelos de dor neuropática, bem como sugerido sua participação no desenvolvimento da hiperalgesia a diferentes estímulos (NOVAKOVIC *et al.*, 1998; PORRECA *et al.*, 1999; LAI *et al.*, 2002; GOLD *et al.*, 2003; JOSHI *et al.*, 2006). Com relação à neuralgia do trigêmeo, Siqueira *et al.* (2009) demonstraram aumento da expressão de canais de sódio Nav 1.3, diminuição da expressão de Nav 1.7 e nenhuma alteração significativa na expressão do Nav 1.8 no tecido gengival da área afetada por essa neuropatia em pacientes.

Vos e Maciewicz (1991) desenvolveram um modelo para o estudo da neuralgia do trigêmeo, o qual consiste na constrição do nervo infraorbital de ratos. Estudos posteriores observaram hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos em ratos submetidos à constrição do nervo infraorbital (VOS *et al.*, 1994; IMAMURA *et al.*, 1997; CHICHORRO *et al.*, 2006a, 2006b). No presente estudo, será utilizado o modelo proposto por Vos e Maciewicz (1991) e modificado por Chichorro (2006) de constrição do nervo infraorbital, bem como serão empregadas metodologias já descritas na literatura para avaliar a hiperalgesia térmica e mecânica (CHICHORRO *et al.*, 2006a, 2006b, , 2009).

1.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DA NEURALGIA DO TRIGÊMEO

Uma importante etapa na busca do controle das dores neuropáticas é o diagnóstico correto. As características, os sinais e sintomas de cada patologia são importantes para diagnosticar uma dor neuropática, bem como, para distingui-la de outras patologias. Mesmo corretamente diagnosticadas, as dores neuropáticas são de difícil tratamento, pois os medicamentos disponíveis promovem apenas o alívio da dor, muitas vezes insatisfatoriamente, mas não a cura. A busca e identificação de novos alvos terapêuticos têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa (para revisões ver SINDRUP e JENSEN, 1999; KITT *et al.*, 2000; LEWIS *et al.*, 2007; BONEZZI *et al.*, 2009).

As principais classes de drogas utilizadas para o tratamento das dores neuropáticas são: antidepressivos tricíclicos, opióides e anticonvulsivantes (ATTAL *et al.*, 2010). No entanto, apenas esses últimos são empregados no controle da dor neuropática trigeminal. Os anticonvulsivantes apresentam ação analgésica na dor neuropática principalmente pela sua capacidade de diminuir a excitabilidade neuronal, porém apresentam mecanismos de ação diferentes. Os agentes mais estudados são carbamazepina, gabapentina e pregabalina, porém lamotrigina, topiramato e oxcarbamazepina também têm apresentado potencial analgésico (para revisão ver LYNCH e WATSON, 2006).

Em 1942, a partir da observação de que a fenitoína era capaz de reduzir a dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo, o efeito analgésico dos anticonvulsivantes foi descrito pela primeira vez. Em 1962, foi demonstrada por Blom a efetividade da carbamazepina no tratamento da neuralgia do trigêmeo, o que foi confirmado por vários estudos clínicos (BLOM, 1962; ROCKLIFF e DAVIS, 1966).

A carbamazepina, um anticonvulsivante clássico, atua bloqueando os canais de sódio operados por voltagem, ao nível pré e pós-sináptico. Parece atuar com mais efetividade em dores paroxísticas, lancinantes e no controle da hiperalgesia (para revisão ver JENSEN, 2002; BONEZZI *et al.*, 2009). Atua na redução da frequência e limita a ocorrência de potenciais de ação sustentados ao nível pré-sináptico. Já ao nível pós-sináptico, atua no bloqueio dos canais de sódio (para revisões ver TREMONT-LUKATS *et al.*, 2000; SINDRUP e JENSEN,

2002; BONEZZI *et al.*, 2009). Além disso, a carbamazepina promove a diminuição da concentração de íons cálcio nos terminais nervosos, reduzindo a exocitose de neurotransmissores, e por consequência, reduz a propagação da informação nociceptiva através das sinapses. Dessa maneira, a carbamazepina atua na estabilização das fibras hiperexcitadas, impedindo os disparos ectópicos (para revisões ver TREMONT-LUKATS *et al.*, 2000; BACKONJA, 2002).

A carbamazepina apresenta efeitos centrais, tais como a diminuição das respostas geradas no subnúcleo *caudalis* em ratos avaliados no modelo de neuralgia do trigêmeo. É indicada para algumas neuropatias periféricas, principalmente na neuralgia do trigêmeo, neuralgia pós-herpética e algumas neuropatias centrais. Porém, a utilização da carbamazepina está associada a inúmeros efeitos adversos, sendo os principais: sonolência, tontura, náusea, ataxia, tolerância, entre outros (para revisão ver TREMONT-LUKATS *et al.*, 2000; HARKE *et al.*, 2001; para revisões ver BACKONJA, 2002; JENSEN, 2002; SINDRUP e JENSEN, 2002). As doses eficazes de carbamazepina indicadas no controle da dor neuropática variam de 400 mg/dia a 2000 mg/dia e recomenda-se o aumento gradual das doses a fim de se retardar o aparecimento e amenizar os inúmeros efeitos adversos (para revisão ver LYNCH e WATSON, 2006).

A carbamazepina é o fármaco de escolha para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, sendo o único medicamento aprovado pela agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA). Esse anticonvulsivante pode reduzir a dor em cerca de 70% dos casos. Outros medicamentos utilizados para o tratamento dessa dor são gabapentina, pregabalina e baclofeno. Porém, assim como outros fármacos dessa classe, a carbamazepina não é capaz de promover a cura da neuralgia do trigêmeo, apenas promove a diminuição dos sintomas (para revisão ver KITT *et al.*, 2000; AMBRÓSIO *et al.*, 2002; SATO *et al.*, 2004; para revisão ver KLEEF *et al.*, 2009).

Contudo, existem muitas neuropatias onde a utilização de um único medicamento (monoterapia) não é capaz de promover a analgesia. Por isso, recomenda-se a utilização de politerapia para o tratamento, ou seja, utilização de mais de um medicamento de classes diferentes a fim de potencializar o efeito analgésico (ATTAL *et al.*, 2010).

Com relação à neuralgia do trigêmeo, em casos de refratariedade a

diferentes tratamentos farmacológicos, os pacientes podem ainda ser encaminhados a procedimentos neurocirúrgicos. Alguns deles, como a craniectomia retromastoidea com descompressão microvascular do nervo afetado e as rizotomias percutâneas, são altamente invasivos. Esses procedimentos promovem o alívio da dor causada pela neuralgia do trigêmeo, mas além do alívio ser muitas vezes temporário, podem apresentar riscos para o paciente ou gerar sequelas. Porém, algumas técnicas menos invasivas vêm sendo estudadas, tais como as rádio cirurgias, que prometem ser uma alternativa cirúrgica mais segura para a neuralgia do trigêmeo (PETIT *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2011).

1.4 AS VITAMINAS DO COMPLEXO B

A tiamina, piridoxina e cianocobalamina, mais comumente conhecidas como vitaminas B1, B6 e B12, respectivamente, fazem parte das vitaminas que compõem o complexo B. São vitaminas hidrossolúveis requeridas como cofatores para diversas reações enzimáticas relacionadas ao funcionamento celular e à produção de energia. São vitaminas essenciais, ou seja, necessitam ser obtidas através da dieta, e necessárias para manter a homeostase do organismo (para revisão ver DEPEINT *et al.*, 2006a, 2006b).

A tiamina ou vitamina B1 foi a primeira vitamina do complexo B a ser descoberta e identificada. Encontra-se em alimentos crus, tais como cereais, legumes verdes, nozes, gema de ovos, entre outros. A absorção da tiamina é diminuída em casos de diabetes, alcoolismo, idade avançada e de alterações hormonais. Ao ser ingerida a tiamina é absorvida no intestino na forma de monofosfato de tiamina (TMP) e então transformada, através da enzima citosólica difosfoquinase, na sua forma ativa, o pirofosfato de tiamina (TPP). Essa forma ativa da vitamina B1 atua: como cofatora para as enzimas transcetolase citosólica, piruvato desidrogenase e desidrogenases mitocondriais; como responsável por reações de catálise na via das pentoses fosfatos; na produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH; energia); na produção de ácidos nucléicos (fornecimento de ribose); e na produção de energia mitocondrial (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006a; MALANDRINOS *et al.*, 2006; DU *et al.*, 2011).

Sabe-se que a deficiência de tiamina promove principalmente o beribéri, mas também está associada a outras alterações, tais como catarata e câncer de cólon (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006a; DU *et al.*, 2011). Além disso, a tiamina possui atividade antioxidante. Nesse sentido, estudos *in vivo* demonstram que a deficiência dessa vitamina pode promover estresse oxidativo e com isso causar danos ao sistema nervoso central (SNC). A deficiência de tiamina, associada a outros fatores, pode produzir alterações neurodegenerativas semelhantes às observadas em doenças como Alzheimer e Parkinson, entre outras. Já em uma deficiência mais severa, observou-se degeneração de nervos periféricos (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006a; DU *et al.*, 2011).

A piridoxina juntamente com as substâncias piridoxal e piridoxamina formam um composto piridínico que compõe a vitamina B6. Porém, a piridoxina é a substância desse composto piridínico mais importante para humanos, pois ela é responsável pela maioria das funções da vitamina B6. É encontrada em alimentos de origem vegetal e animal como, nozes, pão, cereais, aves e peixes. Além disso, bactérias presentes na microflora intestinal são capazes de fornecer essa vitamina em pequenas quantidades para os seres humanos. A piridoxina é absorvida pelo intestino, desfosforilada por uma enzima semelhante à fosfatase alcalina e é convertida no fígado para sua forma biologicamente ativa, a piridoxina-5-fostato, responsável por diversas funções no organismo humano (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010; SALVO *et al.* 2011).

A principal função da piridoxina é atuar como coenzima em diversas reações enzimáticas, incluindo o metabolismo de proteínas, aminoácidos e lipídios, reações enzimáticas mitocondriais, além de ser necessária para produção de adrenalina, serotonina e outros neurotransmissores, para a formação do ácido nicotínico, para a decomposição do glicogênio, além de atuar como reguladora do transporte de íons, bem como modular fatores de transcrição (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010; SALVO *et al.* 2011).

Assim como a vitamina B1, a vitamina B6 parece possuir atividade antioxidante direta, sendo capaz de prevenir a formação de íons superóxido, a glicação de proteínas e a peroxidação lipídica, bem como atividade antioxidante indireta, por atuar como quelante de íons ferro diminuindo as reações de formação de espécies reativas de oxigênio (DEPEINT *et al.*, 2006 b).

A deficiência de vitamina B6 pode promover anemia, distúrbios de crescimento, aumentar os níveis de oxalato (podendo causar toxicidade renal), neuropatia periférica, degeneração nervosa, induzir crises epiléticas e dermatite. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a deficiência de vitamina B6 associada a outros fatores, pode estar relacionada ao desenvolvimento de depressão, Alzheimer, câncer de cólon e redução da cognição. Ainda, a deficiência dessa vitamina induz a peroxidação lipídica, promovendo, juntamente com outros fatores, estresse oxidativo. Geralmente a deficiência dessa vitamina está associada a outras condições ou patologias, tais como alcoolismo, diabetes e tratamento prolongado com medicamentos como isoniazida e levodopa (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010; SALVO *et al.*, 2011).

A cianocobalamina, mais conhecida como vitamina B12, pode ser encontrada em carnes vermelhas, leite e derivados, mariscos e peixes. A cianocobalamina ao ser ingerida liga-se ao polipeptídeo salivar R e é transportada até o estômago onde, devido ao baixo pH, sofre dissociação. O polipeptídeo é então degradado por tripsinas no intestino e a cianocobalamina é transferida para o fator estomacal intrínseco formando um complexo: fator-vitamina. Esse complexo interage com a mucosa do íleo e é transportado por endocitose para uma vesícula lisossomal. No lisossoma, o complexo dissocia-se, a cianocobalamina vai para a circulação sanguínea e é transportada até o fígado através das transcobalaminas. Nos hepatócitos, a cianocobalamina é convertida em seu metabólito ativo, a metilcobalamina, através da ação da enzima metionina redutase sintase. Esse metabólito ativo é distribuído para diversos locais do organismo através de transportadores, a fim de promover suas funções. Nas mitocôndrias a cianocobalamina é convertida em energia (trifosfato de adenosina, ATP), necessária para algumas reações enzimáticas (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010).

Assim como as outras duas vitaminas de interesse para esse trabalho, a cianocobalamina também é necessária como coenzima para diversas reações enzimáticas essenciais para a função celular. Além disso, participa da formação de monofosfato desoxitimidina, molécula precursora na síntese de DNA. Por outro lado, diferentemente das outras vitaminas, a vitamina B12 parece não ter efeito antioxidante direto, embora algumas evidências sugiram um possível efeito

antioxidante indireto (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010).

Sabe-se que a deficiência dessa vitamina pode resultar em anemia perniciosa, aumentar o risco para doenças cardiovasculares, derrame, osteoporose e para o surgimento de alguns tipos de câncer (para revisões ver DEPEINT *et al.*, 2006b; SELHUB *et al.*, 2010).

Na clínica, em casos patológicos não relacionados à deficiência das vitaminas, recomenda-se a ingestão das vitaminas B1 e B6 nas doses de 10-500 mg/kg e 25-200 mg/kg, respectivamente. Já o intervalo de dose terapêutica para a vitamina B12 é muito amplo, não existindo relato de casos de intoxicação devido à ingestão de altas doses da mesma. Isto provavelmente se deve ao fato de sua absorção oral ser saturável. (MAURO *et al.*, 2000; para revisão ver DEPEINT *et al.*, 2006a, 2006b; MIBIELLI *et al.*, 2009; para revisão ver ALLEN, 2010; CHIU *et al.*, 2011).

As vitaminas do complexo B (B1, B6 e B12) têm sido avaliadas, no que diz respeito aos seus possíveis efeitos analgésicos, em diversos estudos experimentais e clínicos. Nesses estudos, as vitaminas têm sido empregadas isoladas ou em associação a fármacos de diferentes classes, tais como anti-inflamatórios esteroidais, não-esteroidais e anticonvulsivantes, e em ambos os casos têm-se observado efeitos analgésicos (REYES-GARCIA *et al.*, 2003, 2004; MEDINA-SANTILLÁN *et al.*, 2004; CARAM-SALAS *et al.*, 2004, 2006; JOLIVALT *et al.*, 2009).

A administração das vitaminas do complexo B (B1 e B6) isoladamente resultou na redução da hiperalgesia mecânica após ligação dos nervos espinhais L5 e L6, e a associação dessas mesmas vitaminas, em baixas doses, com a dexametasona promoveu uma potencialização do efeito antihiperalgésico (CARAM-SALAS *et al.*, 2006). Corroborando esses dados, Mixcoalt-Zecuatl *et al.* (2008) demonstraram que os anticonvulsivantes carbamazepina e gabapentina, bem como a benfotiamina (um derivado da vitamina B1) e a vitamina B12, individualmente promoviam efeitos antihiperalgésicos frente à estimulação mecânica. Esses efeitos ainda eram observados quando baixas doses de cada um dos anticonvulsivantes eram associadas às vitaminas B1 ou B12, novamente sugerindo um efeito antihiperalgésico sinérgico. Ainda empregando esse modelo

de dor neuropática, a associação de baixas doses das vitaminas B1, B6 e B12 com o anticonvulsivante gabapentina ou com o anti-inflamatório esteroide dexametasona reduziu significativamente a hiperalgia mecânica, sugerindo um efeito antihiperalgésico sinérgico resultante dessas associações (REYES-GARCIA *et al.*, 2003, 2004; CARAM-SALAS *et al.*, 2004). Por outro lado, não foi demonstrado sinergismo antihiperalgésico no estudo de Granados-Soto *et al.* (2004), quando a vitamina B12 foi associada ao antiinflamatório não-esteroide diclofenaco.

O efeito antihiperalgésico das vitaminas também foi demonstrado quando outro modelo de dor neuropática foi utilizado (i.e. neuropatia diabética, JOLIVALT *et al.*, 2009), bem como frente a estímulos térmicos (WANG *et al.*, 2005).

Conforme descrito acima, existem diversas evidências dos efeitos antihiperalgésicos das vitaminas do complexo B em diferentes modelos de dor neuropática. No entanto, não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado os efeitos das vitaminas B em modelos de dor neuropática trigeminal, sendo este o principal objetivo deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das dores neuropáticas ainda apresentam inúmeras limitações, tais como a ocorrência comum de reações adversas e a perda da eficácia associadas ao uso prolongado ou repetido dos medicamentos. Portanto, faz-se necessário o estudo e a proposição de novas alternativas para o tratamento farmacológico destas condições. Dessa maneira, utilizando um modelo de neuralgia trigeminal, pretende-se avaliar a influência de vitaminas B na hiperalgesia térmica e mecânica em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das vitaminas B1 (Tiamina), B6 (Piridoxina) e B12 (Cianocobalamina), administradas separadamente, uma vez ao dia, por 5 dias, no desenvolvimento da hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor) e mecânica induzidas por constrição do nervo infraorbital de ratos;
- Avaliar o efeito da Carbamazepina, administrada uma única vez, na hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor) e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos;
- Avaliar o efeito das vitaminas B1, B6 e B12, administradas repetidamente em doses reduzidas, no desenvolvimento da hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor) e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital de ratos, bem como o efeito da associação com a carbamazepina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*, machos, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 4 dias antes dos experimentos, agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR, autorização número 471).

3.1.2 Reagentes, drogas e soluções

Foram empregados nesse estudo os seguintes reagentes, drogas e soluções:

- Tiamina (Vitamina B1, Galena Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil);
- Piridoxina (Vitamina B6, Galena Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil);
- Cianocobalamina (Vitamina B12, Galena Química e Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil);
- Carbamazepina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Cloridrato de Cetamina (Rhubifarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, SP, Brasil);
- Xilazina (Laboratórios König S.A., Avellaneda, Argentina);

As vitaminas B1, B6 e B12 foram dissolvidas em solução salina estéril 0,9% e administradas por via subcutânea (s.c.). O veículo da Carbamazepina consistiu de 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO), 1% de etanol, 1% de Tween 80 e 88% de

solução salina estéril 0,9%, sendo administrado por via intraperitoneal (i.p.).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Constrição do nervo infraorbital (CION)

A constrição do nervo infraorbital (CION) foi realizada segundo o método proposto anteriormente por Vos e Maciewicz (1991) com modificações realizadas por Chichorro (2006). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e foi realizada a assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi constrito. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia.

3.2.2 Testes comportamentais

3.2.2.1 Estimulação térmica ao calor

Neste teste, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante (~50°C) foi posicionada a aproximadamente 1 cm da área de inserção das vibrissas. Em seguida, foi registrado o tempo de latência para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (Figura 3). Foram incluídos nos experimentos apenas animais que apresentaram estas respostas entre 9 e 15 s a

partir da aplicação do estímulo nas avaliações pré-cirúrgicas. Para avaliação do efeito de diferentes tratamentos os animais foram estimulados, apenas no lado ipsilateral à CION, nos dias 2, 4, 6, 9 e 12 após a cirurgia. No quarto dia após a cirurgia, os animais foram avaliados antes de receberem os diferentes tratamentos e em intervalos de uma hora até a 4^a ou 6^a horas após as administrações.

3.2.2.2 Estimulação térmica ao frio

Para a realização deste teste os animais foram previamente habituados em caixas de observação por aproximadamente 30 min e em seguida um spray de tetrafluoreetano foi aplicado, por cerca de 1 s, na região inervada pelo nervo infraorbital (sobre a área de inserção das vibrissas). Imediatamente após a aplicação, o tempo despendido pelos animais executando movimentos de limpeza (i.e. *grooming*) facial bilateral foi registrado durante 2 minutos. Foram incluídos nos experimentos apenas animais cujo tempo de *grooming* facial foi ≤ 15 s antes da realização da CION. Para avaliação do efeito de diferentes tratamentos, os animais foram estimulados, apenas no lado ipsilateral, nos dias 2, 4, 6, 9 e 12 após a cirurgia CION, além da avaliação pré-cirúrgica (medida basal). No quarto dia após a cirurgia, os animais foram avaliados antes de receberem os diferentes tratamentos e em intervalos de uma hora até a 4^a ou 6^a hora após as administrações.

3.2.2.3 Estimulação mecânica

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados por pelos menos 2 horas em caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma pré-seleção dos animais a qual consistiu na aplicação em ordem crescente de 8 filamentos de Von Frey (*Semmes-Weinstein monofilaments*, Stoelting, USA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na região inervada pelo infraorbital, no lado ipsilateral à cirurgia. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas com um intervalo de ~30 s entre cada aplicação. Considerou-se o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que evocou, por duas vezes,

comportamentos como retirada rápida da cabeça, *grooming* facial e reações de ataque/escape. Apenas os animais que não apresentaram, na fase de pré-seleção, estes comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos foram incluídos nos experimentos subsequentes, isto é, aqueles que possuíam um limiar de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g. Para os experimentos de hiperalgisia mecânica, os animais foram avaliados nos dias 8, 10, 12, 16 e 20 após a cirurgia CION, além da avaliação pré-cirúrgica (medida basal dos animais).

3.2.3 Protocolos experimentais

Para avaliar a participação das vitaminas B1, B6 e B12 na hiperalgisia térmica (ao calor e ao frio), as mesmas foram administradas em diferentes grupos de animais, nas doses de 180, 180 e 18 mg/kg, respectivamente, por via subcutânea, uma vez ao dia, sendo que o tratamento iniciou-se no dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e foi repetido até o dia 4 após a cirurgia. As medidas foram realizadas antes da cirurgia e nos dias 2, 4, 6, 9 e 12 após cirurgia, bem como em intervalos de uma hora até a quarta hora após os tratamentos no dia 4.

A influência das vitaminas B1, B6 e B12 na hiperalgisia mecânica foi avaliada com administrações diárias de cada vitamina por via subcutânea, nas doses de 180, 180 e 18 mg/kg, respectivamente, sendo que os tratamentos tiveram início no dia 8 após a cirurgia e foram repetidos até o dia 12, totalizando 5 administrações. As avaliações foram realizadas antes da cirurgia, nos dias 8, 10, 12, 16 e 20 após cirurgia, bem como em intervalos de uma hora até a quarta hora após os tratamentos no dia 12 após a cirurgia.

Em todos os experimentos, os animais dos grupos controle foram tratados da mesma maneira com o veículo para diluição das vitaminas (1 mL/kg de solução salina 0,9%, s.c.).

As doses mais altas de vitamina B1 e B6 empregadas nesse estudo basearam-se no estudo de Jolivalt et al. (2009). Já a escolha da dose de vitamina B12 utilizada foi 10 vezes menor em relação às doses das vitaminas B1 e B6. Através de cálculo alostérico, as doses das vitaminas B1, B6 e B12 utilizadas em

ratos nesse estudo correspondem, em humanos, a 30, 30 e 3 mg/kg, respectivamente (REAGAN-SHAW *et al.*, 2008).

A fim de avaliar o efeito da Carbamazepina na hiperalgesia térmica (ao calor e ao frio), os animais receberam Carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (descrito acima, 1 mL/kg) no dia 4 após o procedimento cirúrgico e as medidas foram realizadas de hora em hora até a 4ª hora após administração. Para avaliação da influência da carbamazepina na hiperalgesia mecânica, os animais foram tratados com carbamazepina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (1 mL/kg, i.p.) e foram avaliados em intervalos de uma hora até a 4ª hora após os tratamentos no dia 20 após o procedimento CION. A maior dose de carbamazepina utilizada baseou-se em estudo prévio do nosso grupo (CHICHORRO, 2002).

Para verificar o efeito da associação de cada vitamina com a carbamazepina na hiperalgesia térmica ao frio e ao calor, os animais foram tratados por 5 dias (dia 0 ao dia 4) com as vitaminas B1, B6 e B12 nas doses de 18, 18 e 1,8 mg/kg, s.c., respectivamente, e no dia 4 administrou-se carbamazepina (10 mg/kg, i.p.), imediatamente após a administração de cada vitamina. Animais do grupo controle receberam os respectivos veículos. Os animais foram avaliados antes da cirurgia, no dia 4 após a cirurgia em intervalos de uma hora até a 6ª hora após os tratamentos. É válido ressaltar que para todos os estímulos testados (hiperalgesia térmica ao calor, frio e mecânico), foram utilizados grupos de animais distintos.

3.2.4 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias (e.p.m.) de 5 a 9 animais por grupo. Análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas foi empregada para análise dos dados obtidos nos experimentos de hiperalgesia térmica e mecânica, o tratamento sendo o fator independente e os diferentes tempos de comportamentos nociceptivos avaliados como medidas repetidas. Em caso de diferenças significativas no fator independente e/ou na interação entre o fator independente e os fatores repetidos, análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste *post hoc* Duncan foi

aplicado. Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

A constrição do nervo infraorbital induziu hiperalgesia ao calor, após a aplicação da fonte de calor radiante na face dos animais, sendo esta significativa a partir do 2º dia e persistindo até o 9º dia pós-cirúrgico (Figura 3). Esse aumento na responsividade ao estímulo térmico (calor) não foi observado nos animais falso-operados (grupo sham), os quais mantiveram respostas semelhantes às medidas basais ao longo de todos os experimentos (Figura 3). Pode-se observar que o tratamento diário dos animais com a vitamina B1 (180 mg/kg, s.c., durante 5 dias) foi capaz de impedir o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor em comparação com os animais constritos tratados com veículo (grupo controle, Figura 3A). A figura 3A também mostra que o tratamento com a vitamina B1 não afetou o limiar de resposta dos animais falso-operados. Da mesma forma, o tratamento diário com vitamina B6 (180 mg/kg, s.c., durante 5 dias) dos animais submetidos à CION foi capaz de impedir o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor, se comparado com os animais tratados com veículo (grupo controle, Figura 3B), mas a vitamina não foi capaz de alterar o limiar de responsividade dos animais falso-operados (Figura 3B). Por outro lado, o tratamento diário dos animais com vitamina B12 (18 mg/kg, s.c., durante 5 dias) não influenciou significativamente o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor, visto que no 2º dia após a constrição não houve diferença significativa entre animais constritos tratados com veículo ou vitamina. Entretanto, esse tratamento resultou numa redução significativa da hiperalgesia ao calor a partir do 4º dia até o 9º dia onde foi observada uma reversão da hiperalgesia térmica ao calor desenvolvida (Figura 3C). Esse tratamento também não promoveu alterações nos limiares de resposta dos animais falso-operados (Figura 3C). É válido mencionar que no último dia de tratamento com cada uma das vitaminas (i.e. dia 4 pós-cirúrgico), seu efeito na hiperalgesia foi avaliado em intervalos de uma hora e constatou-se que o pico do efeito anti-hiperalgésico foi na primeira hora após a administração (dados não mostrados). Os valores plotados nos gráficos da figura 3 nos dias 2 e 4 após a cirurgia CION são de uma hora após a administração da vitamina, onde se obteve

o pico do efeito antihiperálgico .

A aplicação do spray de tetrafluoretano na face dos animais (região de inserção das vibrissas) promove rápida diminuição da temperatura da pele, porém a temperatura se restabelece passados 2 minutos da aplicação (CHICHORRO, 2006). Os animais submetidos à constrição do nervo infraorbital desenvolvem hiperálgia a esse estímulo, a qual tem seu pico entre o 4º e o 6º dia, retornando aos níveis basais até o 12º dia após a cirurgia. Como pode ser observado na figura 4, os animais constritos tratados diariamente com veículo desenvolveram hiperálgia térmica ao frio, isto é, tiveram um aumento significativo no tempo de *grooming* facial em relação aos animais falso-operados (grupo sham). O tratamento diário com vitamina B1 (180 mg/kg, s.c., durante 5 dias) ou com vitamina B6 (180 mg/kg, s.c., durante 5 dias), não foi capaz de modificar o tempo de *grooming* facial induzido pela estimulação térmica (frio) nos animais constritos (Figuras 4A e B). Já o tratamento diário dos animais com a vitamina B12 (18 mg/kg, s.c., durante 5 dias), foi capaz de reduzir a hiperálgia térmica ao frio nos dias 6 e 9 quando comparado com o grupo controle (animais constritos tratados com veículo, Figura 4C).

Como ilustrado na figura 5, animais submetidos à cirurgia CION tratados com veículo também desenvolveram hiperálgia mecânica, a partir do 10º ou 12º dia após a cirurgia, sendo evidenciada pela redução do limiar de resposta à aplicação dos filamentos de von Frey na face (Figura 5). O tratamento subcutâneo diário com vitamina B1 ou vitamina B12 nas doses de 180 e 18 mg/kg, respectivamente, não foi capaz de alterar o limiar mecânico dos animais constritos (Figuras 5A e C). Entretanto, o tratamento por 5 dias com a vitamina B6 na dose de 180 mg/kg, s.c., conseguiu impedir o desenvolvimento da hiperálgia mecânica em comparação aos animais constritos tratados com veículo, e este efeito foi mantido durante todo o período de avaliação (i.e. até o 20º dia pós-CION, Figura 5B).

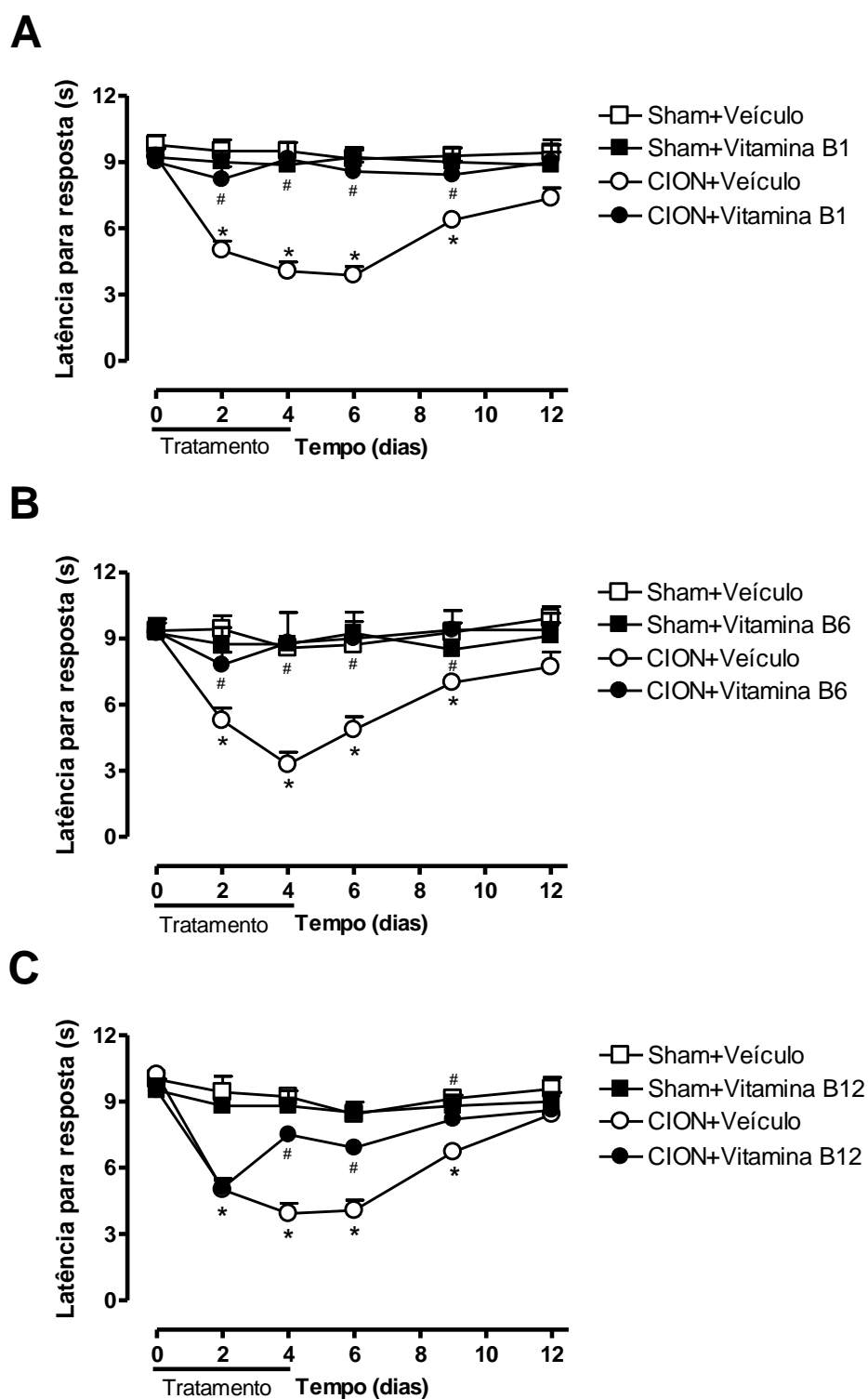
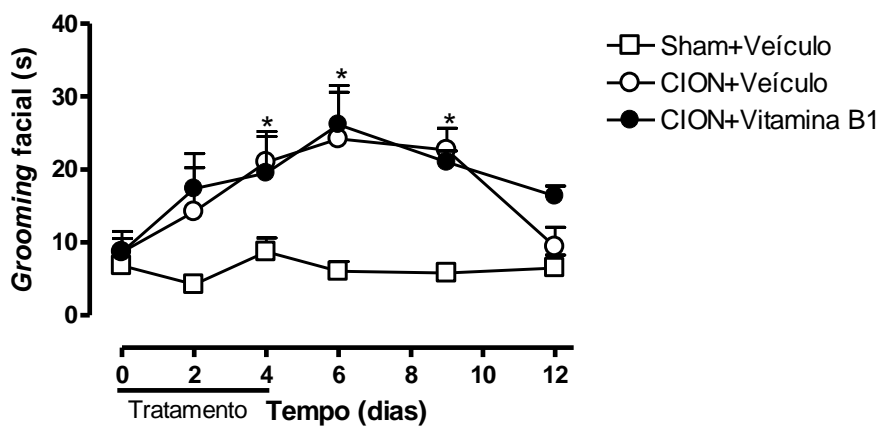
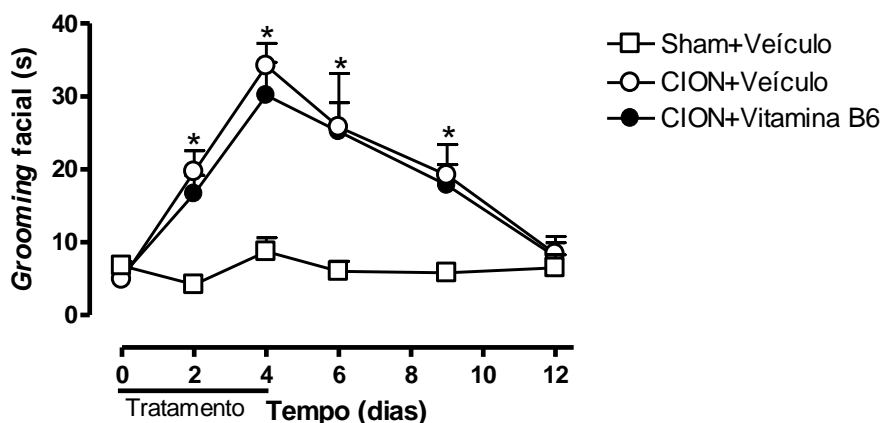


FIGURA 3. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia térmica ao calor induzida por constrição do nervo infraorbital. Os animais foram tratados diariamente por cinco dias (dia 0 ao dia 4 após CION) com vitamina B1 (180 mg/kg, s.c., A), B6 (180 mg/kg, s.c., B) ou B12 (18 mg/kg, s.c., C) e a responsividade ao calor foi avaliada antes (0) e nos dias 2, 4, 6, 9 e 12 após a cirurgia CION. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5-7 animais. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constrictos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de *Duncan*).

A



B



C

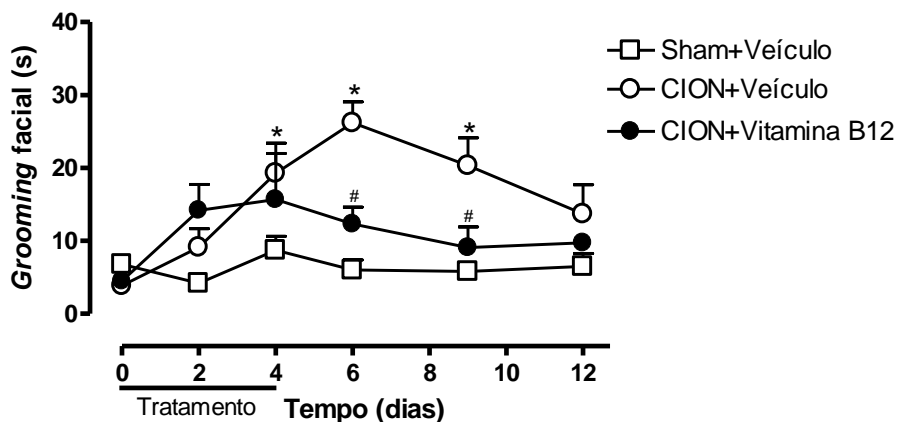


FIGURA 4. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia térmica ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital. Os animais foram tratados diariamente por 5 dias (dia 0 ao dia 4 após CION) com a vitamina B1 (180 mg/kg, s.c., A), B6 (180 mg/kg, s.c., B) ou B12 (18 mg/kg, s.c., C) e a hiperalgesia ao frio foi avaliada antes (0) e nos dias 2, 4, 6, 9 e 12 após a cirurgia CION. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5-7 animais. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constrictos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de *Duncan*).

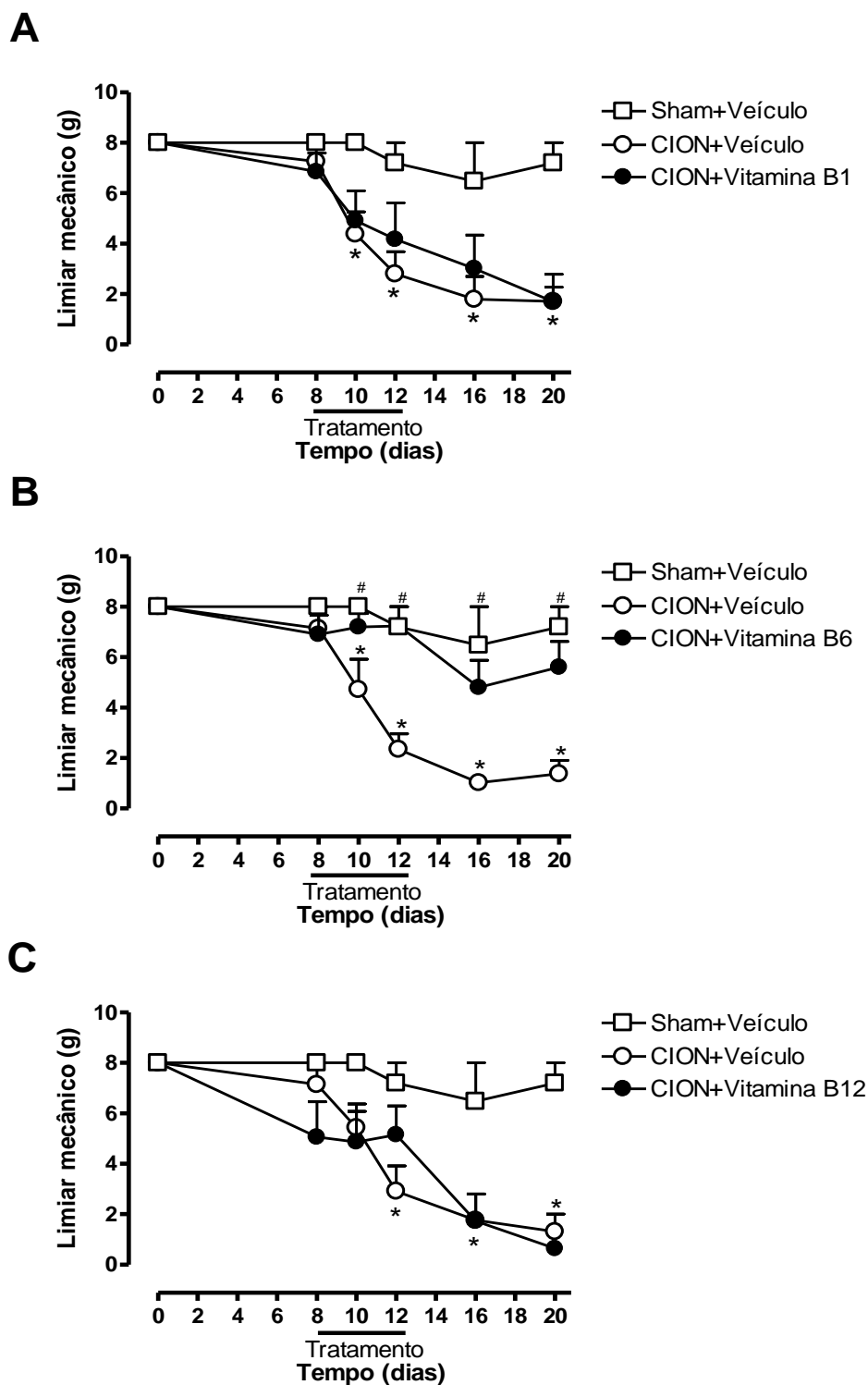


FIGURA 5. Influência de diferentes vitaminas do complexo B na hiperalgesia mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital. Os animais foram tratados diariamente por 5 dias (dia 8 ao dia 12 após CION) com vitamina B1 (180 mg/kg, s.c., A), B6 (180 mg/kg, s.c., B) ou B12 (18 mg/kg, s.c., C) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada antes (0) e nos dias 8, 10, 12, 16 e 20 após a cirurgia CION. Os valores representam a média \pm e.p.m. média de 5-7 ratos. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constritos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de *Duncan*).

4.2 INFLUÊNCIA DA CARBAMAZEPINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

O tratamento dos animais com carbamazepina por via i.p., na dose de 10 mg/kg no dia 4 após a CION, não modificou a latência para resposta dos animais ao estímulo térmico (calor) em relação aos animais constrictos tratados com veículo. Em contraste, nos animais que receberam carbamazepina na dose de 30 mg/kg foi observada uma redução na hiperalgesia térmica na 2^a, 3^a e 4^a horas após a administração, com redução máxima de 82,3% na 3^a hora (Figura 6A).

Com relação à hiperalgesia ao frio, o tratamento com carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.), no 4^o dia após CION, não foi capaz de alterar significativamente o tempo de *grooming* facial dos animais constrictos. No entanto, o tratamento com carbamazepina na dose de 30 mg/kg, foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica ao frio na 1^a, 2^a e 3^a horas após o tratamento (Figura 6B).

É importante mencionar que animais falso-operados (sham) tratados com carbamazepina na dose de 30 mg/kg não mostraram alteração na latência para responsividade ao calor ou no tempo de *grooming* facial após a aplicação do estímulo frio durante todo o período de avaliação (Figuras 6A e B).

Diferentemente da hiperalgesia térmica ao calor ou ao frio, a hiperalgesia mecânica não foi influenciada pelo tratamento dos animais no 20^o dia após a CION com carbamazepina na dose de 30 mg/kg (Figura 6C).

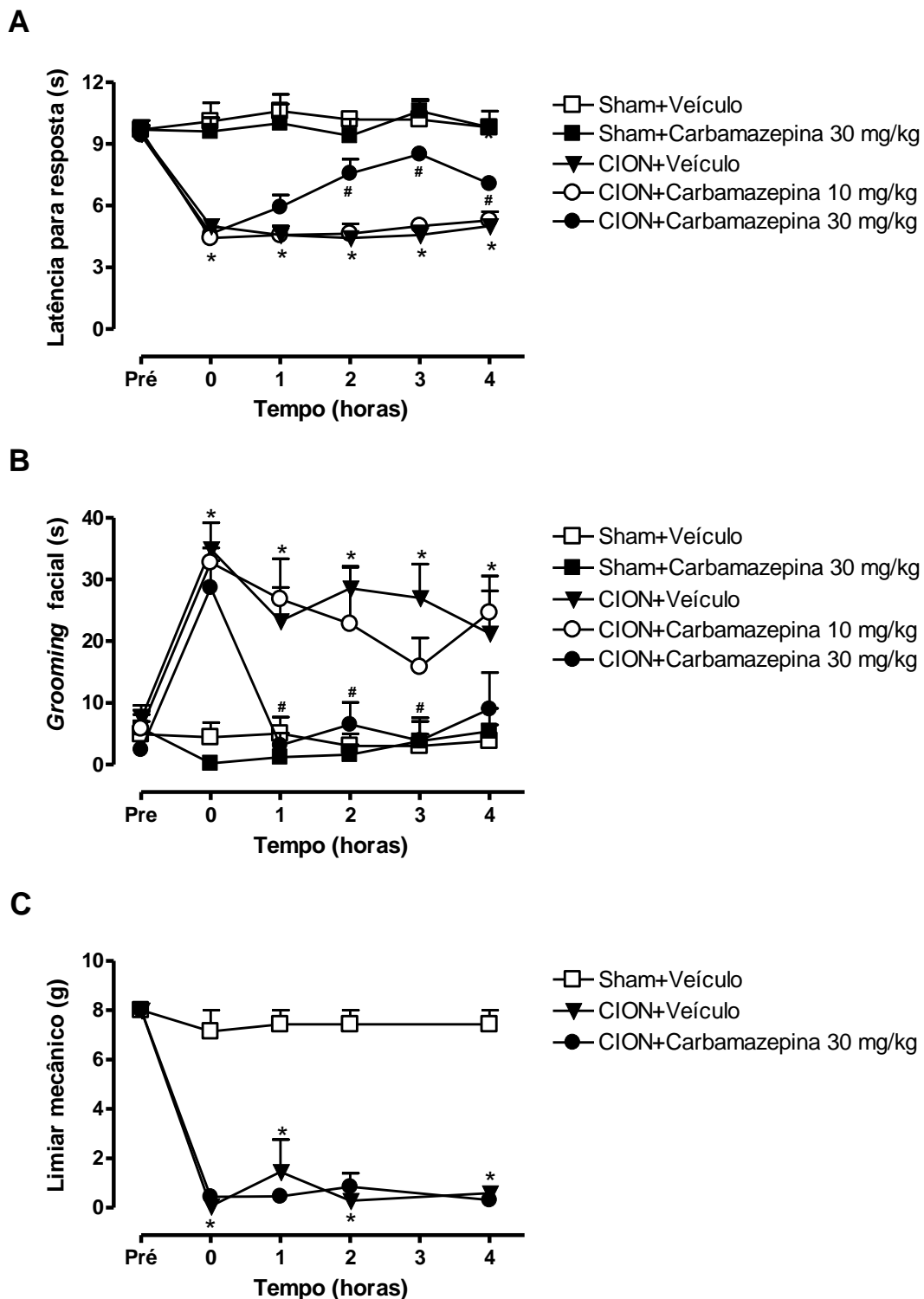


FIGURA 6. Efeito da carbamazepina sobre a hiperalgesia térmica e mecânica induzida por constrição do nervo infraorbital. A hiperalgesia térmica ao calor (A) ou ao frio (B) foi medida antes (pré) e no dia 4 após a cirurgia (0). No painel C, a hiperalgesia mecânica foi avaliada antes (pré) e no dia 20 após a cirurgia (0). Em seguida, os animais foram tratados com veículo (1 mL/kg, i.p.) ou carbamazepina (10 e 30 mg/kg, i.p.) e a hiperalgesia térmica ou mecânica foi avaliada em intervalos de 1 hora até a 4ª hora após a administração. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5-9 ratos. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constritos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de Duncan).

4.3 INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES VITAMINAS B COM CARBAMAZEPINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL

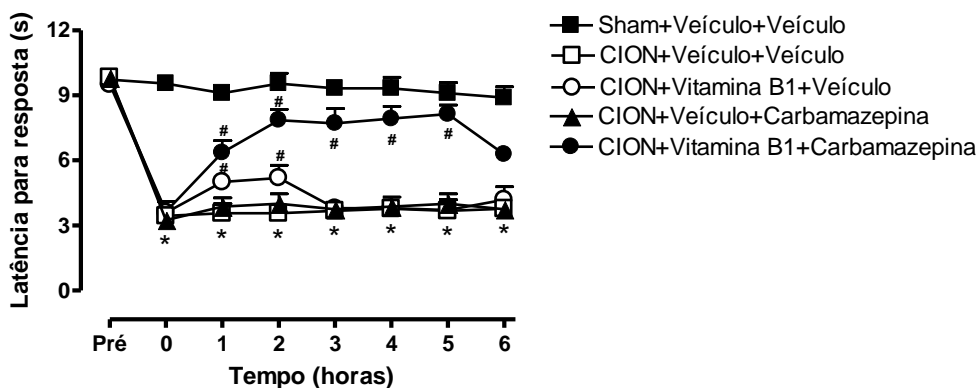
A figura 7A ilustra que o grupo de animais que recebeu o tratamento diário com vitamina B1 na dose de 18 mg/kg (s.c., durante 5 dias) apresentou uma leve redução na hiperalgesia térmica ao calor, na 1ª e 2ª hora após o tratamento, no 4º dia após a CION, com redução máxima de aproximadamente 28%. Adicionalmente, uma única injeção de carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.) no 4º dia após CION, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia térmica ao calor. Contudo, o grupo de animais submetido a injeções repetidas de vitamina B1 (18 mg/kg, s.c., durante 5 dias) e que no 4º dia após a cirurgia recebeu carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.), imediatamente após a administração da vitamina B1, demonstrou redução da hiperalgesia térmica da 1ª a 4ª hora, além de reversão na 5ª hora após a associação.

O tratamento diário dos animais com vitamina B6 na dose de 18 mg/kg (s.c., durante 5 dias) resultou em uma leve redução na hiperalgesia térmica, na 2ª hora após o tratamento, no 4º dia após a CION, com redução máxima de aproximadamente 23%. Adicionalmente, uma única injeção de carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.) no 4º dia após CION, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia térmica ao calor. Já o grupo de animais submetido a repetidas injeções de vitamina B6 (18 mg/kg, s.c., durante 5 dias) e uma única dose de carbamazepina (10 mg/kg, i.p.), no 4º dia após a cirurgia, demonstrou redução da hiperalgesia térmica ao calor na 1ª, 2ª, 3ª e 5ª hora, com pico máximo de redução de aproximadamente 73% na 3ª hora após a associação (Figura 7B).

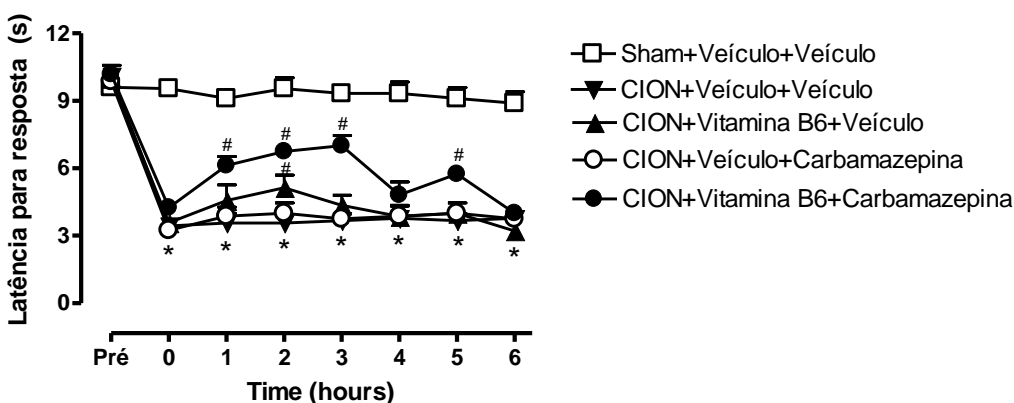
O grupo de animais que recebeu o tratamento diário com vitamina B12 na dose de 1,8 mg/kg (s.c., durante 5 dias), bem como o grupo de animais que recebeu uma única injeção de carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.) no 4º dia após CION, não demonstraram redução da hiperalgesia térmica ao calor. Contudo, o grupo de animais submetido a injeções repetidas de vitamina B12 (1,8 mg/kg, s.c., durante 5 dias) e que no 4º dia após a cirurgia recebeu carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.) demonstrou redução da hiperalgesia térmica da 1ª até a 5ª hora, com redução máxima de aproximadamente 71% na 2ª hora após a associação (Figura 7C).

Com relação à hiperalgesia térmica ao frio, o grupo de animais que recebeu o tratamento diário com vitamina B12 na dose de 1,8 mg/kg (s.c., durante 5 dias) apresentou redução da hiperalgesia térmica ao frio na 1ª e 2ª hora após a última injeção no 4º dia após CION, com redução máxima de aproximadamente 45% na 1ª hora após a administração da vitamina (Figura 8). Como já demonstrado na figura 6B, uma única injeção de carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.) no 4º dia após CION, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia ao frio. Contudo, no grupo de animais submetido a injeções repetidas de vitamina B12 (1,8 mg/kg, s.c., durante 5 dias) e que no 4º dia após a cirurgia CION recebeu carbamazepina na dose de 10 mg/kg (i.p.), imediatamente após a administração da vitamina B12, foi observado um acentuado efeito antihiperálgico na 1ª hora (reversão da hiperalgesia térmica ao frio) e redução significativa da hiperalgesia térmica ao frio na 2ª e 4ª hora após a associação (Figura 8).

A



B



C

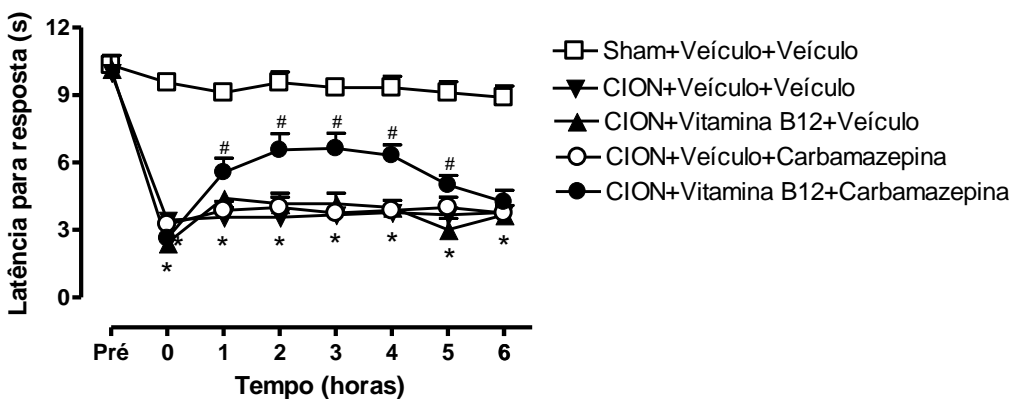


FIGURA 7. Influência da associação de vitaminas do complexo B com carbamazepina na hiperalgesia térmica ao calor induzida por constrição do nervo infraorbital. Os animais foram tratados durante 5 dias com veículo (salina, 1 mL/kg, s.c.), vitamina B1 (18 mg/kg, s.c., A), vitamina B6 (18 mg/kg, s.c., B) ou vitamina B12 (1,8 mg/kg, s.c., C). Os animais foram medidos antes da cirurgia CION (Pré) e no dia 4 após a cirurgia os animais receberam veículo (1 mL/kg, i.p.) ou carbamazepina (10 mg/kg, i.p.) e a hiperalgesia ao calor foi medida antes dos tratamentos (0) e em intervalos de 1 hora até a 6ª hora após os tratamentos. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5-9 ratos. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constrictos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de Duncan).

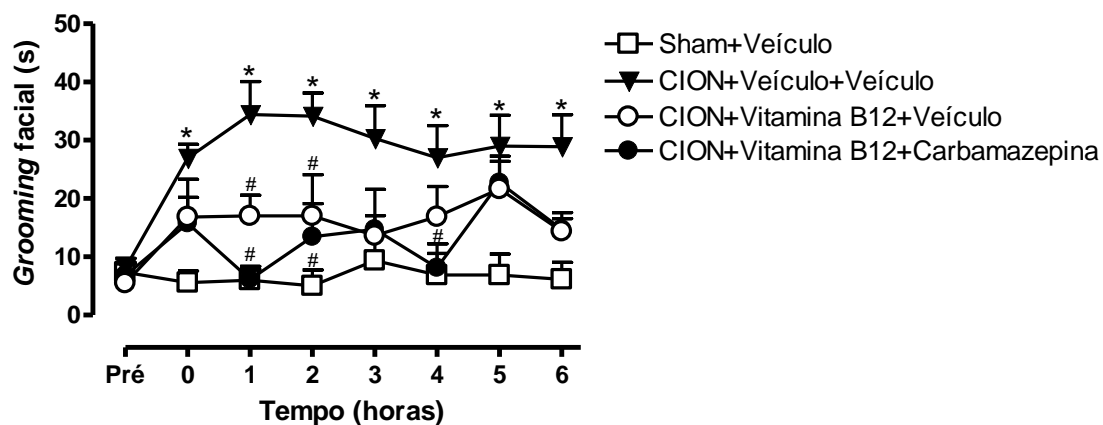


FIGURA 8. Influência da associação da vitamina B12 com carbamazepina na hiperalgesia térmica ao frio induzida por constrição do nervo infraorbital. Os animais foram tratados durante 5 dias com veículo (salina, 1 mL/kg, s.c.), ou vitamina B12 (1,8 mg/kg, s.c., C). Os animais foram medidos antes da cirurgia CION (Pré) e no dia 4 após a cirurgia os animais receberam veículo (1 mL/kg, i.p.) ou carbamazepina (10 mg/kg, i.p.) e a hiperalgesia ao frio foi medida antes dos tratamentos (0) e em intervalos de 1 hora até a 6ª hora após os tratamentos. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5-9 ratos. * e # indicam $P < 0,05$ em relação aos grupos sham (animais falso-operados tratados com veículo) e constritos (animais submetidos à CION tratados com veículo), respectivamente (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por teste *post-hoc* de Duncan).

5 DISCUSSÃO

As vitaminas do complexo B (B1, B6 e B12) têm-se mostrado eficazes no controle da dor em inúmeros estudos pré-clínicos, os quais utilizaram diferentes modelos experimentais de dor, bem como em estudos clínicos que avaliaram pacientes acometidos por dores neuropáticas. Esses trabalhos relatam uma possível atividade analgésica das vitaminas do complexo B, tanto quando administradas isoladamente, como quando empregadas em combinação entre si ou com diferentes fármacos, tais como antiinflamatórios e anticonvulsivantes (BARTOSZYK e WILD 1989; ABBAS E SWAI 1997; SIMEONOV *et al.* 1997; MEDINA-SANTILLÁN *et al.* 2004; CARAM-SALAS *et al.* 2006; MIXCOATL-ZECUATL *et al.* 2008; JOLIVALT *et al.* 2009). Entretanto, ainda não havia sido investigado o possível efeito analgésico das vitaminas do complexo B em um modelo experimental de neuralgia do trigêmeo.

Clinicamente, sabe-se que pacientes que apresentam essa forma de dor neuropática desenvolvem fenômenos positivos bem definidos, sendo os mais comumente relatados a hiperalgesia térmica ao frio e ao calor e a alodinia mecânica. Além disso, os pacientes que sofrem de neuralgia do trigêmeo, quando avaliados através de escalas de dor, sinalizam os mais altos graus da escala e os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis comumente provém apenas o alívio parcial dos sintomas (PETIT *et al.*, 2003; ATTAL, 2010; HARGREAVES, 2011; PARK *et al.*, 2011; ZAKRZEWSKA AND MCMILLAN, 2011). Outro fator limitante da terapia farmacológica para a neuralgia do trigêmeo são os efeitos adversos associados ao uso dos anticonvulsivantes, drogas de escolha para o controle da dor nesta condição (para revisões ver SINDRUP e JENSEN, 1999; BACKONJA, 2002; JENSEN, 2002).

Tendo em vista essas considerações, nesse estudo avaliamos a influência do tratamento diário, repetido por cinco dias, com as vitaminas B1, B6 e B12 do complexo B em um modelo experimental de neuralgia do trigêmeo. Conforme relatado anteriormente, esse modelo permite verificar fenômenos comumente descritos clinicamente, tais como hiperalgesia térmica e mecânica (VOS *et al.*, 1994; IMAMURA *et al.*, 1997; CHICHORRO, 2006). Outra característica desse modelo, também já descrita em estudos anteriores, é a diferença no decurso temporal para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica, que geralmente se

inicia no 2º dia pós-CION e persiste até o 10º ou 12º dia, em relação à hiperalgesia mecânica, que se inicia a partir do 10º ou 12º dia pós-CION e persiste por pelo menos 120 dias (VOS *et al.*, 1994; NEUBERT *et al.*, 2005; CHICHORRO, 2006; LUIZ *et al.*, 2010). Assim sendo, os protocolos de tratamento adotados neste estudo foram estabelecidos de acordo com os decursos temporais previamente demonstrados.

No presente estudo, o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor e ao frio após lesão do nervo infraorbital apresentou decurso temporal semelhante àquele já descrito na literatura (VOS *et al.*, 1994; IMAMURA *et al.*, 1997; CHICHORRO, 2006). O efeito antihiperalgésico mais pronunciado das vitaminas do complexo B foi observado na hiperalgesia ao calor, a qual foi significativamente reduzida ou teve seu decurso temporal modificado, dependendo da vitamina utilizada. Quando administradas individualmente e em doses mais altas, tanto a vitamina B1 quanto a vitamina B6 impediram o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor no transcorrer de todo o período de avaliação. A vitamina B12 também apresentou marcante e persistente efeito antihiperalgésico frente a este estímulo, mas diferentemente das outras vitaminas, a dose 10 vezes menor de vitamina B12 em comparação as outras duas vitaminas não impediu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor.

A despeito dessa diferença, é válido ressaltar que o tratamento com as três vitaminas foi capaz de influenciar a hiperalgesia ao calor. Corroborando nossos achados, Wang e colaboradores (2005) demonstraram, utilizando dois modelos diferentes de dor neuropática (i.e. compressão do gânglio da raiz dorsal, DRG, e ligação do nervo ciático), que as vitaminas B1, B6 e B12 administradas separadamente ou em associação foram capazes de reduzir, ou dependendo da dose até mesmo abolir, o desenvolvimento da hiperalgesia térmica em ratos. Um efeito agudo destas vitaminas também foi demonstrado após compressão do DRG em ratos, pois, uma única administração de cada uma das vitaminas B, inibiu a hiperalgesia térmica por até 48 horas após a administração, e quando combinadas foi observada uma potencialização do efeito antihiperalgésico. Resultado semelhante foi relatado na hiperalgesia térmica após constrição do nervo ciático de ratos. Ainda no modelo de compressão do DRG, o tratamento com as vitaminas durante 7 ou 14 dias também interferiu no decurso temporal da

hiperalgesia térmica, reduzindo a duração da hiperalgesia de 10 para 5 semanas (WANG *et al.*, 2005).

Esses autores relatam ainda que os efeitos antihiperalgésicos das vitaminas do complexo B são semelhantes em ambos os modelos (compressão do gânglio espinhal e ligação do nervo ciático, WANG *et al.*, 2005), os quais resultam em hiperalgesia térmica de duração maior que o modelo utilizado nesse estudo (CION). Nesse sentido, sugere-se que apesar desses modelos serem diferentes quanto ao sítio da lesão, eles apresentam mecanismos comuns no que diz respeito às alterações de excitabilidade de neurônios periféricos e centrais (SONG *et al.* 2003). Apesar das evidências de que o modelo de neuralgia do trigêmeo difere, não só anatomicamente, mas também em termos de mecanismos envolvidos, dos modelos que envolvem lesão de nervos espinhais (BARANAUSKAS e NISTRÌ, 1998; para revisões ver SESSLE, 2006; HARGREAVES, 2011), as vitaminas do complexo B estudadas parecem reduzir a hiperalgesia térmica ao calor neste estudo da mesma maneira que o fazem nos modelos que envolvem neuropatias dos DRGs avaliados no trabalho de Wang *et al.*, 2005.

O efeito da vitamina B1 em reduzir a hiperalgesia térmica ao calor também foi reportado por Song e colaboradores, no modelo de compressão do DRG em ratos (SONG *et al.*, 2009). Nesse estudo demonstrou-se que a vitamina B1 (na dose de 66 mg/kg), administrada diariamente por 10-14 dias logo após o término do procedimento cirúrgico, reduziu a hiperalgesia térmica ao calor na pata dos animais. Interessantemente, uma única administração intratecal de vitamina B1 também mostrou efeito antihiperalgésico ao calor de maneira dose-dependente. Esses autores mostraram ainda, através de técnica de eletrofisiologia (*whole-cell patch-clamp*), que o tratamento com a vitamina B1 foi capaz de promover a redução da hiperexcitabilidade e diminuição das alterações dos canais de sódio no gânglio da raiz dorsal de animais submetidos à lesão do DRG, e que as fibras de pequeno diâmetro eram mais responsivas à aplicação de vitamina B1. Esses dados em conjunto sugerem que a vitamina B1 poderia atenuar a hiperalgesia térmica através da redução das alterações nas correntes dos canais de sódio em fibras de pequeno diâmetro (SONG *et al.*, 2009). Considerando que alterações em canais de sódio, como por exemplo, o aumento significativo da sua expressão nas

áreas do nervo trigêmeo que sofrem compressão, são consideradas fundamentais na patofisiologia da neuralgia do trigêmeo (para revisões LEWIS *et al.*, 2007; KLEEF *et al.*, 2009; BENOLIEL e SHARAV, 2010), o mecanismo proposto por Song e colaboradores (2009) poderia explicar o efeito das vitaminas em nosso modelo. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar se: 1) isto ocorre no nervo trigêmeo após os tratamentos com as vitaminas, 2) este mecanismo está associado apenas ao uso da vitamina B1 ou é também um mecanismo comum a todas as vitaminas do complexo B, e 3) as vitaminas nas doses e esquema de administração que nós empregamos produziriam este mesmo efeito.

Adicionalmente, nossos dados mostram que a carbamazepina, medicamento de escolha e o único aprovado pelo FDA para o tratamento da neuralgia do trigêmeo, também foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor, assim como demonstrado em trabalhos anteriores pelo nosso grupo (CHICHORRO, 2006). Embora já descrito na introdução, é importante ressaltar que a carbamazepina atua principalmente através do bloqueio de canais de sódio (CARDENAS *et al.*, 2006; PRIEST, 2009), um dos mecanismos propostos para explicar o efeito antihiperalgésico das vitaminas do complexo B.

Interessantemente, quando doses 10 vezes mais baixas das vitaminas, as quais demonstravam pouca ou nenhuma ação antihiperalgésica, foram associadas com uma dose mais baixa de carbamazepina insuficiente para alterar o tempo de reação dos animais, observou-se um efeito antihiperalgésico bastante significativo e persistente, com as três vitaminas testadas. Esses dados sugerem um possível sinergismo no efeito combinado das vitaminas com a carbamazepina. Porém, devido à falta de estudos a respeito dos mecanismos de ação das vitaminas do complexo B não se pode afirmar se essa interação farmacológica envolve os canais de sódio.

Por outro lado, já foram descritos vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor em condições de dor neuropática. Mais especificamente com relação ao modelo CION, podemos destacar a ativação de purinorreceptores do tipo P2X3 e P2Y, e do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) (PEI *et al.*, 2007; SHINODA *et al.*, 2007; MALIN *et al.*, 2008; HOLZER, 2011).

Os receptores P2X3 (purinoreceptor ionotrópico) são expressos principalmente em neurônios do DRG, mas também em subpopulações de fibras aferentes primárias do sistema trigeminal. São ativados principalmente por ATP, e diversos estudos demonstraram que antagonistas desses receptores inibem a hiperalgesia térmica em diferentes modelos de dor, inclusive em modelos de neuralgia do trigêmeo (TSUDA *et al.*, 2000; HONORE *et al.*, 2002; MCGARAUGHTY *et al.*, 2003; SHINODA *et al.*, 2007).

Outro receptor possivelmente envolvido na hiperalgesia térmica ao calor é o P2Y2 (purinoreceptor metabotrópico), que a exemplo do receptor P2X3, também é ativado por ATP. Purinoreceptores P2Y2 são considerados importantes para transmitir a sensação de calor nocivo e parecem atuar através da fosforilação de receptores TRPV1, ocasionando sua ativação (MORIYAMA *et al.*, 2003; MALIN *et al.*, 2008). Os purinoreceptores P2Y2 estão intimamente associados à hiperalgesia térmica ao calor em diferentes modelos de neuropatia, inclusive em modelos de neuralgia trigeminal (para revisões ver BURNSTOCK, 2000, 2006; WIRKNER *et al.*, 2007).

Os receptores TRPV1 estão expressos em fibras C e em menor proporção em fibras A δ e normalmente possuem um limiar de ativação acima de 42° C, caracterizando um papel na detecção de calor nocivo (CATERINA *et al.*, 2000; PEI *et al.*, 2007; GERHOLD e BAUTISTA, 2009). Devido às inúmeras evidências da participação destes receptores na hiperalgesia em diversas condições dolorosas, eles têm sido estudados tanto como alvos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas, quanto considerados possíveis alvos na identificação dos mecanismos de ação de drogas já existentes, as quais apresentam potencial analgésico (CATERINA *et al.*, 2000; BINSHTOK *et al.*, 2007; PEI *et al.*, 2007; HOLZER, 2011).

Portanto, o desenvolvimento de estudos adicionais com o objetivo de investigar o mecanismo de ação das vitaminas do complexo B é necessário para determinar se as mesmas são capazes de interagir com alguns dos alvos acima sugeridos.

Além de ser o primeiro grupo a demonstrar os possíveis efeitos antihiperalgésicos das vitaminas do complexo B no modelo de neuralgia do trigêmeo, nesse estudo também investigamos pela primeira vez o efeito das

vitaminas do complexo B na hiperalgesia ao frio. No entanto, o tratamento com as vitaminas B1 e B6 isoladamente, nas mesmas doses utilizadas para o estímulo calor, não foi capaz de promover alterações na hiperalgesia térmica ao frio promovida pela constrição do nervo infraorbital. Por outro lado, o tratamento com a vitamina B12 foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio nos dias 6 e 9 pós-cirúrgicos. De maneira similar, a carbamazepina, na maior dose testada reduziu a hiperalgesia térmica ao frio, corroborando a demonstração prévia de Chichorro (2006). Como a vitamina B12 foi a única que demonstrou efeito antihiperalgésico nesse estímulo, repetimos sua associação (em uma dose 10 vezes menor) com a carbamazepina. Quando associadas demonstraram um pronunciado efeito antihiperalgésico na primeira hora e redução da hiperalgesia térmica significativa na segunda e quarta hora após os tratamentos, sugerindo novamente um efeito antihiperalgésico sinérgico. Portanto, a vitamina B12 foi a única capaz de reduzir a hiperalgesia ao frio na administração individual, além de interagir farmacologicamente quando em associação com a carbamazepina. É válido ressaltar que a vitamina B12, administrada isoladamente na maior dose, não impede o desenvolvimento da hiperalgesia ao frio. Ainda, na menor dose, a vitamina B12 promove uma pequena redução nas primeiras duas horas após a administração da vitamina, porém quando associada à carbamazepina apresenta efeito antihiperalgésico já no 4º dia após a CION. Considerando que esta é a primeira demonstração do efeito das vitaminas na hiperalgesia ao frio, o mecanismo de ação associado a este efeito também ainda não foi investigado. Por outro lado, inúmeros estudos têm investigado os receptores que medeiam a hiperalgesia ao frio (GERHOLD e BAUTISTA, 2009; FAROOQI *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012), sendo os principais os receptores TRPA1, TRPM8 e canais de potássio, os quais poderiam ser alvos para ação da vitamina B12.

Os receptores TRPA1 e TRPM8 também são integrantes da superfamília dos receptores de potencial transitório, assim como o TRPV1. Como já descrito anteriormente, os receptores TRPV1 são expressos por fibras C, e uma subpopulação destas fibras também expressa receptores TRPA1. Já os receptores TRPM8 estão presentes em um subpopulação distinta de fibras C, a qual não expressa receptores TRPA1 (CASPERANI *et al.*, 2009; DEL CAMINO *et al.*, 2010). Ambos são encontrados no sistema sensorial trigeminal, porém diferem

quanto ao seu limiar de ativação, sendo que receptores TRPA1 são ativados por frio nocivo (abaixo de 15°C), enquanto que receptores TRPM8 são receptores ativados por temperaturas baixas não nocivas (em torno de 25°C) (CASPERI *et al.*, 2009; GERHOLD e BAUTISTA, 2009; FAROOQI *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). Atualmente, vários estudos sugerem que esses receptores podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de novos analgésicos (DEL CAMINO *et al.*, 2010; FAROOQI *et al.*, 2011; HOLZER, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012).

Adicionalmente, existem diversas evidências de que os canais de potássio operados por voltagem também participam na transdução do estímulo térmico frio (VIANA *et al.*, 2002; para revisão ver TAKEDA *et al.*, 2011). Takeda *et al.* (2011) demonstraram que esses canais estão envolvidos em algumas alterações sensoriais associadas à dor neuropática, incluindo a de origem trigeminal, e que os mesmos parecem ser um alvo promissor para o tratamento da neuralgia do trigêmeo. Sabe-se que muitos canais de potássio estão envolvidos com excitabilidade neuronal, especialmente os canais de potássio operados por voltagem. Tanto no DRG quanto no gânglio trigeminal são expressos três tipos de canais de potássio operados por voltagem, classificados de acordo com sua cinética de inativação (para revisão ver TAKEDA *et al.*, 2011). A abertura desses canais promove hiperpolarização das células, diminuindo, portanto, a hiperexcitabilidade celular. Porém, tem sido demonstrado que lesões nas fibras nervosas periféricas levam à redução da densidade desses canais, o que poderia deixar as fibras sensoriais mais responsivas a determinados estímulos, como por exemplo, ao frio nocivo (para revisão ver TAKEDA *et al.*, 2011). Nesse sentido, em células do gânglio do trigêmeo de camundongos, Viana *et al.*, (2002) demonstraram que ocorria um fechamento dos canais de potássio nas células responsivas ao frio, o que impedia a hiperpolarização celular e deixava, portanto, as células mais responsivas à estimulação térmica. Em vista dessas observações, experimentos futuros poderão ser conduzidos para avaliar se algum dos receptores de frio mencionados representa um alvo efetivo para ação da vitamina B12.

Por fim, nossos dados mostram que apenas o tratamento diário com a vitamina B6 promoveu efeito antihiperalgésico ao estímulo mecânico. O efeito das vitaminas neste estímulo tem sido bastante avaliado em modelos de dor

neuropática. Inclusive, a grande maioria dos estudos que têm descrito efeitos sinérgicos como resultado da associação das vitaminas do complexo B com anticonvulsivantes, ou drogas de outras classes farmacológicas, avaliaram hiperalgia mecânica na pata dos animais (CARAM-SALAS *et al.*, 2004, 2006; MEDINA-SANTILLÁN *et al.*, 2004; MIXCOALT-ZECUALT *et al.*, 2008).

Granados-Soto e colaboradores (2004), utilizando o modelo de dor neuropática por ligação de nervos espinhais em ratos, observaram um efeito antihiperalgésico dose-dependente da vitamina B12 ao estímulo mecânico. Ainda nesse estudo, a utilização de um antiinflamatório não esteroide, o diclofenaco, promoveu uma leve redução da alodinia mecânica na maior dose utilizada. Porém, a associação dessas duas drogas em doses reduzidas não promoveu qualquer potencialização do efeito antihiperalgésico.

Utilizando o mesmo modelo de dor neuropática (ligação dos nervos espinhais L5 e L6), uma única administração das vitaminas B1, B6 e B12, combinadas entre si ou associadas à dexametasona, promover efeito antihiperalgésico ao estímulo mecânico aplicado na pata dos animais (CARAM-SALAS *et al.*, 2004). Nesse estudo, o efeito antihiperalgésico máximo observado ao estímulo mecânico foi obtido nas doses de 180, 180 e 1,8 mg/kg das vitaminas B1, B6 e B12, respectivamente, as quais são semelhantes às doses utilizadas no presente estudo.

Em 2006, o mesmo grupo demonstrou que as vitaminas B1 e B12 apresentaram efeito antihiperalgésico à estimulação mecânica, nas maiores doses utilizadas (600 e 6 mg/kg, respectivamente), promovendo redução máxima de 60% da hiperalgia mecânica, avaliada na pata de animais previamente submetidos à ligação dos nervos espinhais L5 e L6. Já a vitamina B6 não demonstrou efeito antihiperalgésico, mesmo na maior dose testada (600 mg/kg). Nesse estudo, a dexametasona também reduziu a hiperalgia mecânica, de forma dose-dependente e, quando associada às vitaminas B1 e B12 observou-se uma redução de 90% da hiperalgia mecânica (CARAM-SALAS *et al.*, 2006).

Sánchez-Ramírez *et al.* (2006) demonstraram que a administração de benfotiamina, um derivado da vitamina B1, também promoveu uma diminuição significativa da hiperalgia mecânica em dois modelos diferentes de dor neuropática, a neuropatia diabética induzida por estreptozotocina e aquela

causada por ligação dos nervos espinhais L5 e L6.

Corroborando trabalhos anteriores, Reyes-Garcia e colaboradores (2003), através do modelo de dor neuropática desenvolvido por Kim e Chung (1992), demonstraram um efeito antihiperálgico dose-dependente ao estímulo mecânico da combinação das vitaminas B1, B6 e B12 (proporção de 100/100/1, respectivamente), e este efeito produziu uma redução máxima de 30% da hiperálgia medida na pata dos animais. Em adição, o anticonvulsivante gabapentina, administrado por via intratecal, produziu reversão dose-dependente da hiperálgia mecânica, e quando associado com as vitaminas B, ambos em doses mais baixas, resultou em um efeito antihiperálgico sinérgico ao estímulo mecânico.

Ainda com relação à associação de anticonvulsivantes com as vitaminas B, Reyes-Garcia e colaboradores (2004), através do mesmo modelo de dor neuropática mencionado anteriormente, observaram que as vitaminas B1, B6 e B12 em combinação, bem como o tratamento com gabapentina, promoviam redução dose-dependente da hiperálgia mecânica. Esse efeito antihiperálgico também foi demonstrado com a associação da combinação de vitaminas com a gabapentina, além de uma reversão da hiperálgia mecânica quando as vitaminas B1, B6 e B12 foram combinadas nas doses de 262 mg/kg para as duas primeiras e 2,6 mg/kg para a última com a gabapentina na dose de 11,5 mg/kg .

Mixcoalt-Zecualt *et al.* (2008) relataram que a associação das drogas anticonvulsivantes gabapentina ou carbamazepina com a benfotiamina ou com a vitamina B12 produziu um efeito sinérgico na redução da hiperálgia mecânica. O mesmo estudo também mostrou que a carbamazepina foi capaz de promover um efeito antihiperálgico ao estímulo mecânico em ratos submetidos à ligação de nervos espinhais sem afetar a coordenação motora dos animais. No presente estudo também utilizamos a carbamazepina em doses, que segundo alguns autores, não afetam a coordenação motora dos animais (BLACKBURN-MUNRO *et al.*, 2002; MIXCOALT-ZECUALT *et al.*, 2008), mas, apesar desse tratamento ter atenuado a hiperálgia térmica após constrição do nervo infraorbital, não modificou a hiperálgia mecânica. Tendo em vista que vários dos estudos que observaram o efeito das vitaminas do complexo B na hiperálgia mecânica as utilizaram combinadas entre si, e em algumas vezes associadas ainda com outras

drogas, uma possibilidade a ser avaliada é se a combinação das vitaminas B1, B6 e B12 em associação com a carbamazepina poderia influenciar a hiperalgisia mecânica em nosso modelo.

Empregando um modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, Jolivalt *et al.* (2009) reportaram que a administração de um coquetel contendo as vitaminas B1, B6 e B12, por 7 dias consecutivos, promoveu um efeito antihiperalgésico dose-dependente ao estímulo mecânico avaliado na pata dos animais. Em constraste, Misumi e colaboradores (1985) não observaram redução da hiperalgisia mecânica no modelo de neuropatia diabética por administração de 2,5-hexanediona com o tratamento dos animais com as vitaminas B6 e B12. Corroborando esses dados, Wang e colegas (2005), utilizando dois modelos de dor neuropática (i.e. compressão do gânglio espinal e ligação do nervo ciático), mostraram que a administração das vitaminas B1, B6 e B12 isoladas ou em combinação não influenciava a hiperalgisia mecânica, porém promovia a inibição da hiperalgisia térmica ao calor, como já mencionado acima.

Essa discrepância nos efeitos antihiperalgésicos das vitaminas do complexo B podem estar relacionada a vários fatores, tais como o modelo de dor neuropática empregado, doses, vias de administração e o período de tratamento com as vitaminas. Nossos dados também nos permitem especular que cada vitamina B possa ter um alvo distinto e/ou module mecanismos e/ou vias analgésicas diferentes, visto que em um mesmo modelo (i.e. constrição do nervo infraorbital) apenas a vitamina B12 reduziu a hiperalgisia ao frio, apenas a B6 atenuou a hiperalgisia mecânica, enquanto todas influenciaram a hiperalgisia térmica ao calor. Nesse sentido, alguns estudos vem tentando elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos antihiperalgésicos das vitaminas B. Uma descoberta adicional do estudo de Jolivalt e colaboradores (2009) foi que a vitamina B6 isolada (180 mg/kg) ou a combinação das vitaminas B1, B6 e B12 (nas doses de 180, 180 e 1,8 mg/kg, respectivamente) promove a melhora da velocidade de condução de nervos sensoriais, provavelmente por um aumento na produção de mielina em fibras mielinizadas alteradas, um dos parâmetros alterados em decorrência da neuropatia diabética. Jolivalt e colaboradores (2009) também investigaram se as vitaminas estavam interferindo com oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e alterações na expressão do fator de necrose

tumoral alfa (TNF α) e da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), porém não encontraram nenhuma correlação entre os efeitos antihiperalgésicos das vitaminas e alterações nesses alvos.

Outro mecanismo que tem sido sugerido para explicar o efeito analgésico das vitaminas diz respeito ao aumento do controle inibitório aferente de neurônios nociceptivos na medula espinhal, possivelmente através da indução da síntese de neurotransmissores que atuam nesse sistema inibitório, tais como serotonina, noradrenalina e opióides endógenos (FU *et al.* 1998).

Apesar de seus mecanismos analgésicos serem desconhecidos, os estudos pré-clínicos, bem como os estudos clínicos com vitaminas do complexo B são muito promissores, em nossa opinião, por duas razões principais: o baixo risco de efeitos adversos relacionados ao uso de vitaminas B e a possibilidade de serem utilizados como adjuvantes no controle da dor. Vários estudos experimentais relataram a inexistência de sinais de comprometimento motor (um efeito adverso comum relacionado ao uso de anticonvulsivantes), mesmo após tratamento repetido ou com altas doses de vitaminas do complexo B (REYES-GARCIA *et al.*, 2003, 2004; GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004; MIXCOALT-ZECUALT *et al.*, 2008). Com relação ao seu uso como adjuvantes, nossos resultados corroboram vários estudos anteriores (REYES-GARCIA *et al.*, 2003, 2004; GRANADOS-SOTO *et al.*, 2004; CARAM-SALAS *et al.*, 2004, 2006; MIXCOALT-ZECUALT *et al.*, 2008), os quais têm demonstrado os efeitos sinérgicos das vitaminas quando associadas a drogas de diferentes classes farmacológicas, permitindo assim a utilização de doses mais baixas desses fármacos, o que conseqüentemente, reduz o risco de aparecimento de efeitos adversos. Nesse sentido, é importante relatar o estudo de MEDINA-SANTILLÁN *et al.* (2004) em pacientes com neuropatia diabética. Esses autores avaliaram a ocorrência de efeitos adversos após o uso de gabapentina, administrada isoladamente, ou em associação às vitaminas B1 e B12. Um grupo de pacientes recebeu doses crescentes de gabapentina a cada semana, durante três semanas, enquanto que o outro grupo recebeu doses crescentes de gabapentina associadas às vitaminas B1 e B12. Os resultados obtidos com as avaliações dos pacientes levaram esses autores a sugerir que a associação com as vitaminas ocasionou diminuição dos efeitos adversos promovidos pelo anticonvulsivante.

6 CONCLUSÃO

Como pode ser observado no esquema abaixo, todas as vitaminas do complexo B testadas reduziram a hiperalgesia térmica ao calor, induzida por constrição do nervo infraorbital, enquanto que apenas a vitamina B6 modificou a hiperalgesia mecânica e apenas a vitamina B12 reduziu a hiperalgesia ao frio. O tratamento com Carbamazepina resultou na redução da hiperalgesia térmica (ao frio e ao calor, mas não modificou a hiperalgesia mecânica. A associação de cada um das vitaminas com a carbamazepina (ambas em doses mais baixas), resultou em um efeito antihiperalgésico sinérgico na hiperalgesia térmica.

Tratamentos	Hiperalgesia ao calor	Hiperalgesia ao frio	Hiperalgesia mecânica
B1 (180 mg/kg)	+	-	-
B6 (180 mg/kg)	+	-	+
B12 (18 mg/kg)	+	+	-
CBZ (10 mg/kg)	-	-	NT
CBZ (30 mg/kg)	+	+	-
B1 (18 mg/kg) + CBZ (10 mg/kg)	+	NT	NT
B6 (18 mg/kg) + CBZ (10 mg/kg)	+	NT	NT
B12 (1,8 mg/kg) + CBZ (10 mg/kg)	+	+	NT

ESQUEMA 1. Influência do tratamento com as vitaminas B1, B6 e B12 e da Carbamazepina isoladamente, ou de cada vitamina em combinação com a Carbamazepina na hiperalgesia a diferentes estímulos aplicados na face dos animais após constrição do nervo infraorbital. Os símbolos +, - e NT indicam reduziu, não reduziu e não testado, respectivamente.

Em conclusão, nossos dados sugerem que as vitaminas do complexo B, utilizadas isoladamente ou em associação com fármacos como a carbamazepina, poderiam representar uma abordagem mais segura e de baixo custo no controle da dor neuropática trigeminal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z. G.; SWAI, A. B. Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. **East Afr Med J**, v. 74, n. 12, p. 803–808, 1997.
- AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; WOOD, J. N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. **Nature**, v. 379, n. 6562, p. 257–262, 1996.
- ALLEN, L. H. Bioavailability of vitamin B12. **Int J Vitam Nutr Res**, v.80, n. 4-5, p. 330-335, 2010.
- AMBRÓSIO, A. F.; SOARES-DA-SILVA, P.; CARVALHO, C. M.; CARVALHO, A. P. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. **Neurochem Res**, v. 27, n. 1-2 , p. 121-130, 2002.
- ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacol Ther**, v. 133, n. 2, p.189-204, 2012.
- ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; HAANPÄÄ, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; NURMIKKO, T.; EUROPEAN FEDERATION OF NEUROLOGICAL SOCIETIES. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, v. 17, n. 9, p. 1113-1188, 2010.
- BACKONJA, M. M. Use of anticonvulsivants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**, v. 59, n. 5, suppl2:S14-S17, 2002.
- BARANAUSKAS, G.; NISTRÌ, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. **Prog in Neurob**, v. 54, n.3, p. 349-365, 1998.
- BARTOSZYK, G. D.; WILD, A. B-vitamins potentiate the antinociceptive effect of diclofenac in carrageenin-induced hyperalgesia in the rat tail pressure test. **Neurosci Lett**, v. 101, n.1, p. 95-100, 1989.
- [A]BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; TAL, M. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. **Neurosc Lett**, v. 297, n. 3, p. 151-154, 2001.
- [B]BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; IADAROLA, M. J. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? **Pain**, v. 91, n. (1-2), p. 111-121, 2001.
- BENOLIEL, R.; ELIAV, E. Neuropathic orofacial pain. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 20, n. 2, p.237-254, 2008.
- BENOLIEL, R.; SHARAV, Y. Chronic orofacial pain. **Curr Pain Headache Rep**, v. 14, n. 1, p. 33–40, 2010.
- BINSHTOK, A. M.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-

mediated entry of impermeant sodium channel blockers. **Nature**, v. 449, n.7162, p. 607-610, 2007.

BONEZZI, C.; ALLEGRI, M.; DEMARTINI, L.; BUONOCORE, M. The pharmacological treatment of neuropathic pain. **Eur J Pain**, suppl3, S85–S88, 2009.

BLACKBURN-MUNRO, G.; IBSEN, N.; ERICHSEN, H. K. A comparison of the anti-nociceptive effects of voltage-activated Na⁺ channel blockers in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, v. 445, n. 3, p. 231– 238, 2002.

BLOM, S. Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). **Lancet**, v. 1, n. 7234, p. 839-840, 1962.

BURNSTOCK, G. P2X receptors in sensory neurones. **Br J Anaesth**, v. 84, n. 4, p. 476-488, 2000.

BURNSTOCK, G. Purinergic P2 receptors as targets for novel analgesics. **Pharmacol Ther**, v. 110, n. 3, p. 433-454, 2006.

CARAM-SALAS, N. L.; MEDINA-SANTILLAN, R.; REYES-GARCIA, G.; GRANADOS-SOTO, V. Antinociceptive synergy between Dexamethasone and B vitamin complex in a neuropathic pain model in the rat. **Proc West Pharmacol**, v. 47, p. 88-91, 2004.

CARAM-SALAS, N. L.; MEDINA-SANTILLAN, R.; REYES-GARCIA, G.; GRANADOS-SOTO, V. Thiamine and Cyanocobalamin relieve neuropathic pain in rats: synergy with Dexamethasone. **Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 53–62, 2006.

CARDENAS, C. A.; CARDENAS, C. G.; DE ARMENDI, A. J.; SCROGGS, R. S. Carbamazepine interacts with a slow inactivation state of NaV1.8- like sodium channels. **Neurosci Lett**, v. 408, n. 2, p. 129-134, 2006.

CASPANI, O.; ZURBORG, S.; LABUZ, D.; HEPPENSTALL, P. A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p.7383, 2009.

CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.

CHIAIA N.L., BENNETT-CLARKE C.A., RHOADES R.W. Differential effects of peripheral damage on vibrissa-related patterns in trigeminal nucleus principalis, subnucleus interpolaris, and subnucleus caudalis. **Neuroscience**, v.49, n. 1, p. 141-156, 1992.

CHICHORRO, Juliana Geremias. DOR OROFACIAL: MEDIADORES ENVOLVIDOS E CONTROLE FARMACOLÓGICO. Curitiba, 2002, 138 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Curso de Pósgraduação em

Farmacologia, Universidade Federal do Paraná - UFPR.

CHICHORRO, Juliana Geremias. Neuralgia do Trígêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental. Florianópolis, 2006, 164 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pósgraduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

[A]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, 2006.

[B] 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, 2006.

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

CHIU, C. K.; LOW, T. H.; TEY, Y. S.; SINGH, V. A.; SHONG, H. K. The efficacy and safety of intramuscular injections of methylcobalamin in patients with chronic nonspecific low back pain: a randomised controlled trial. **Singapore Med J**, v. 52, n. 12, p. 868, 2011.

CONFORTI, R.; PARLATO, R. S.; DE PAULIS, D.; CIRILLO, M.; MARRONE, V.; CIRILLO, S.; MORACI, A.; PARLATO, C. Trigeminal neuralgia and persistent trigeminal artery. **Neurol Sci**, Epub ahead of print, 2012.

DEL CAMINO, D.; MURPHY, S.; HEIRY, M.; BARRETT, L. B.; EARLEY, T. J.; COOK, C. A.; PETRUS, M. J.; ZHAO, M.; D'AMOURS, M.; DEERING, N.; BRENNER, G. J.; COSTIGAN, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; FANGER, C. M.; WOOLF, C. J.; PATAPOUTIAN, A.; MORAN, M. M. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. **J Neurosci**, v. 30, n. 45, p. 15165-74, 2010.

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

[A] DEPEINT, F.; BRUCE, W. R.; SHANGARI, N.; MEHTA, R.; O'BRIEN, P. J. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. **Chem Biol Interact**, v. 163, n. 1-2, p. 94-112, 2006.

[B] DEPEINT, F.; BRUCE, W. R.; SHANGARI, N.; MEHTA, R.; O'BRIEN, P. J. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. **Chem Biol Interact**, v. 163, n. 1-2, p. 113-132, 2006.

DIB-HAJJ, S. D.; FJELL, J.; CUMMINS, T. R.; ZHENG, Z.; FRIED, K.; LAMOTTE, R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Plasticity of sodium channel expression in DRG

neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Pain**, v. 83, n. 3, p. 591–600, 1999.

DIELEMAN, J.P.; KERKLAAN, J.; HUYGEN, .FJ.; BOUMA, P.A.; STURKENBOOM, M.C. Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 681-8, 2008.

DJOUHRI, L.; FANG, X.; OKUSE, K.; WOOD, J. N.; BERRY, C. M.; LAWSON, S. N. The TTX resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. **J Physiol**, v. 550, n. 3, p. 739–752, 2003.

DOSTROVSKY, J. O. Role of thalamus in pain. **Prog Brain Res**, v. 129, p. 245-245, 2000.

DU, Q.; WANG, H; XIE, J. Thiamin (Vitamin B1) Biosynthesis and regulation: a rich source of antimicrobial drug targets? **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 1, p. 41-52, 2011.

DUBNER R, SESSLE BJ, STOREY AT. The neural basis of oral and facial function. New York: Plenum Press; 1978.

DUBNER, R.; SHARAV, Y.; GRACEY, R. H.; PIRCE, D. D. Idiopathic trigeminal neuralgia: sensory features and pain mechanisms. **Pain**, v. 31, n. 1, p. 23- 33, 1987.

FAROOQI, A. A.; JAVEED, M. K.; JAVED, Z.; RIAZ, A. M.; MUKHTAR, S.; MINHAJ, S.; ABBAS, S.; BHATTI, S. TRPM channels: same ballpark, different players, and different rules in immunogenetics. **Immunogenetics**, v. 63, n. 12, p. 773-87, 2011.

FRIED, K.; BONGENHIELM, U.; BOISSONADE, F. M.; ROBINSSON, P. P. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 155-165, 2001.

FU, G. Q.; CARSTENS, E.; STELZER, B.; ZIMMERMANN, M. B vitamins suppress spinal dorsal horn nociceptive neurons in the cat. **Neurosci Lett**, v. 95, n. 1-3, p. 3192–3197, 1998.

GERHOLD, K. A.; BAUTISTA, D. M. Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1170, p. 184-189, 2009.

GOBEL, S.; FALLS, W. M.; HUMPHREY, E. Morphology and synaptic connections of ultrafine primary axons in lamina I of the spinal dorsal horn: candidates for the terminal axonal arbors of primary neurons with unmyelinated (C) axons. **J Neurosci**, v. 1, n. 10, p. 1163-79, 1981.

GOLD, M. S.; WEINREICH, D.; KIM, C. S.; WANG, R.; TREANOR, J.; PORRECA, F.; LAI, J. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 158–166, 2003.

GRANADOS-SOTO, V.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, G.; ROSAS-DE LA, M. T.; CARAM-SALAS, N. L.; MEDINA-SANTILLAN, R.; REYES-GARCIA, G. Effect of diclofenac on the antiallodynic activity of vitamin B12 in a neuropathic pain model in rat. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 47, p. 92-94, 2004.

HAANPÄÄ, M.; ATTAL, N.; BACKONJA, M.; BARON, R.; BENNETT, M.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; HANSSON, P.; HAYTHORNTHWAITE, J.A.; IANNETTI, G.D.; JENSEN, T.S.; KAUPPILA, T.; NURMIKKO, T.J.; RICE, A.S.; ROWBOTHAM, M.; SERRA, J.; SOMMER, C.; SMITH, B.H.; TREEDE, R.D. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14-27, 2011.

HALL, G.C.; CARROLL, D.; PARRY, D.; MCQUAY, H.J. Epidemiology and treatment of neuropathic pain: the UK primary care perspective. **Pain**, v. 122, n. 1-2, p. 156-62, 2006.

HAMMOND, D. L. Control systems for nociceptive afferent processing- The descending Inhibitory pathways. In: Yaksh, T. L. Spinal afferent processing. Plenum Publishing Corporation, 1986, p. 366-390.

HARGREAVES, K.M. Orofacial pain. **Pain**, v. 152, suppl.3, S25–S32, 2011.

HARKE, H.; GRETENKORT, P.; LADLEIF, H.U.; RAHMAN, S.; HARKE, O. The response of neuropathic pain and pain in complex regional pain syndrome I to carbamazepine and sustained-release morphine in patients pretreated with spinal cord stimulation: a double-blinded randomized study. **Anesth Analg**, v. 92, n. 2, p. 488-95, 2001.

HOFFMANN KD., MATTHEWS M.A. Comparison of sympathetic neurons in orofacial and upper extremity nerves: implications for causalgia. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 7, p. 720–726, 1990.

HOLZER, P. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. **Pharmacol Ther**, v. 131, n. 1, p. 142–170, 2011.

HONG, S.; WILEY, J. W. Altered expression and function of sodium channels in large DRG neurons and myelinated A-fibers in early diabetic neuropathy in the rat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339, n. 2, p. 652–660, 2006.

HONORE, P.; KAGE, K.; MIKUSA, J.; WATT, A.T.; JOHNSTON, J. F.; WYATT, J. R.; FALTYNEK, C. R.; JARVIS, M. F.; LYNCH, K. Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisense oligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic pain states in rats. **Pain**, v. 99, n. 1-2, p. 11-19, 2002.

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, 1997.

JENSEN, T. S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. **Eur J Pain**, v. 6, Suppl A, S61-S68, 2002.

JOLIVALT, C. G.; MIZISIN, L. M.; NELSON, A.; CUNHA, J. M.; RAMOS, K. M.; BONKE, D.; CALCUTT, N. A. B vitamins alleviate indices of neuropathic pain in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 612, n. 1-3, p. 41–47, 2009.

JOSHI, S. K.; MIKUSA, J. P.; HERNANDEZ, G.; BAKER, S.; SHIEH, C. C.; NEELANDS, T.; ZHANG, X. F.; NIFORATOS, W.; KAGE, K.; HAN, P.; KRAFTE, D.; FALTYNEK, C.; SULLIVAN, J. P.; JARVIS, M. F.; HONORE, P. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 75–82, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KATUSIC, S.; BEARD, C. M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L. T. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Ann Neurol**, v. 27, n. 1, p. 89-95, 1990.

KIM, S.H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, 1992.

KITT, C. A.; GRUBER, K.; DAVIS, M.; WOOLF, C. J.; LEVINE, J. D. Trigeminal neuralgia: opportunities for research and treatment. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 3-7, 2000.

KLEEF, M.V.; GENDEREN, W.E.V.; NAROUZE, S.; NURMIKKO, T.J.; ZUNDERT, J.V.; GEURTS, J.W.; MEKHAIL, N. Trigeminal Neuralgia. World Institute of Pain. **Pain Pract**, v. 9, n. 4, p. 252–259, 2009.

LAI, J.; GOLD, M. S.; KIM, C. S.; BIAN, D.; OSSIPOV, M. H.; HUNTER, J. C.; PORRECA, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. **Pain**, v. 95, n. 1-2, p. 143–152, 2002.

LAWSON, S. N. Morphological and Biochemical cell types of sensory neurons. In: Sensory Neurons. Diversity Development and Plasticity, Ed. P. Scott Oxford University Press, New York, 27-59, 1992.

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

LEWIS, M. A. O.; SANKAR V., DE LAAT A., BENOLIEL R. Management of neuropathic orofacial pain. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, Suppl32, S1-S24, 2007.

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

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, 2010.

LYNCH, M.E.; WATSON, C.P.N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. **Pain Res Manage.**, v. 11, n. 1, p. 11-38, 2006.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia funcional. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

MALANDRINOS, G.; LOULOUDI, M.; HADJILIADIS, N. Thiamine models and perspectives on the mechanism of action of thiamine-dependent enzymes. **Chem Soc Ver**, v. 35, n. 8, p. 684–692, 2006.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends in Pharmacol Scienc**, v. 17, n. 12, p. 457-462, 1996.

MALIN, S. A.; DAVIS, B. M.; KOERBER, H. R.; REYNOLDS, I. J.; ALBERS, K. M.; MOLLIVER, D. C. Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. **Pain**, v. 138, n. 3, p. 484-496, 2008.

MARFURT, C.F.; ZALESKI, E.M.; ADAMS, C.E.; WELTHER, C.L. Sympathetic nerve fibers in rat orofacial and cerebral tissues as revealed by the HRP-WGA tracing technique: a light and electron microscopic study. **Brain Res**, v. 366, n. 1-2, p. 373–378, 1986.

MATTHEWS, B.; ROBINSON, P.P. The course of post-ganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve in the cat. **J Physiol**, v. 303, p. 391–401, 1980.

MAURO, G. L.; MARTORANA, U.; CATALDO, P.; BRANCATO, G.; LETIZIA, G. Vitamin B12 in low back pain: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 4, n. 3, p. 53-58, 2000.

MCDERMOTT, A. M.; TOELLE, T. R.; ROWBOTHAM, D. J.; SCHAEFER, C. P.; DUKES, E. M. The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. **Eur J Pain**, v. 10, n. 2, p. 127-135, 2006.

MCGARAUGHTY, S.; WISMER, C. T.; ZHU, C. Z.; MIKUSA, J.; HONORE, P.; CHU, K. L.; LEE, C. H.; FALTYNEK, C. R.; JARVIS, M. F. Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 8, p. 1381-1388, 2003.

MEDINA-SANTILLAN, R.; MORALES-FRANCO, G.; ESPINOZA-RAYA, J.; GRANADOS-SOTO, V.; REYES-GARCIA, G. Treatment of diabetic neuropathic pain with gabapentine alone or combined with B vitamins complex. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 47, p. 109–112, 2004.

MIBIELLI, M. A.; GELLER, M.; COHEN, J. C.; GOLDBERG, S. G.; COHEN, M. T.;

NUNES, C. P.; OLIVEIRA, L. B.; DA FONSECA, A. S. Diclofenac plus B vitamins versus diclofenac monotherapy in lumbago: the DOLOR study. **Curr Med Res Opin**, v. 25, n. 11, p. 2589-2599, 2009.

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

MISUMI, J.; NAGANO, M.; KAISAKU, J.; HITOSHI, T. Effects of vitamin B12 and B6 on 2,5-hexanedione-induced neuropathy. **Arch Toxicol**, v. 56, n. 3, p. 204-6, 1985.

MIXCOATL-ZECUATL, T.; QUIÑÓNEZ-BASTIDAS, G. N.; CARAM-SALAS, N. L.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; REYES-GARCÍA, G.; GRANADOS-SOTO, V. Synergistic Antiallodynic interaction between Gabapentin or Carbamazepine and either Benfotiamine or Cyanocobalamin in neuropathic rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 30, n. 6, p. 431-441, 2008.

MORIYAMA, T.; IIDA, T.; KOBAYASHI, K. HIGASHI, T.; FUKUOKA, T.; TSUMURA, H.; LEON, C.; SUZUKI, N.; INOUE, K.; GACHET, C.; NOGUCHI, K.; TOMINAGA, M. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. **J Neurosci**, v. 23, n. 14, p. 6058-62, 2003.

NEUBERT, J. K.; WIDMER, C. G.; MALPHURS, W.; ROSSI, H. L.; VIERCK, C. J. JR.; CAUDLE, R. M. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 386-395, 2005.

NOVAKOVIC, S. D.; TZOUMAKA, E.; MCGIVERN, J. G.; HARAGUCHI, M.; SANGAMESWARAN, L.; GOGAS, K. R.; EGLIN, R. M.; HUNTER, J. C. Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. **J Neurosci**, v. 18, n. 6, p. 2174–2187, 1998.

OLIVEIRA, C.M.B.; BAAKLINI, L.G; ISSY, A.M.; SAKATA, R.K. Neuralgia do trigêmeo bilateral. Relato de caso. **Rev Bras Anestesiol**, v. 59, n. 4, p. 476-480, 2009.

PARK, Y. S.; KIM, J. P.; CHANG, W. S.; KIM, H. Y.; PARK, Y. G.; CHANG, J. W. Gamma knife radiosurgery for idiopathic trigeminal neuralgia as primary vs. secondary treatment option. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 113, n. 6, p. 447-52, 2011.

PEI, L.; LIN, C. Y.; DAI, J. P.; YIN, G F. Facial pain induces the alteration of transient receptor potential vanilloid receptor 1 expression in rat trigeminal ganglion. **Neurosci Bull**, v. 23, n. 2, p. 92-100, 2007.

PETIT, J. H.; HERMAN, J. M.; NAGDA, S.; DIBIASE, S. J.; CHIN, L. S. Radiosurgical treatment of trigeminal neuralgia: evaluating quality of life and treatment outcomes. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 56, n. 4, p. 1147-1153, 2003.

PORRECA, F.; LAI, J.; BIAN, D.; WEGERT, S.; OSSIPOV, M. H.; EGLIN, R. M.;

KASSOTAKIS, L.; NOVAKOVIC, S.; RABERT, D. K.; SANGAMESWARAN, L.; HUNTER, J.C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 14, p. 7640–7644, 1999.

PRIEST, B. T. Future potential and status of selective sodium channel blockers for the treatment of pain. **Curr Opin Drug Discov Devel**, v. 12, n. 5, p. 682-692, 2009.

RASMUSSEN, P. Facial pain. III. A prospective study of the localization of facial pain in 1052 patients. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 108, n. 2, p. 53–63, 1991.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

REYES-GARCIA, G.; SANTILLÁN, R.M.; GONZÁLEZ, H.I.R.; SOTO, V.G. Synergistic interaction between spinal Gabapentin and oral B vitamins in a neuropathic pain model. **Proc West Pharmacol**, v. 46, p. 91-94, 2003.

REYES-GARCIA, G.; SANTILLÁN, R.M.; GONZÁLEZ, H.I.R.; SOTO, V.G. Oral administration of B vitamins increases the antiallodynic effect of gabapentin in the rat. **Proc West Pharmacol**, v. 47, p. 76-79, 2004.

ROCKLIFF, B. W.; DAVIS, E. H. Controlled sequential trials of carbamazepine in trigeminal neuralgia. **Arch Neurol**, v. 15, n. 2, p. 129-136, 1966.

SALVO, M. L.; CONTESTABILE, R.; SAFO, M. K. Vitamin B6 salvage enzymes: Mechanism, structure and regulation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1814, n. 11, p. 1597-1608, 2011.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, G. M.; CARAM-SALAS, N. L.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; VIDAL-CANTÚ, G. C.; MEDINA-SANTILLÁN, R.; REYES-GARCÍA, G.; GRANADOS-SOTO, V. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 530, n. 1-2, p. 48-53, 2006.

SATO, J.; SAITOH, T.; NOTANI, K.; FUKUDA, H.; KANEYAMA, K.; SEGAMI, N. Diagnostic significance of carbamazepine and trigger zones in trigeminal neuralgia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n 1, p. 18-22, 2004.

SELHUB, J.; TROEN, A.; ROSENBERG, I. H. B vitamins and the aging brain. **Nutrit Rev**, v. 68, Suppl2, S112–S118, 2010.

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. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **J Oral Rehabil**, v. 33, n. 4, p. 243–261, 2006.

SHINODA, M.; KAWASHIMA, K.; OZAKI, N.; ASAI, H.; NAGAMINE, K.; SUGIURA, Y. P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **J Pain**, v. 8, n. 7, p. 588-97, 2007.

SIMEONOV, S.; PAVLOVA, M.; MITKOV, M.; MINCHEVA, L.; TROEV, D. Therapeutic efficacy of "Milgamma" in patients with painful diabetic neuropathy. **Folia Med**, v. 39, n. 4, p. 5-10, 1997.

SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**, v. 83, n. 4, p. 389-400, 1999.

SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. **Clin J Pain**, v. 18, n. 1, p. 22-7, 2002.

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

SONG, X. J.; VIZCARRA, C.; XU, D. S.; RUPERT, R. L.; WONG, Z. N. Hyperalgesia and neural excitability following injuries to central and peripheral branches of axons and somata of dorsal root ganglion neurons. **J Neurophysiol**, v. 89, n. 4, p. 2185-93, 2003.

SONG, X. S.; HUANG, Z. J.; SONG X. J. Thiamine suppresses thermal hyperalgesia, inhibits hyperexcitability, and lessens alterations of sodium currents in injured, dorsal root ganglion neurons in rats. **Anesthesiology**, v. 110, n. 2, p. 387-400, 2009.

SVENSSON, P.; SESSLE, B.J. Orofacial pain. In: Miles T, Nauntofte B, Svensson P, eds. *Clinical oral physiology*. Copenhagen: Quintessence; 2004: 93-140.

TAKEDA, M.; TSUBOI, Y.; KITAGAWA, J.; NAKAGAWA, K.; IWATA, K.; MATSUMOTO, S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. **Mol Pain**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.

TANG, J.S.; QU, C.G.; HUO, F.Q. The thalamic nucleus submedius and Ventrolateral orbital cortex are involved in nociceptive modulation: A novel pain modulation pathway. **Neurobiol**, v. 89, n. 4, p. 383-389, 2009.

THALAKOTI, S.; PATIL, V.V.; DAMODARAM, S.; VAUSE, C.V.; LANGFORD, L.E.; FREEMAN, S.E.; DURHAM, P.L. Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. **Headache**, v. 47, n. 7, p. 1008-1023, 2007.

THUN, J.; PERSSON, A.K.; FRIED, K. Differential expression of neuronal voltage-gated sodium channel mRNAs during the development of the rat trigeminal ganglion. **Brain Res**, v. 7, n. 1269:11-22, 2009.

TREMONT-LUKATS, I. W.; MEGEFF, C.; BACKONJA, M. M. Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes: mechanisms of action and place in therapy. **Drugs**,

v. 60, v. 5, p. 1029-52, 2000.

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, 1996.

TSUDA, M.; KOIZUMI, S.; KITA, A.; SHIGEMOTO, Y.; UENO, S.; INOUE, K. Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. **J Neurosci**, v. 20, n. 15, p. 1-5, 2000.

VIANA, F.; DE LA PEÑA, E.; BELMONTE, C. Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 254-60, 2002.

VOOGD, J.; NIEUWENHUYS, R.; VAN DONGEN, P. A. M.; TEN DONKELAAR, H. J. Mammals. In: Nieuwenhuys, R.; Ten Donkelaar, H. J.; Nicholson, C. The central nervous system of vertebrates, v. 3, Springer, Berlin, 1998, p. 1637-2098.

VOS, B. P.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral changes following ligation of the infraorbital nerve in rat: an animal model of trigeminal neuropathic pain. In: Besson JM, Guilbaud G, editors. Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain, Amsterdam: Elsevier, 1991, pp. 147-158.

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **J Neurosci**, v. 14, n. 5, p. 2708-2723, 1994.

WANG, Z. B.; GAN, Q.; RUPERT, R. L.; ZENG, Y. M.; SONG, X. J. Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 266-277, 2005.

WIRKNER, K.; SPERLAGH, B.; ILLES, P. P2X3 receptor involvement in pain states. **Mol Neurobiol**, v. 36, n. 2, p. 165-83, 2007.

WODA, A. Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. **Dent Res**, v. 82, n. 10, p. 764-8, 2003.

ZAKRZEWSKA, M.J.; MCMILLAN, R. Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. **Postgrad Med J**, v. 87, p. 410-416, 2011.