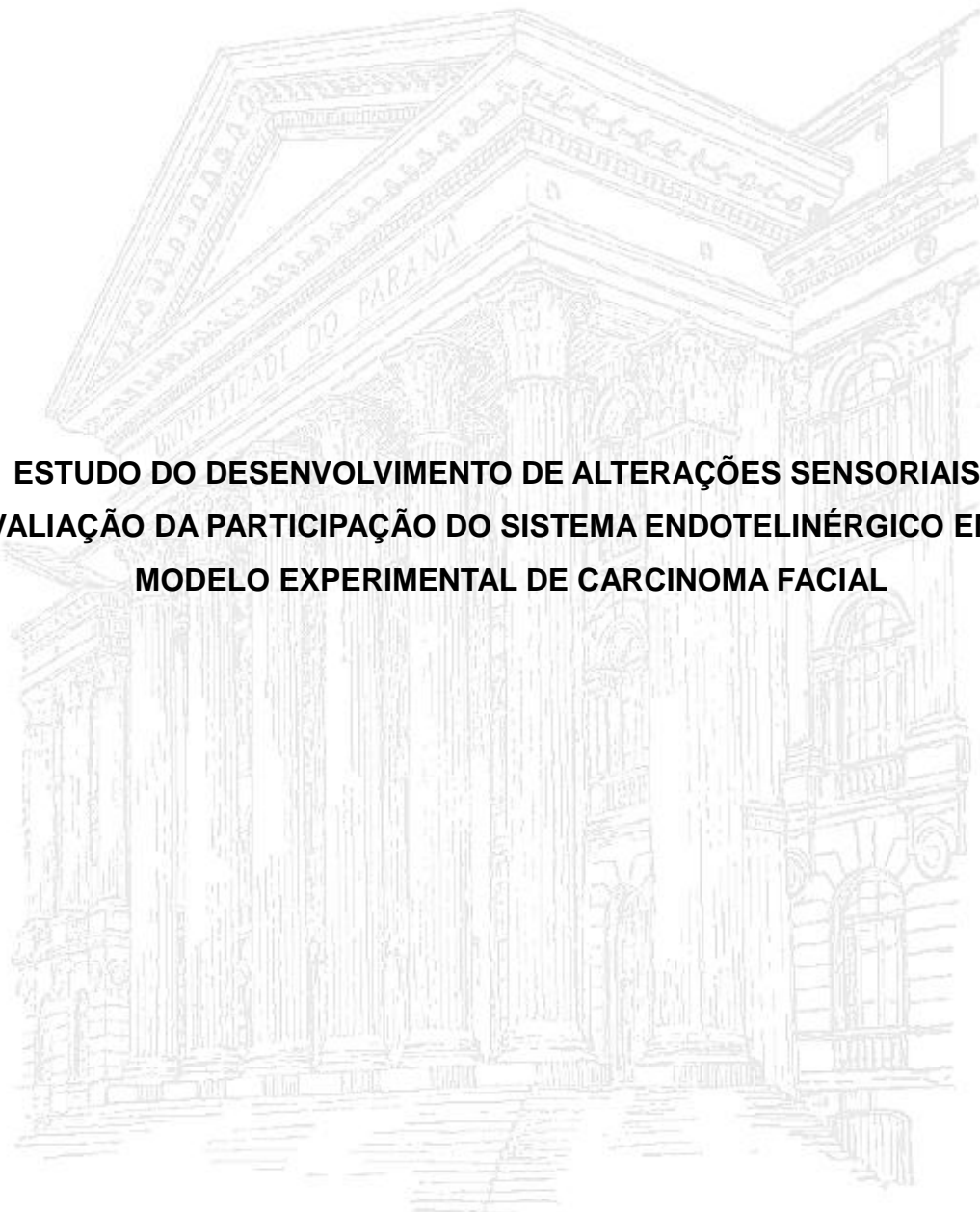


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI



**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS E
AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA FACIAL**

CURITIBA
2016

CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI

**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS E
AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA FACIAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do Título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Kopruszinski, Caroline Machado

Estudo do desenvolvimento de alterações sensoriais e avaliação da participação do sistema endotelinérgico em um modelo experimental de carcinoma facial. / Caroline Machado Kopruszinski . – Curitiba, 2016.
112f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Alexandra Acco

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

1. Carcinoma. 2. Face. I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias. III. Acco, Alexandra. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1

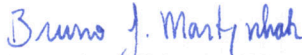
ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de Julho de dois mil e dezesseis às 14:00 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Centro Politécnico, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **CAROLINE MACHADO KOPRUSZINSKI** para a Defesa Pública de sua Tese intitulada: "**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA FACIAL**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JULIANA GEREMIAS CHICHORRO (UFPR), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UFPR), GISELI KLASSEN (UFPR), JOICE MARIA DA CUNHA (UFPR), MARIANA LIMA VALE (UFC). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela Aprovação da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 29 de Julho de 2016.



Prof JULIANA GEREMIAS CHICHORRO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)




Prof BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)



Prof GISELI KLASSEN
Avaliador Externo (UFPR)



Prof JOICE MARIA DA CUNHA
Avaliador Interno (UFPR)



Prof MARIANA LIMA VALE
Avaliador Externo (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Juliana Geremias Chichorro pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade, confiança, dedicação, paciência, compreensão, amizade e carinho.

Aos professores doutores Bruno Jacson Martynhak, Giseli Klassen, Joice Maria da Cunha e Mariana Lima Vale por terem aceitado o convite para integrar a banca examinadora desta tese.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e apoio que me fizeram seguir em frente, em especial a minha mãe Maria Lúcia pelo amor, amizade, companheirismo, paciência e dedicação durante toda a minha vida, inclusive se tornando a melhor companhia para experimentos de finais de semana e feriados durante a realização desse estudo.

À minha família em especial os meus queridos tios Alberto, Rosângela, Rose e Marlene, primos Gabriel e Daniel pela amizade, companheirismo, conforto, força, carinho e por estarem sempre presentes.

Ao meu namorado Luiz pelo carinho, auxílio, amizade e companheirismo durante a fase final desse estudo.

Ao Professor Giles Alexander Rae pelas contribuições na realização desse estudo.

À Professora Alexandra Acco pelos ensinamentos e ajuda durante a realização desse estudo.

À Professora Tamara King pelos ensinamentos e valiosa contribuição nesse estudo.

À Professora Sandra Cocuzzo, do Instituto Butantã pela doação das células tumorais utilizadas nesse estudo.

Ao Professor Frank Porreca pelos valiosos ensinamentos adquiridos durante o meu estágio na Universidade do Arizona.

À equipe do laboratório do Professor Frank Porreca pelo carinho, amizade e por me receberem muito bem durante todo o meu período de estágio no exterior e me fazerem me sentir confortável para a realização do estágio.

Às Professoras Joice Maria da Cunha e Janaína Menezes Zanoveli pelos ensinamentos, auxílio e carinho sempre.

À minha amiga-irmã Renata Cristiane dos Reis pelo exemplo, apoio, carinho, paciência, força, amizade e sua grande contribuição.

Ao meu amigo-irmão Eder Gambeta pelo carinho, amizade, paciência, apoio e sua grande contribuição.

Às minhas amigas Lusine, Edita, Gabriela, Janice e Peg pelo enorme carinho e amizade conquistados durante o meu período de estágio no exterior e por me confortarem durante este período.

Ao Arturo e Amanda pela amizade, auxílio e ensinamentos sobre a manutenção das células tumorais utilizadas nesse estudo.

À Marilina por ter me apresentado à oportunidade de carreira acadêmica.

Aos meus colaboradores do Laboratório de Dor pelo aprendizado e boa convivência.

A todos os amigos e colaboradores do Departamento de Farmacologia da UFPR que contribuíram com o 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, especialmente a farmacêutica Silvia, pelo carinho, amizade, por ter me apresentado a minha orientadora e por sempre me auxiliar.

À equipe do Biotério da UFPR pelo profissionalismo.

Aos animais que sacrificaram suas vidas pela ciência.

Agradeço também à CAPES/REUNI pelo apoio financeiro.

LISTAS DE ABREVIÇÕES

ACC	Córtex anterior cingulado
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
AKT	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ASIC	Canal iônico sensível a ácidos
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CPP	Preferência condicionada ao lugar
DAG	Diacilglicerol
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ET	Endotelina
FAK	Quinase de adesão focal
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP3	Inositol trifosfato
Kg	Kilograma
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
m	Metro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NAc	Núcleo accumbens
NGF	Fator de crescimento de nervo
nmol	Nanomol
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAG	Substância cinzenta periaquedutal

PBS	Solução salina tamponada
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína tirosina quinase
Pr5	Núcleo sensorial principal
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RVM	Bulbo rostral ventromedial
s	Segundo
s.c.	Subcutâneo
SCC	Câncer de células escamosas
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
Sp5	Núcleo do trato espinhal
Sp5O	Núcleo do trato espinhal oral
Sp5I	Núcleo do trato espinhal interpolar
Sp5C	Núcleo do trato espinhal caudal
TNF	Fator de necrose tumoral
TRKA	Receptores de tirosina quinase A
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transitório melastatina 8
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
v.o.	Via oral
VTA	Área tegmental ventral
WDR	Ampla faixa dinâmica

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

FIGURA 1 - Sistema somatossensorial trigeminal.....	16
FIGURA 2 - Interação entre o microambiente tumoral e o sistema sensorial trigeminal	23
FIGURA 3 - Decurso temporal do crescimento tumoral e do peso de ratos submetidos à inoculação de células tumorais na face	51
FIGURA 4 - Decurso temporal das alterações sensoriais em animais submetidos à inoculação de células tumorais na face	52
FIGURA 5 - Relação entre desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor e progressão tumoral.....	54
FIGURA 6 - Relação entre volume tumoral e hiperalgesia térmica ao calor em diferentes períodos após inoculação de células tumorais na face	55
FIGURA 7 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina no comportamento de <i>grooming</i> espontâneo em animais portadores de tumor na face	58
FIGURA 8 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgesia mecânica em animais portadores de carcinoma de face	59
FIGURA 9 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgesia térmica ao frio em animais com carcinoma de face	60
FIGURA 10 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face	61
FIGURA 11 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina na hiperalgesia mecânica em animais com carcinoma de face	63
FIGURA 12 - Efeito do tratamento sistêmico com bosentana em combinação com morfina na hiperalgesia mecânica em animais com carcinoma de face	64
FIGURA 13 - Efeito do bloqueio local de receptores de endotelina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face	66
FIGURA 14 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face	67
FIGURA 15 - Efeito do tratamento sistêmico com a bosentana em combinação com morfina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face	68

FIGURA 16 - Efeito do bloqueio local de receptores de endotelina no comportamento de <i>grooming</i> espontâneo em animais com carcinoma de face	70
FIGURA 17 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina no comportamento de <i>grooming</i> espontâneo em animais com carcinoma de face	71
FIGURA 18 - Efeito do tratamento local com lidocaína, morfina e bosentana no teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma de face	73
FIGURA 19 - Efeito do tratamento sistêmico com morfina e bosentana no teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma de face	74
ESQUEMA 1 - Desenvolvimento de alterações sensoriais relacionadas à indução do tumor na face de ratos	95
ESQUEMA 2 - Decurso temporal do desenvolvimento das alterações sensoriais associadas à inoculação de células tumorais na face de ratos.....	96
ESQUEMA 3 - Influência dos diferentes tratamentos utilizados nesse estudo na hiperalgesia mecânica e térmica, <i>grooming</i> espontâneo e preferência condicionada ao lugar (CPP).....	97

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de alterações sensoriais em um modelo animal de carcinoma facial, bem como a participação das endotelinas e seus receptores nessas alterações. A inoculação unilateral de células tumorais na região direita de inserção das vibrissas de ratos promoveu crescimento tumoral e aumento do *grooming* espontâneo, além de induzir o desenvolvimento bilateral de hiperalgesia a estímulos térmicos (frio e calor) e mecânico, com pico no dia 6 após a inoculação. Para avaliar a influência dos tratamentos nas alterações associadas à indução do tumor na face, o limiar de resposta à estimulação térmica e mecânica foi avaliado antes e no dia 6 após a inoculação das células tumorais. O tratamento sistêmico com morfina (2,5 mg/kg, s.c.) reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica, bem como o *grooming* espontâneo de ratos com tumor facial. No entanto, o tratamento local (30 µg/50 µL) reduziu apenas a hiperalgesia ao calor e o *grooming* espontâneo. O tratamento local com BQ-123 e/ou BQ-788 (antagonistas dos receptores de endotelina ET_A e ET_B, respectivamente; 30 nmol/50 µL) não reduziu a hiperalgesia ao calor ou o *grooming* espontâneo após a inoculação. No entanto, a hiperalgesia ao calor foi reduzida pelo tratamento local com bosentana (antagonista dual dos receptores de endotelina ET_A e ET_B, 30 µg/50 µL). O tratamento sistêmico único ou repetido com bosentana na dose de 100 mg/kg, v.o., não foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor e mecânica induzida pelo tumor. Por outro lado, uma única administração de bosentana na dose de 300 mg/kg aboliu a hiperalgesia ao calor, mas não afetou a hiperalgesia mecânica. Entretanto, a combinação de morfina e bosentana, em doses não efetivas, i.e. 0,625 e 100 mg/kg, respectivamente, promoveu um efeito potencializador na redução da hiperalgesia ao calor e mecânica nos animais inoculados. O tratamento local ou sistêmico com bosentana, nas doses de 30 µg/50 µL e 100 mg/kg, respectivamente também foi capaz de reduzir o *grooming* espontâneo avaliado no dia 6 após a inoculação. Corroborando este dado, na avaliação da preferência condicionada de lugar (CPP) somente o grupo dos animais com tumor demonstraram preferência pela câmara pareada com o tratamento sistêmico com bosentana (100 mg/kg), enquanto que o tratamento local não foi capaz de induzir preferência. Este estudo fornece evidências de que as endotelinas, atuando sistemicamente através de receptores ET_A e ET_B, podem participar no desenvolvimento da hiperalgesia e dor espontânea associada ao câncer de face e indicam um potencial efeito antinociceptivo sinérgico entre morfina e antagonistas de endotelinas nessa condição. Além disso, a eficácia da bosentana no controle da dor não evocada sugere uma nova estratégia farmacológica para o manejo dessa qualidade de dor.

ABSTRACT

The current study aimed to evaluate the development of alterations associated with facial carcinoma, as well as the participation of endothelins and their receptors on these changes. The unilateral inoculation of tumor cells on the right vibrissal pad of rats induced a tumor growth and an increase of spontaneous grooming and bilateral hyperalgesia to thermal (cold and heat) and mechanical stimuli, which showed peak on day 6 after inoculation. To evaluate the influence of the treatments on alterations associated with facial tumor induction, the response threshold to thermal and mechanical stimulation was assessed before and on day 6 after tumor cell inoculation. The systemic treatment with morphine (2.5 mg/kg, s.c.) reduced thermal and mechanical hyperalgesia, as well as spontaneous grooming in rats with facial tumor. However, the local treatment (30 µg/50 µL) reduced only heat hyperalgesia and spontaneous grooming. The local treatment with BQ-123 and/or BQ-788 (ET_A and ET_B endothelin receptors antagonists, respectively; 30 nmol/50 µL) did not reduce heat hyperalgesia and spontaneous grooming after inoculation. However, heat hyperalgesia was reduced by local treatment with bosentan (dual ET_A and ET_B endothelin receptor antagonist, 30 µg/50 µL). The single or repeated systemic treatment with bosentan at 100 mg/kg, p.o., was unable to reduce heat and mechanical hyperalgesia induced by the tumor. In contrast, a single administration of bosentan at 300 mg/kg abolished the heat hyperalgesia, but did not affect mechanical hyperalgesia. The combination of morphine and bosentan, both at ineffective doses, i.e. 0.625 to 100 mg/kg, respectively, promoted a potentiated effect on the reduction of heat and mechanical hyperalgesia in tumor-bearing rats. The local or systemic treatment with bosentan, at doses of 30 µg/50 µL and 100 mg/kg, respectively, was also able to reduce spontaneous grooming, assessed on day 6 after inoculation. Corroborating these data, on the conditioned place preference (CPP) test, only the group of animals with tumor showed a preference for the paired chamber with systemic bosentan treatment (100 mg/kg), whereas local bosentan (30 µg/50 µL) treatment was not able to induce preference. This study provides evidence that endothelins, acting systemically through ET_A and ET_B receptors, could be involved in the development of hyperalgesia and spontaneous pain associated with facial cancer and indicate a potential synergistic analgesic effect of morphine and endothelin receptors antagonists on this condition. Moreover, the efficacy of bosentan in non-evoked pain control suggests a new pharmacological strategy for the management of this quality of pain.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	PROCESSAMENTO SOMATOSSENSORIAL TRIGEMINAL	12
1.2	DOR ASSOCIADA AO CÂNCER DE FACE	18
1.3	ENDOTELINAS	28
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	METODOLOGIA	38
4	RESULTADOS	49
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ASSOCIADAS AO CÂNCER FACIAL APÓS A INOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NA FACE DE RATOS	49
4.2	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO TUMORAL E DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR	53
4.3	EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS ASSOCIADAS AO CÂNCER FACIAL	56
4.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE	62
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE	65
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> ESPONTÂNEO EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE	69
4.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM MORFINA E DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NO TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE	72
5	DISCUSSÃO	75
5.1	DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR INOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NA FACE DE RATOS	75
5.2	PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS ASSOCIADAS AO CARCINOMA FACIAL.....	81
5.3	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO TRATAMENTO DE MORFINA E BOSENTANA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM ANIMAIS COM CARCINOMA	

	DE FACE	85
5.4	DESENVOLVIMENTO DE NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE.....	88
5.5	PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA DOR ESPONTÂNEA ASSOCIADA AO CARCINOMA DE FACE EM RATOS.....	92
6	CONCLUSÃO	95
	ANEXO A	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSAMENTO SOMATOSSENSÓRIAL TRIGEMINAL

A transmissão e processamento somatossensorial da região da cabeça e face dá-se através do sistema sensorial trigeminal, composto por estruturas periféricas e centrais como o nervo trigêmeo, o gânglio do trigêmeo, núcleos do complexo sensorial do trigêmeo e trato trigeminotalâmico (para revisão ver SESSLE, 2006; UPADHYAY et al., 2008). Dessa maneira, o nervo trigêmeo é responsável pela inervação periférica de porções significativas da região da cabeça e da face, e como o próprio nome indica, possui três principais grandes ramificações de fibras aferentes primárias: a oftálmica, a maxilar e a mandibular. Enquanto que as duas primeiras são exclusivamente sensoriais, a última apresenta componentes motores, responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios, além de componentes sensoriais. A ramificação oftálmica é responsável pela inervação de regiões superiores da cabeça e face como testa, pálpebra, córnea, conjuntiva e mucosas sinusais, enquanto a ramificação maxilar é responsável pela inervação de regiões medianas da cabeça e face, tais como regiões bucais superiores (lábio, palato e arcada dental), cavidade nasal e frações do nariz além do maxilar superior, já a ramificação mandibular é responsável pela inervação de regiões inferiores da cabeça e face como regiões bucais inferiores (assoalho, lábio, língua e arcada dental), gengiva, bochechas, queixo e maxilar inferior (para revisão ver FRIED et al., 2001 GÓES, 2008).

As fibras aferentes primárias responsáveis pela inervação sensorial descrita acima são classificadas em $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ e C, de acordo como seu diâmetro, presença ou ausência de mielina e velocidade de condução de estímulos sensoriais (para revisão ver SESSLE, 2000). As fibras $A\alpha$ e $A\beta$ estão presentes em grandes quantidades na superfície da pele e mucosas da região da cabeça e apresentam maior diâmetro (13-20 μm e 6-12 μm , respectivamente) em decorrência à alta quantidade de mielina. Devido a estas características, são mais calibrosas e apresentam maior velocidade de condução de estímulos (80-120 m/s e 33-75 m/s, respectivamente). As fibras $A\delta$, possuem diâmetro intermediário (1-5 μm) devido a uma quantidade inferior de mielina, resultando em uma velocidade de condução inferior (3-30 m/s) em relação às fibras de maior calibre. Já as fibras C, não

apresentam mielina em sua constituição, sendo assim, possuem um menor diâmetro (0,2-1,5 μm) e uma velocidade de condução reduzida (0,2-0,5 m/s) em comparação às fibras mielinizadas, uma vez que a condução dos estímulos ocorre de maneira contínua e não saltatória (para revisão ver DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; SIEGEL e HREDAY, 2005). As fibras A α e A β são responsáveis pela detecção e transmissão de estímulos proprioceptivos e estímulos tácteis inócuos (estímulos mecânicos de baixo limiar), enquanto que as fibras A δ e C são responsáveis pela transdução de estímulos nocivos de origem química, mecânica e térmica (para revisão ver DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; SIEGEL e HREDAY, 2005).

A maioria dos neurônios sensoriais periféricos que compõe as três principais ramificações do nervo trigêmeo possuem seus corpos celulares localizados no gânglio do trigêmeo, o qual em humanos localiza-se na superfície cerebral do osso temporal. Ademais, o gânglio do trigêmeo é responsável pela síntese de diversas substâncias e moléculas responsáveis pela sensibilização periférica das fibras nociceptivas, como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), fatores de crescimento de nervos, canais iônicos, entre outros (para revisão ver SESSLE, 2006).

Os neurônios sensoriais periféricos que integram o sistema trigeminal possuem uma anatomia morfológica pseudounipolar, caracterizada por uma única projeção axonal periférica com corpo celular localizado no gânglio do trigêmeo, e uma única projeção axonal central, que deixa o gânglio e adentra o tronco cerebral, ao nível da ponte. As terminações centrais destes neurônios localizam-se nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo (THALAKOTI et al., 2007). Esse complexo sensorial de núcleos centrais do trigêmeo pode ser dividido em: núcleo sensorial principal (Pr5), região onde ocorre a sinapse de neurônios periféricos com neurônios de segunda ordem responsáveis pela condução de estímulos não nocivos; e núcleo do trato espinhal (Sp5), região onde ocorre a sinapse de neurônios periféricos com neurônios de segunda ordem responsáveis pela condução de estímulos nocivos e térmicos. Adicionalmente, o núcleo do trato espinhal compreende três diferentes subnúcleos: *oralis* (Sp5O), *interpolaris* (Sp5I) e *caudalis* (Sp5C) (para revisão ver SESSLE, 2000; 2005; 2006).

O subnúcleo *caudalis* está localizado no bulbo, mais especificadamente na região do obex, estendendo-se caudalmente até as vértebras espinhais C2 e C3. Por se tratar de uma estrutura organizada em lâminas, o que a torna estruturalmente

muito semelhante ao corno dorsal da medula espinhal, esse subnúcleo é o principal sítio de processamento de informações nociceptivas provenientes da região orofacial, sendo conhecido como corno dorsal da medula espinhal do sistema sensorial trigeminal (para revisão ver BAE e YOSHIDA, 2011). Essas lâminas ainda podem ser caracterizadas por camadas como: superficial, compreendendo a lâmina I; gelatinosa, compreendendo a lâmina II, ainda subdividida em Ilo (externa) e Ili (interna); magno celular ou mediana, compreendendo as lâminas III e IV; e profunda, compreendendo as lâminas V e VI. Assim, a grande maioria das fibras de pequeno e médio diâmetro (C e A δ , respectivamente) projetam-se para o Sp5C, principalmente para as lâminas I, II, V e VI, enquanto que fibras de grande diâmetro (A β) projetam-se para estruturas mais rostrais do complexo sensorial trigeminal, e também para esse mesmo subnúcleo, porém para as lâminas III e VI. Além disso, por ser o principal sítio de processamento nociceptivo proveniente da região orofacial, o Sp5C apresenta a maior concentração de mediadores químicos, bem como receptores envolvidos na modulação dessas informações em comparação aos subnúcleos Sp5I e Sp5O (para revisão ver BAE e YOSHIDA, 2011).

Logo acima do Sp5C, encontra-se o Sp5I, que possui uma estrutura diferente do *caudalis*, por não apresentar uma organização laminar. Apesar de não ser o principal sítio de processamento nociceptivo proveniente da região orofacial, o Sp5I também participa no processamento dessas informações, através de interneurônios que possuem a capacidade de comunicação com o Sp5O. Atualmente, acredita-se que esse subnúcleo possua uma maior participação no processamento nociceptivo da região perioral e intraoral (para revisão ver SESSLE, 2000; XIE et al., 2016).

O subnúcleo *oralis* está localizado em uma posição rostral acima do Sp5I, distante 3 a 4 mm do Sp5C. Também participa do processamento de informações nociceptivas provenientes da região da cabeça e face, por receber interneurônios que saem do Sp5C e enviam essas informações para o Sp5O. Diferentemente do Sp5C, não apresenta organização laminar e não apresenta substância gelatinosa, a qual concentra interneurônios envolvidos na inibição da passagem de informações nociceptivas aferentes (para revisão ver SESSLE 2000; 2005; 2006).

Assim, semelhante ao processamento nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal, a maioria das informações da região da cabeça e face é convertida em estímulo elétrico e conduzida através de neurônios sensoriais de primeira ordem para os subnúcleos espinhais trigeminais, onde é estabelecida a sinapse com

neurônios de segunda ordem, responsáveis pela condução dos estímulos para regiões cerebrais (DOSTROVSKY, 2000; 2006). Os neurônios de segunda ordem, presentes nos subnúcleos do trigêmeo, podem ser classificados com base nas propriedades de seu campo receptivo em: 1) nociceptivos específicos, que são neurônios presentes especialmente em lâminas superficiais do Sp5O, e recebem impulsos de aferentes primários de fibras A δ e C, sendo ativados exclusivamente por estímulos nocivos; 2) limiar de ampla faixa dinâmica (WDR – *Wide Dynamic Range*), que são neurônios presentes de maneira difusa no Sp5O, e recebem impulsos de fibras de pequeno a grande diâmetro, sendo ativados tanto por estímulos inócuos quanto nocivos, assim, responsivos a vasta intensidade de estímulos; e 3) receptores mecânicos de baixo limiar (LTM – *low-threshold mechanoreceptors*), que são neurônios presentes principalmente em lâminas mais profundas, e recebem impulsos de aferentes primários de fibras A β , sendo ativados por estímulos proprioceptivos, podendo informar de maneira precisa a localização, intensidade e duração dos estímulos mecânicos orofaciais. Vale ressaltar, que devido a sua ampla faixa de intensidade de condução de estímulos, os neurônios de limiar dinâmico e amplo possuem uma maior importância na condução de estímulos nociceptivos do sistema trigeminal (para revisão ver DOSTROVSKY, 2006; CALDERON et al., 2009).

Ao deixarem os subnúcleos espinhais através dos neurônios de segunda ordem, as informações nociceptivas são conduzidas para diferentes regiões do tálamo, que representa uma das principais estruturas centrais envolvidas no processamento dos estímulos sensoriais. Dessa maneira, as informações orofaciais periféricas são conduzidas para regiões medianas do tálamo, de onde são projetadas ao córtex somatossensorial primário e secundário, além da ínsula, regiões responsáveis pelas análises das informações, determinando assim a localização dos estímulos (para revisão ver SESSLE 2006; TANG et al., 2009). Ademais, as informações nociceptivas, além de serem conduzidas para regiões medianas do tálamo e projetadas ao córtex somatossensorial e a ínsula, também são transferidas para outras estruturas centrais, tais como hipocampo, córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal e áreas límbicas, como amígdala, área tegmental ventral e núcleo accumbens (para revisão ver SESSLE 2006; TANG et al., 2009; OSSIPOV et al., 2014). As informações nociceptivas processadas na região pré-frontal e límbica do sistema nervoso central (SNC), codificam as respostas emocionais e motivacionais da dor e estão implicadas nos aspectos afetivos e

contextuais da percepção nociceptiva. Sendo assim, a partir do tálamo, neurônios de terceira ordem projetam-se para as regiões centrais descritas acima resultando no processamento dos aspectos contextuais, cognitivos e afetivos da dor (para revisão ver JULIUS e BASBAUM, 2001; OSSIPOV et al., 2014).

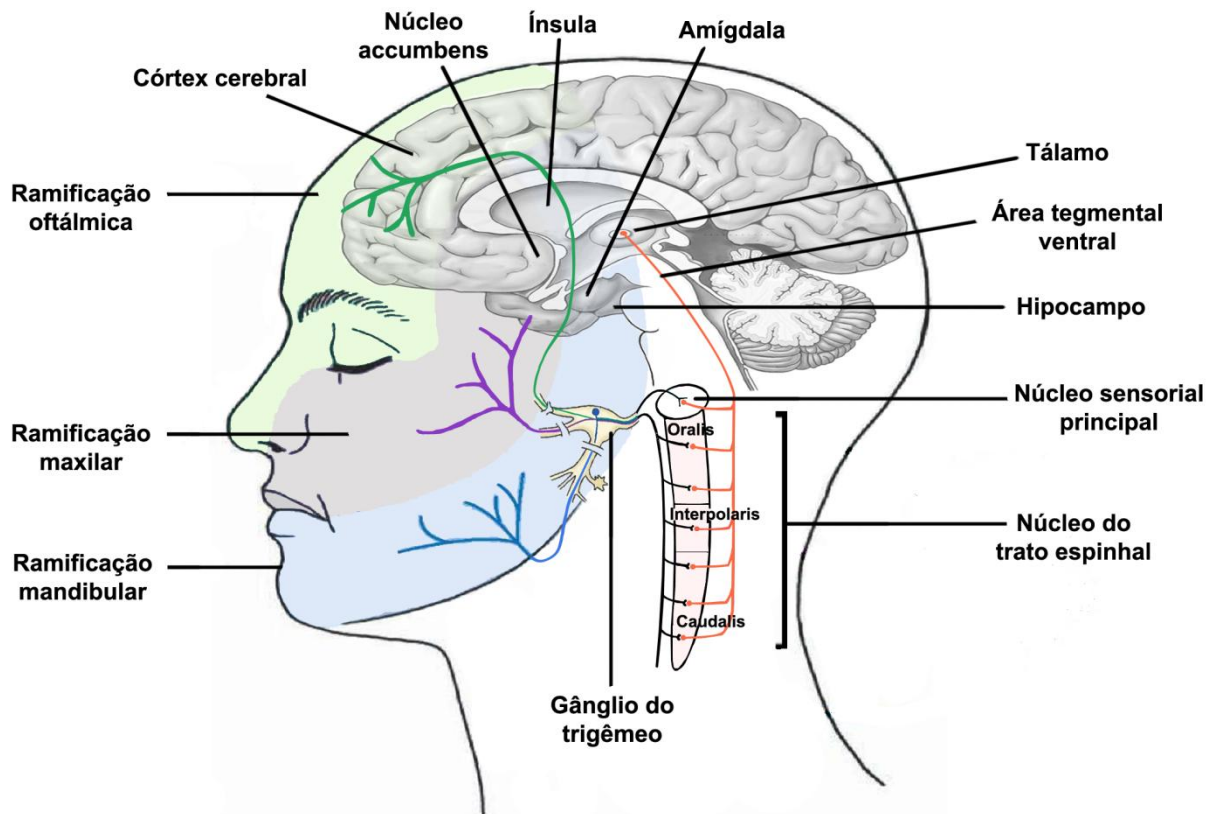


FIGURA 1 - Sistema somatossensorial trigeminal O nervo trigêmeo possui três grandes ramificações periféricas, oftálmica, maxilar e mandibular, responsáveis pela inervação da cabeça e face. As fibras aferentes primárias possuem seus corpos celulares localizados no gânglio do trigêmeo e realizam sinapse com os neurônios de segunda ordem nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo. Esse complexo sensorial de núcleos centrais do trigêmeo pode ser dividido em: núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal, o qual se divide em três subnúcleos, *oralis*, *interpolaris* e *caudalis*. Os neurônios de segunda ordem projetam-se para o tálamo, região responsável pelo envio de projeções de neurônios de terceira ordem para as demais regiões do SNC como córtex, ínsula, núcleo accumbens, área tegmental ventral, amígdala e hipocampo. FONTE: Adaptado de SESSLE, 2006; <http://what-when-how.com/neuroscience/the-cranial-nerves-organization-of-the-central-nervous-system-part-3/>.

A transmissão dos estímulos nociceptivos, pode ainda ser modulada por vias descendentes de origem no tronco cerebral, envolvendo áreas do mesencéfalo e áreas medulares. Esse sistema envolve regiões como substância cinzenta periaquedutal (PAG), bulbo rostral ventromedial (RVM) e estruturas adjacentes ao bulbo rostral ventromedial que, através de conexões entre si e diferentes

neurotransmissores, inibem ou facilitam a transmissão nociceptiva (para revisões ver MALCANGIO e BOWERY, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001). Assim, a PAG, estrutura responsável pela modulação da dor através da sua interação com projeções ascendentes e descendentes relacionadas ao processamento nociceptivo, recebe projeções provenientes de estruturas superiores do SNC, como córtex e amígdala, e projeta-se para o RVM. Estudos já demonstraram que essas projeções provenientes da PAG, descendendo até o RVM, são compostas de neurônios opioidérgicos (para revisão ver OSSIPOV et al., 2010; 2014). Já o RVM, considerada a estrutura final na modulação do processamento nociceptivo, possui neurônios denominados de células *on* e *off*, que atuam na modulação facilitatória e inibitória do processamento da dor, respectivamente (OSSIPOV et al., 2014). Pode ser observado um aumento da atividade das células *on* frente à estimulação nociceptiva, paralelamente à inibição da atividade das células *off*. Estudos mostram que as projeções opioidérgicas provenientes da PAG, inibem as células *on*, presentes no RVM, e promovem o aumento da excitabilidade das células *off*, fenômeno considerado, necessário para a modulação descendente da nocicepção. Ainda, o RVM envia projeções de neurônios serotoninérgicos, adrenérgicos, gabaérgicos e glicinérgicos para o subnúcleo *caudalis*, os quais, atuando em seus respectivos receptores, presentes em neurônios primários ou de segunda ordem, promovem a modulação direta da transmissão nociceptiva ascendente. Em diversos estados patológicos de dores crônicas, ocorre uma diminuição da regulação do controle nociceptivo descendente, promovendo um aumento da atividade das células *on*, resultando na facilitação do processamento nociceptivo. Em concordância, estudos recentes sugerem que alterações nas projeções do RVM, em decorrência de estados de dores crônicas, estejam relacionados não somente com a facilitação do processamento nociceptivo evocado, mas também com comportamentos de dor espontânea (OSSIPOV et al., 2010; 2014).

Características semelhantes no processamento somatossensorial, bem como na inervação periférica e central fornecida pelo sistema sensorial trigeminal em humanos são observadas em roedores, facilitando assim a busca do pleno conhecimento do funcionamento desse sistema bem como as suas alterações tanto em casos não patológicos como patológicos (BENOLIEL et al., 2001; para revisão ver SESSLE, 2006).

Na população, existem diversas condições patológicas, relacionadas ou não a

estruturas da cabeça e pescoço, que podem desencadear dores faciais. Dentre as diferentes formas de dor orofacial, existe uma que afeta agressivamente a qualidade de vida do paciente, a dor associada ao câncer de face.

1.2 DOR ASSOCIADA AO CÂNCER DE FACE

Segundo Campana e Goiato (2015) o câncer de boca e orofaringe é a neoplasia de cabeça, face e pescoço mais frequente, correspondendo ao quinto tipo mais comum de câncer na escala mundial, com cerca de 500 mil novos casos por ano (para revisão ver MARUR e FORATIERE, 2016). De acordo com o estudo epidemiológico de Wünsch-Filho (2002), o câncer de cabeça e pescoço corresponde a 10% dos tumores malignos no Brasil, sendo 40% desses localizados na cavidade oral. Este tipo de câncer predomina em indivíduos do sexo masculino, na proporção de 3:1, e segundo o INCA, no ano de 2016 devem ser registrados no Brasil cerca de 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres (INCA, 2016).

Considerando os tipos de tumores que acometem a cavidade bucal, aproximadamente 90% são carcinomas espinocelulares, ou seja, originários de células escamosas e os outros 10% correspondem a sarcomas, linfomas, melanomas e tumores de glândulas salivares. As regiões bucais mais acometidas pelo carcinoma escamoso são a língua, a região bucal inferior, lábios e a gengiva (para revisão ver BAGAN et al., 2010; CAMPANA e GOIATO, 2013; COOPER et al., 2009; DIXIT et al., 2015; PARISE, 2000; PEREIRA et al., 2007; SAKAI e TSUCHIDA, 1992).

A etiologia desses carcinomas é multifatorial, incluindo fatores endógenos, como por exemplo, predisposição genética, bem como àqueles associados ao meio ambiente e estilo de vida, tais como alimentação, tabagismo e consumo de álcool (CHITAPANARUX et al., 2006; DIXIT et al., 2015; para revisão ver SCULLY e BAGAM, 2007). Recentemente, tem sido reportada uma alta incidência de câncer na região oral em pacientes jovens infectados com Papiloma Vírus Humano (HPV) e Epstein-Barr vírus (para revisão ver DIXIT et al., 2015; MARUR e FORASTIERE, 2016). Esses fatores podem ocasionar diversas alterações epigenéticas que resultam no desenvolvimento de câncer orofacial (MARUR e FORASTIERE 2016). Um dos principais fenômenos epigenéticos observados em diversos tumores,

inclusive em tumores de face é a hipermetilação do DNA, que consiste em acoplamentos excessivos de radicais metila ao carbono 5 de citosinas na molécula de DNA. Além da hipermetilação do DNA, a modificação estrutural das histonas, através da adição de um radical metila na citosina, também é considerada importante no silenciamento de genes, promovendo a compactação da cromatina, e inativação de processos de transcrição genética. Essas alterações levam a aquisição de sinais estimulantes para o autocrescimento de células escamosas, promovendo a inativação de genes supressores de crescimento tumoral, alterações de genes envolvidos na apoptose (morte celular programada), estimulação da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e promoção da invasão tecidual, bem como metástase (CHOI e MAYERS, 2008; COLOMBO e RAHAL, 2009; GARCÍA e GARCÍA-GARCÍA, 2012; para revisão ver MARUR e FORATIERE, 2016).

O diagnóstico do carcinoma de cabeça e pescoço é feito através de exame clínico, que inclui palpação das estruturas orofaciais e identificação da lesão, a fim de observar possíveis invasões a tecidos adjacentes, acompanhado de realização de biópsia e exame histopatológico (BAGAN et al., 2010; LAM e SCHIMIDT, 2011). Contudo, a busca de novas estratégias que contribuam para um diagnóstico precoce tem sido tema recorrente em pesquisas nesta área. Além disso, a presença de dor na região facial frequentemente contribui para o diagnóstico precoce da doença aumentando a chance de um melhor prognóstico para o paciente.

Nesse sentido, dentre os vários sintomas relatados por pacientes acometidos por carcinoma facial, a dor é um dos mais aparentes e comuns, sendo o primeiro a ser reportado em 20-50% dos casos, o que contribui para o diagnóstico precoce da doença (BRIGATTE et al., 2007; para revisão ver DIOS e LESTÓN, 2010; GORSKY et al., 2004; JAINKITTIVONG et al., 2009; LAM e SCHIMIDT, 2011; MANTYH et al., 2010). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), pelo menos 90% dos pacientes com câncer de face relatam dor no decurso da doença (CARACENI, 1999), sendo que dois a cada três pacientes relatam sintomas de dor no período de 6 meses antecedentes ao diagnóstico (para revisão ver DIOS e LESTÓN, 2010). Porém, em alguns casos, a dor aparece tardiamente, em estágios mais avançados da doença, e nesses casos, seu controle é ainda mais difícil (BAGAN et al., 2010). Ainda, 30 a 50% dos pacientes que apresentam a dor como sintoma a descrevem como moderada ou severa (BRIGATTE et al., 2007;

MERCADANTE e ARCURI, 1998; PORTENOY et al., 1999; PORTENOY e LESAGE, 1999).

A dor associada ao câncer é uma experiência subjetiva complexa que compreende componentes sensoriais, afetivos e cognitivos, podendo ser dividida em dor evocada, espontânea ou tônica e do tipo *breakthrough* (MANTYH et al., 2010). A dor evocada como o próprio nome já diz, pode ser definida como dor promovida devido a uma estimulação no local do tumor, decorrente principalmente de atividades cotidianas (LAM e SCHMIDT, 2011; para revisão ver SCHMIDT, 2014; 2015; VIET e SCHMIDT, 2012). A dor pode ser desencadeada por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, sendo a dor à estimulação mecânica relatada com mais frequência pelos pacientes (LAM e SCHMIDT, 2011; para revisão ver VIET e SCHMIDT, 2012). Este tipo de dor está relacionado a fenômenos como a hiperalgesia e alodinia, ou seja, dor exacerbada frente a uma estimulação nociva e percepção de um estímulo não nocivo como nocivo, respectivamente (para revisão ver SCHMIDT, 2014; 2015; VIET e SCHMIDT, 2012). Nesse sentido, é válido ressaltar que na região orofacial vários movimentos funcionais podem provocar a dor, como por exemplo, a deglutição, a mastigação e a fala (DATTA e PAI, 2006).

A dor espontânea ou tônica pode ser definida como uma dor que ocorre na ausência de qualquer estímulo, estando intimamente relacionada ao componente afetivo/emocional da dor (KING et al., 2009; para revisão ver NAVRATILOVA et al., 2013; 2016). As dores espontâneas caracterizam-se por dores de intensidade moderada à severa, de curta duração, podendo ocorrer várias vezes ao dia (KING et al., 2009; para revisão ver NAVRATILOVA et al., 2013; 2016). Existem evidências de que os mecanismos de desenvolvimento da dor espontânea diferem daqueles relacionados às dores evocadas, e estes podem incluir a ocorrência de *sprouting* (i.e. brotamento) de nervos e participação áreas de distintas do sistema nervoso central como o córtex anterior cingulado (ACC), área tegmental ventral (VTA) e núcleo accumbens (NAc). No entanto, estas diferenças ainda precisam ser mais bem investigadas (para revisão ver MANTYH et al., 2006; NAVRATILOVA et al., 2013; 2016).

Por fim, a dor do tipo *breakthrough* pode ser definida como um ataque de dor exacerbado que ocorre em pacientes que apresentam estados de dor evocada e espontânea, mas que estão sob controle farmacológico (para revisão ver MERCADANTE, 2011; TANG et al., 2016). A dor do tipo *breakthrough* pode ser

dividida de acordo com a maneira que ela é desencadeada: 1) idiopática ou espontânea, isto é, sem causa específica para a ocorrência do ataque de dor; 2) incidente, ou seja, ataque de dor relacionado a um movimento funcional; 3) relacionada ao fim do efeito do fármaco analgésico, isto é, ataque de dor relacionado à falha terapêutica (MERCADANTE, 2011). A dor do tipo *breakthrough* caracteriza-se por episódios de dor (até 5 por dia) de intensidade severa, início rápido e duração curta (i.e. 30 minutos) (TANG et al., 2016). Acreditava-se que a dor do tipo *breakthrough* seria mediada pelos mesmos mecanismos associados às dores evocada e espontânea. Entretanto, estudos recentes sugerem que o desenvolvimento da dor do tipo *breakthrough* envolva mecanismos diferentes e/ou adicionais, como *sprouting* diferenciado de nervos (MANTYH et al., 2010; ZUCCO et al., 2014). Estas modalidades diferentes de dor que podem estar relacionadas ao câncer tornam seu controle farmacológico ainda mais complexo (MANTYH, 2006; MERCADANTE, 2011).

1.2.1 Controle da dor associada ao câncer

O controle da dor do câncer segue a escada analgésica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual preconiza a utilização de analgésicos não opioides (i.e. anti-inflamatórios não esteroidais, AINES) em condições de dor de intensidade leve. No caso de dor de intensidade moderada, devem ser utilizados fármacos opioides fracos, os quais podem ser associados a analgésicos não opioides (AINES) ou ainda a fármacos adjuvantes. Os adjuvantes compreendem principalmente fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes, comumente prescritos para o melhor controle. Apesar de não serem drogas específicas para o tratamento da dor, já está amplamente demonstrado o efeito analgésico dessas classes através da modulação do sistema inibitório descendente e bloqueio de canais iônicos responsáveis pela sensibilização das fibras nociceptivas periféricas e centrais (para revisão ver MERCADANTE e FULFARO, 2005; MERCADANTE, 2010).

No caso da dor persistir e/ou aumentar sua intensidade, recomenda-se a utilização de analgésicos opioides fortes, tais como morfina, metadona e hidrocodona, os quais também podem ser associados a analgésicos não opioides e adjuvantes (para revisão ver MERCADANTE e FULFARO, 2005; MERCADANTE, 2010). Atualmente, para o controle da dor espontânea preconiza-se a utilização de

opioides fortes, e de acordo com a literatura essa é a única classe de fármacos parcialmente eficaz no controle dessa modalidade de dor (para revisão ver MERCADANTE, 2012; 2010; PAICE e FERRELL, 2011). Adicionalmente, o tratamento para a dor do tipo *breakthrough* requer a utilização de opioides de ação rápida, como o fentanil intranasal, além dos fármacos sugeridos pela OMS para o controle das outras qualidades de dor de câncer, como AINES e opioides (para revisão ver PAICE e FERRELL, 2011). Entretanto, sabe-se que o uso de fármacos opioides está associado a inúmeros efeitos adversos, incluindo náusea, constipação, sonolência e confusão mental, o que limita a dosagem, levando ao controle inadequado da dor, além de tolerância ao efeito analgésico decorrente da sua utilização prolongada. Dessa maneira, esses tratamentos farmacológicos, quando empregados em casos de câncer avançado são pouco efetivos para o controle da dor (para revisão ver DIOS e LESTÓN, 2010; SAMEK et al., 1990; WHO, 1990).

Portanto, o melhor entendimento da fisiopatologia da dor associada ao câncer, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos, poderá contribuir para o emprego ou desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas que contribuam para o controle da dor e conseqüentemente melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

1.2.2 Mecanismos associados ao desenvolvimento da dor no câncer de face

A dor de câncer pode ser considerada de qualidade mista, pois pode apresentar componentes inflamatórios e neuropáticos (SCHMIDT, 2014). Dentre os mecanismos que contribuem para o componente neuropático da dor associada ao câncer da região orofacial pode-se destacar a compressão de ramos do nervo trigêmeo pelo tumor. Já o componente inflamatório, envolve a participação de células tumorais e do sistema imune, que produzem e secretam mediadores responsáveis pela ativação e sensibilização das fibras nociceptivas periféricas primárias, resultando em hiperalgesia (HAMAMOTO et al., 2008; LIST et al., 2000). Além disso, o câncer induz reorganização neuroquímica do subnúcleo *caudalis* e de estruturas relacionadas ao controle descendente da nocicepção, contribuindo para a ocorrência de disparos neuronais espontâneos e exacerbação da resposta nociceptiva (para revisão ver SCHMIDT, 2014). Dentre os mediadores produzidos e secretados pelas células tumorais podemos destacar o fator de necrose tumoral alfa

(TNF α), a interleucina-6, os prótons H⁺, o fator de crescimento neuronal (NGF) e as endotelinas (para revisão ver SCHMIDT et al., 2010).

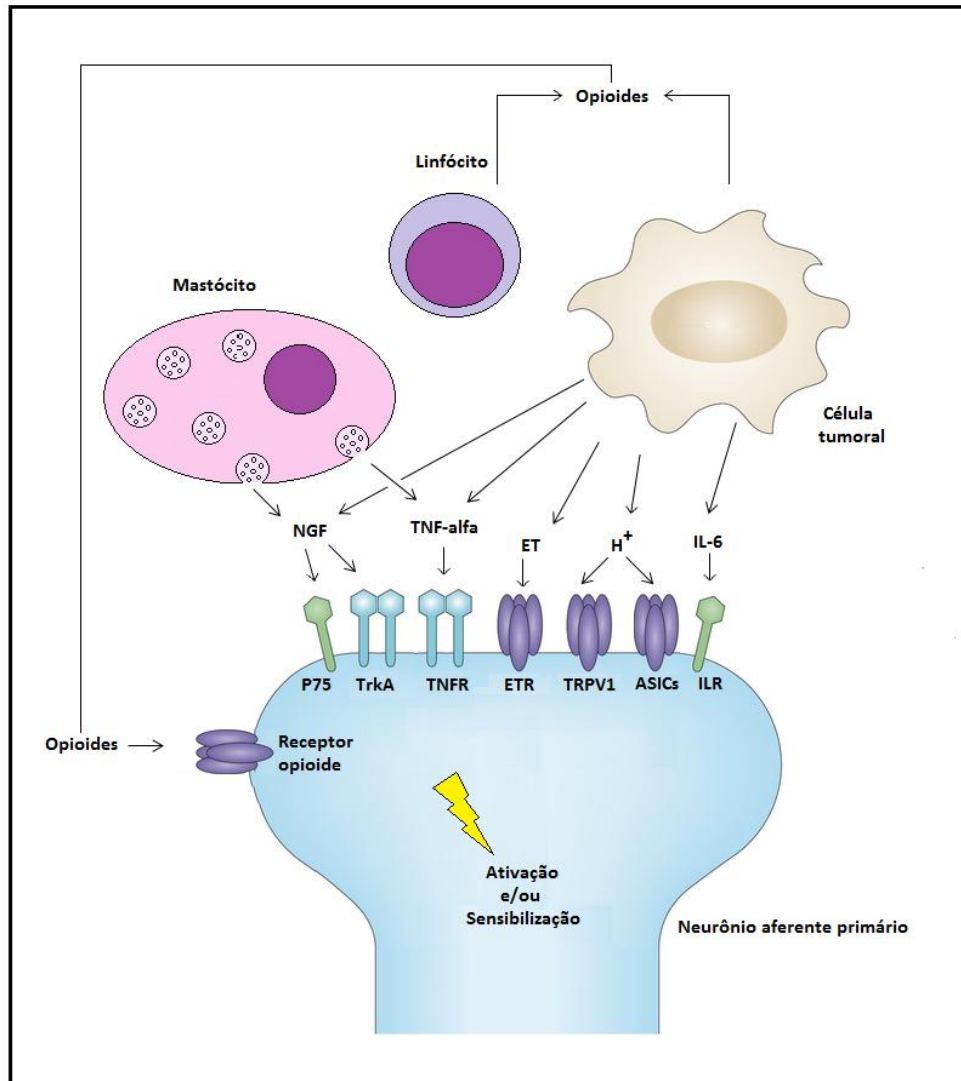


FIGURA 2 - Interação entre o microambiente tumoral e o sistema sensorial trigeminal. Os componentes celulares que participam do microambiente tumoral incluem as células tumorais, nociceptores periféricos do sistema sensorial trigeminal e células do sistema imune. A principal hipótese relacionada à dor associada ao câncer de face é que as células tumorais, bem como as do sistema imune sintetizam e secretam mediadores que sensibilizam e/ou ativam os neurônios aferentes primários, através da interação com receptores específicos, demonstrados na figura pelas setas. Os principais mediadores responsáveis por essa modulação são: o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina-6, os prótons H⁺, o fator de crescimento neuronal (NGF) e as endotelinas. Em adição, pode ser observada a liberação de opioides que podem atuar na promoção de analgesia endógena. FONTE: Adaptado de SCHMIDT et al., 2010

Dentre as diversas citocinas que tem se mostrado contribuir para o desenvolvimento da dor no câncer, o TNF α parece ter papel fundamental, pois atua como iniciador de alguns processos. Essa citocina é capaz de sensibilizar as fibras

periféricas, através da sua interação com receptores presentes nas mesmas, e também atua estimulando células do sistema imune a produzir e ou liberar outras substâncias pró-nociceptivas, tais como a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6). Existem relatos de que a promoção desses efeitos pelo TNF α contribui tanto para a nocicepção quanto para a hiperalgesia mecânica e térmica em diversos tipos de câncer em humanos e em roedores (para revisão ver SCHMIDT et al., 2010; TANAKA et al., 2012; WACNIK et al., 2005; WOOLF et al., 1997).

Além disso, durante a carcinogênese (processo de formação de novas células tumorais) ocorre uma diminuição do pH na região do tumor, promovida pela secreção de prótons, o que culmina em aumento da taxa metabólica e ativação de receptores específicos, tais como os canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) e os receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) (NAGAMINE et al., 2006; para revisão ver SCHMIDT et al., 2010). Além de sua propriedade de ativação por prótons, ambos, ASICs e TRPV1, têm sua expressão e atividade aumentada por mediadores inflamatórios e são considerados importantes transdutores das informações nociceptivas e hiperalgesia (DEVAL et al., 2010, FERNANDES et al., 2012; PALAZZO et al. 2012).

Ademais, um mediador cujo envolvimento tem sido amplamente descrito em carcinomas orais é fator de crescimento neuronal (NGF). O NGF normalmente é secretado por neurônios sensoriais primários, em que através da interação com receptores de tirosina quinase A (TrkA), promove o crescimento e sobrevivência dessas células. Contudo, o NGF também pode ser produzido pelo próprio tumor. Em alguns tipos de carcinoma, foi observado um aumento significativo nos níveis desse fator, o qual parece facilitar fenômenos de hiperalgesia térmica e mecânica, bem como proliferação e invasão celular em outros tecidos (KOLOKYTHAS et al., 2010; para revisão ver SCHMIDT, 2014; YE et al., 2011). Adicionalmente, o NGF tem sido reportado como uma das moléculas responsáveis pela ocorrência de *sprouting* de nervos sensoriais periféricos em diversos tipos de câncer, promovendo uma reorganização desses neurônios, o que contribui diretamente para o surgimento e manutenção de fenômenos nociceptivos (para revisão ver SCHMIDT, 2014). Esse fator também parece estar envolvido em alterações sensoriais no sistema nervoso central, sendo um fator importante na plasticidade neuronal observada no corno dorsal da medula (FRIEDMAN, 1999; KOLOKYTHAS et al., 2010; para revisão ver SCHMIDT, 2014; YE et al., 2011).

Ainda, existem várias evidências de que as endotelinas e seus receptores, através de ações autócrinas e parácrinas, possuem importante participação na progressão e manutenção de vários tipos de câncer (para revisão ver KHIMJI e ROCKEY, 2010; SCHMIDT et al., 2010; TAMKUS et al., 2009). Atualmente, sabe-se que existe uma interação entre as células tumorais e endoteliais, na qual as células tumorais liberam substâncias, principalmente endotelina-1 (ET-1) que estimulam as células endoteliais e em troca as células endoteliais liberam substâncias que promovem a angiogênese, o crescimento, proliferação, invasão do tumor, bem como a metástase (para revisão ver CAPP et al., 2009; SCHMIDT 2014). Além das inúmeras evidências da participação das endotelinas na progressão tumoral, vários estudos demonstram importante participação das endotelinas na dor (para revisão ver SCHMIDT et al., 2010; SCHMIDT, 2014).

Em vista dessas considerações, diversos estudos têm avaliado experimentalmente o papel desses mediadores na fisiopatologia da dor associada ao câncer de cabeça e pescoço, através de diversas técnicas, na busca de novas estratégias farmacológicas para o seu controle (NAGAMINE et al., 2006; SCHMIDT et al., 2007; YE et al., 2014).

1.2.2 Modelos experimentais para o estudo do carcinoma orofacial

A etiologia variada e, muitas vezes, multifatorial da dor associada ao câncer orofacial dificulta imensamente seu controle farmacológico. Dessa maneira, alguns estudos têm utilizado como ferramenta para investigação da fisiopatologia do câncer orofacial, a inoculação de células escamosas provenientes da cavidade oral de pacientes com câncer na pata de roedores (YE et al., 2014; RUPAREL et al., 2015). Apesar de se tratar de uma estratégia interessante, o grande viés na translação dos resultados obtidos nesse modelo para a clínica é a localização da indução do carcinoma, visto que a região da pata possui uma inervação sensorial diferente da região orofacial e por consequência, um processamento nociceptivo distinto (BENOLIEL et al., 2001; BONGENHIELM et al., 1999; GRELIK et al., 2005; TAL E DEVOR, 1992). Por outro lado, modelos animais de indução de câncer em diferentes estruturas orofaciais têm sido desenvolvidos como uma ferramenta promissora para o esclarecimento da fisiopatologia dessas condições, o que permitirá a identificação de alvos terapêuticos que possam ser úteis para o controle farmacológico da dor

e/ou progressão do tumor (GAMBETA et al., 2016; HUMMIG et al., 2014; NAGAMINE et al., 2006; TAMAGAWA et al., 2016; YE et al., 2011; 2014).

Nesse sentido, Nagamine e colaboradores (2006) demonstraram que a indução do câncer de células escamosas (SCC) na cavidade oral de ratos resultou no desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica na região inervada pelos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmeo, assim como infiltração das células tumorais na mandíbula e nervo alveolar inferior. Esse estudo sugere ainda que o desenvolvimento da hiperalgesia esteja relacionado ao aumento dos níveis dos neuropeptídeos SP e CGRP, bem como ao aumento na expressão de receptores de ATP, P2X3, e TRPV1 em células do gânglio do trigêmeo (NAGAMINE et al., 2006).

Adicionalmente, Ye e colaboradores (2011) também demonstraram através da inoculação de células de carcinoma oral humano (HSC-3) no assoalho da boca de camundongos, o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, avaliado através da utilização de um aparato denominado de dolognômetro. Esse estudo sugere que o NGF seja uma molécula chave para o desenvolvimento dessa hiperalgesia mecânica, bem como da progressão tumoral e do surgimento de caquexia (YE et al., 2011).

Esse mesmo grupo demonstrou a contribuição do ATP e seu receptor no microambiente tumoral para indução da hiperalgesia mecânica, através da inoculação de células de carcinoma oral humano (HNSCC) no assoalho da boca de camundongos (YE et al., 2014). Em ratos, Tamagawa e colaboradores (2016) mostraram que a inoculação de SCC na língua promoveu hiperalgesia mecânica e aumento na ativação glial, via receptor P2Y₁₂. Além disso, esses autores observaram aumento na excitabilidade de neurônios nociceptivos no subnúcleo *caudalis* dos animais, indicando sensibilização central (TAMAGAWA et al., 2016).

Outra linhagem celular que vem sendo amplamente utilizada para o estudo da fisiopatologia do câncer é a Walker-256/B, pois permite a avaliação do metabolismo celular, bem como de respostas imunológicas. É uma linhagem de tumor sólido, de crescimento rápido e com alta estabilidade *in vitro* e *in vivo*, que por se tratar de uma linhagem celular específica para ratos tem evidente utilização experimental. Além de apresentar características morfológicas similares aos tumores de SCC, o tumor sólido promovido pela inoculação dessa linhagem celular, promove a liberação de algumas citocinas, tais como TNF α e IL-6, as quais já foram detectadas no plasma de animais, bem como de pacientes com carcinoma orofacial (ACCO et al., 2012;

ALVES et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2010; KOPRUSZINSKI et al., dados não publicados; SAYEED et al., 2015).

Essa linhagem vem sendo empregada em modelos experimentais de carcinoma, tanto para o estudo do desenvolvimento tumoral e avaliação do efeito de drogas antitumorais quanto no estudo das alterações sensoriais, tais como dor espontânea e hiperalgesia a diferentes estímulos e comorbidades relacionadas a essa condição (ALVES et al., 2004; BRIGATTE et al., 2007; GAMBETA et al., 2016; HIDAKA et al., 2011; HUMMIG et al., 2014; ONO et al., 2009; 2012). Com relação às alterações sensoriais, Brigatte e colaboradores (2007) detectaram dor espontânea, alodinia tátil e hiperalgesia mecânica cinco dias após a injeção intraplantar de células de carcinoma Walker-256/B, período em que também foi evidenciado o crescimento tumoral.

Na região orofacial, a inoculação de uma suspensão de células de carcinoma de Walker-256/B (10^6 células) na cavidade alveolar de ratos submetidos à exodontia dos primeiros e segundos molares inferiores direitos resultou em infiltração óssea e áreas de necrose na mandíbula (ALVES et al., 2004). Já no estudo de Ono e colaboradores (2009), as células de carcinoma de Walker-256/B foram inoculadas na região de inserção das vibrissas de ratos, o que resultou em dificuldade de alimentação dos animais, observada 10 dias após a inoculação, e que foi precedida por hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (detectadas 4 e 7 dias após a inoculação). Além disso, nesse estudo foi observado um aumento na expressão do indicador de ativação neuronal c-Fos no subnúcleo *caudalis*, o que sugere a ativação de neurônios centrais do complexo trigeminal após inoculação periférica das células tumorais. Por fim, esses autores sugerem que esse modelo de carcinoma orofacial produz sintomas semelhantes aqueles observados na clínica, que incluem dificuldade de alimentação e dor. Através do emprego desse mesmo modelo, Hidaka e colaboradores (2011), verificaram o desenvolvimento de hiperalgesia térmica, alodinia mecânica e dor espontânea após a inoculação de células tumorais, além de ativação de células da glia no subnúcleo *caudalis*.

Portanto, a indução experimental de câncer orofacial através da inoculação de células da linhagem Walker-256/B, pode ser considerada relevante para o estudo de mecanismos associados ao desenvolvimento da dor associada ao câncer, bem como de estratégias farmacológicas para o controle dessa condição. Adicionalmente, essa linhagem permite a investigação da participação de diversas

substâncias endógenas já descritas acima, como as endotelinas, no desenvolvimento e manutenção da dor associada ao câncer orofacial.

1.3 ENDOTELINAS

As endotelinas são peptídeos que possuem diversas funções fisiológicas no organismo, como modulação do tônus vasomotor, diferenciação e desenvolvimento tecidual, proliferação celular e produção hormonal, além de participarem de diversos processos fisiopatológicos, incluindo câncer e dor (para revisões ver HOFFMAN et al., 2010; KHODOROVA et al., 2009; RUSSO et al., 2010).

A endotelina-1 (ET-1) é o representante mais importante desta família, que também inclui a ET-2 e a ET-3, sendo todos peptídeos constituídos por 21 aminoácidos. Além disso, as endotelinas apresentam duas pontes disulfídicas internas ligando as moléculas de cisteína nas posições 1-15 e 3-11, um amino terminal (N-terminal) que determina a afinidade do peptídeo pelo receptor, e um carboxi terminal contendo o aminoácido responsável pela ligação ao receptor (para revisão ver GANDHI et al., 1994; KHIMJI e ROCKEY, 2010; MASAKI, 2004).

As diferentes isoformas de endotelina são sintetizadas a partir de um único gene, a uma proteína precursora denominada pré-pro-endotelina, que após o processo de tradução, gera uma molécula peptídica de 203 aminoácidos denominada pré-pro-endotelina-1. No citoplasma essa molécula é clivada por endopeptidases em uma molécula de 37-41 aminoácidos conhecida como *big endotelina*, a qual sofre a ação das enzimas conversoras de endotelina (ECE), originando as diferentes isoformas de endotelinas (para revisão ver GANDHI et al., 1994; KHIMJI e ROCKEY, 2010; KHODOROVA et al., 2009; MASAKI, 2004). A isoforma ET-1 é amplamente encontrada no organismo humano, sendo expressa principalmente por células endoteliais, enquanto que a ET-2 está presente principalmente no ovário e rins e a ET-3 principalmente em tecidos cerebrais (para revisões ver HOFFMAN et al., 2010; KHIMJI e ROCKEY, 2010; KHODOROVA et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014).

As ETs apresentam um tempo de meia-vida curto, visto que são prontamente degradadas por proteases. Em mamíferos, as ações das endotelinas são mediadas através de dois receptores específicos, denominados ET_A e ET_B, os quais pertencem à grande família de receptores acoplados a proteínas G. Possuindo uma homologia

de cerca de 50% entre si, esses receptores são encontrados em uma grande variedade de células, tais como macrófagos, plaquetas e células tumorais. Enquanto receptores ET_A estão presentes predominantemente em células da musculatura lisa e musculatura cardíaca, receptores ET_B são expressos principalmente em células endoteliais (para revisão ver KHIMJI e ROCKEY, 2010; MASAKI, 2004). Apesar dessa distinta distribuição, os receptores de endotelina são encontrados co-expressos em algumas células, como astrócitos, células específicas da musculatura lisa e endoteliais cardíacas, entre outras.

Além disso, os receptores de endotelina também estão expressos no sistema sensorial periférico e central, possuindo importante participação na transmissão da nocicepção induzida por diversas condições, tais como, dores inflamatórias, neuropáticas e câncer. No sistema sensorial espinhal, os receptores ET_A são expressos periféricamente em fibras C e A δ , bem como no SNC, em regiões como corno dorsal da medula, PAG, entre outros, enquanto que receptores ET_B estão distribuídos periféricamente nas células de Schwann e no DRG, assim como no SNC, em células satélites (para revisão ver KHODOROVA et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014). Nosso grupo demonstrou a presença de receptores ET_A e ET_B no sistema sensorial trigeminal, no entanto, em oposição aos estudos sobre esses receptores no sistema sensorial espinhal, reportou pela primeira vez a presença de receptores ET_B em fibras C, destacando a sua importante contribuição no processamento nociceptivo trigeminal de estímulos mecânicos, corroborando evidências sobre diferenças no processamento nociceptivo entre esses sistemas (CHICHORRO et al., 2006a; 2006b; 2010).

As isoformas ET-1 e ET-2 apresentam uma maior afinidade (70-100 vezes) pelo receptor ET_A do que a isoforma ET-3, enquanto que as três isoformas de endotelina exibem afinidade semelhante pelo receptor ET_B (ARAI et al., 1990; para revisão ver KIMJI e ROCKEY, 2010; SAKURAI et al., 1990). Ademais, além de apresentarem distribuição diferencial em alguns tecidos, a ativação dos receptores ET_A e ET_B podem levar a diferentes respostas teciduais, as quais podem até mesmo ser opostas. Assim, a ativação de receptores ET_A pela ET-1 é responsável principalmente por controlar respostas de vasoconstrição e proliferação celular, enquanto que a ativação de receptores ET_B pela ET-1 tem papel na sobrevivência e manutenção do tecido endotelial, bem como síntese de prostaciclina e óxido nítrico, com consequente vasodilatação (para revisão ver KHIMJI e ROCKEY, 2010;

KHODOROVA et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014).

Com relação às vias intracelulares, a ligação da ET-1 ao receptor ET_A, leva à ativação da PLC, e consequente formação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O DAG ativa a enzima fosfolipase C e o IP₃ promove a liberação do estoque intracelular de íons cálcio. A ligação da ET-1 ao receptor ET_A, também pode levar a ativação da enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis intracelulares de AMPc com consequente ativação da proteína quinase A. Adicionalmente, a interação da ET-1 ao receptor ET_A é capaz de promover a ativação da proteína tirosina quinase (PTK) FAK e/ou RAS, a qual promove a indução da via RAF/MEK/MAPK, que resulta na estimulação da transcrição de diferentes moléculas incluindo, protooncogênes como c-fos e c-jun, ativando o crescimento celular e facilitando os processos de metástase (para revisão ver GANDHI et al., 1994; KHIMJI e ROCKEY, 2010; MCKENZIE et al., 2014; MASAKI, 2004).

Já nas células do tecido endotelial, a ligação da ET-1 ao receptor ET_B, ativa a via PI-3-K/AKT, que resulta na estimulação da enzima óxido nítrico sintase, culminando na produção de óxido nítrico. Esse último, ativa a enzima guanilato ciclase, presente nas células da musculatura lisa, promovendo um aumento do GMPc intracelular, ativação da proteína quinase G e por consequência, relaxamento da musculatura, uma ação oposta a ativação de receptores ET_A em células da musculatura lisa vascular (para revisão ver GANDHI et al., 1994; KHIMJI e ROCKEY, 2010; MASAKI, 2004).

Os receptores ET_A e ET_B podem ainda ser discriminados pelo uso de antagonistas seletivos. Assim, receptores ET_A são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123, ou não peptídicos, como o atrasentan e o zibotentan. Por outro lado, os receptores ET_B são bloqueados por antagonistas peptídicos, como o BQ-788, ou não peptídicos, como o A-192621, enquanto a bosentana atua com um antagonista não seletivo de receptores ET_A/ET_B (para revisão ver MASAKI et al., 1994; SOKOLOVSKY, 1995; WEBB e MEEK, 1997). É importante mencionar que alguns antagonistas de receptores de endotelina estão sendo avaliados em estudos clínicos com a finalidade de serem utilizados como adjuvantes no tratamento de diferentes tipos de câncer, o que indica um importante papel para as endotelinas na fisiopatologia dessa doença (para revisão ver KANDALRAFT et al., 2009; RUSSO et al., 2010).

1.3.1 Endotelinas e câncer

Existem várias evidências de que as endotelinas e seus receptores possuem importante participação na progressão de vários tipos de câncer, através de ações autócrinas e parácrinas (para revisão ver KHIMJI e ROCKEY, 2010; SCHMIDT et al., 2010; TAMKUS et al., 2009). Atualmente, sabe-se que existe uma interação entre as células tumorais e endoteliais, na qual as células tumorais liberam substâncias que estimulam as células endoteliais e em troca as células endoteliais liberam substâncias que promovem o crescimento do tumor (para revisões ver CAPP et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014). Dentre essas substâncias, as endotelinas tem papel de destaque, pois são capazes de promover proliferação de células tumorais, invasão, angiogênese e metástase. Além disso, estudos mostram que a ET-1 inibe a apoptose tanto de células tumorais quanto de células endoteliais e do músculo liso vascular, o que contribui para a integridade dos novos vasos sanguíneos que nutrem o tumor (para revisão ver SCHMIDT et al., 2010; SHICHIRI et al., 1997; WU-WONG et al., 1997).

A participação da ET-1 na progressão de tumores sólidos como de próstata, ovário, mama, fígado, pulmão, rins, endométrio, cérebro e cavidade oral já foi descrita e parece envolver diversos mecanismos, os quais variam, inclusive, entre diferentes linhagens de células tumorais (para revisões ver BAGNATO et al., 2008; GORACA, 2002; MCKENZIE et al., 2014). Em células de câncer de cabeça e pescoço e de próstata, a ET-1 aumenta a sobrevivência e proliferação celular, enquanto que, a inibição da ação de ECE reduz estes processos. Em adição, a ET-1 é responsável pela indução e/ou modulação da atividade de metaloproteinases de matriz em células de câncer de mama e osteossarcoma, contribuindo para a exacerbação da proliferação celular. Já em células de câncer de cólon o aumento da expressão da ET-1 está associado à redução da apoptose das células tumorais (AWANO et al. 2006, para revisões ver KANDALAFT et al. 2009, HOFFMAN et al., 2010; MCKENZIE et al., 2014).

Adicionalmente, níveis aumentados de ET-1 já foram descritos em vários tipos celulares de câncer (para revisões ver KANDALAFT et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014). Awano e colaboradores (2006) confirmaram esse aumento dos níveis de ET-1 promovidos por SCC humano em cultivo, além de observarem aumento da expressão de receptores ET_A e ET_B nestas células, associando esse fenômeno ao

aumento da proliferação celular ocorrida *in vitro*. Ademais, Ishimoto et al. (2012) relataram o efeito na redução da proliferação celular, da mesma linhagem celular em cultivo, através do bloqueio de receptores ET_B.

Clinicamente, pacientes diagnosticados com diferentes tipos de tumores sólidos apresentam níveis séricos elevados de ET-1 (para revisão ver KANDALAFT et al., 2009; MCKENZIE et al., 2014). Corroborando esta evidência, Pickering e colaboradores (2007) verificaram aumento significativo de ET-1 na saliva de pacientes com tumor na face, e sugerem que essa elevação seja resultado da secreção desse peptídeo pela porção do carcinoma exposta na cavidade oral. Contudo, nenhuma relação foi observada quanto ao tamanho do tumor e níveis de ET-1. Recentemente, foi reportado níveis aumentados de *big* ET-1 no plasma de pacientes com SCC (MANKAPURE et al., 2015).

Os efeitos da ET-1 nas células tumorais parecem ser mediados principalmente por receptores ET_A. Aumento significativo na expressão de receptores ET_A têm sido demonstrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em vários tipos de tumores (CARDUCCI e JIMENO, 2006; PFLUG et al., 2007). Ademais, sugere-se que aumentos concomitantes na expressão de ET-1 e receptores ET_A levam a proliferação das células tumorais, inibição da apoptose, remodelamento da matriz celular, entre outros efeitos, os quais contribuem para a progressão do tumor, bem como para o surgimento de metástases (para revisão ver KANDALAFT et al., 2009). Apesar da ênfase no papel dos receptores ET_A no câncer, também existem evidências da participação de receptores ET_B. Nesse sentido, o aumento da expressão de receptores ET_B está correlacionado ao desenvolvimento e progressão do melanoma, e o antagonista de receptores ET_B, BQ-788, foi capaz de inibir o crescimento de células de melanoma humano e reduzir o crescimento tumoral do melanoma humano em camundongos (BACHMANN-BRANDT et al., 2000; LAHAV et al., 1999; LAHAV, 2005).

Existem evidências que ambos os receptores endotelinérgicos participem do processo de angiogênese, que acompanha a progressão tumoral. Tem sido sugerido que, a ativação dos receptores ET_B pela ET-1 modula os estágios iniciais da neovascularização, tais como migração, proliferação e invasão do tecido tumoral. Entretanto, no estágio de maturação desses vasos a modulação parece ocorrer via receptores ET_A, cuja ativação pela ET-1 resulta na produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O VEGF, ao se ligar a receptores específicos, estimula a

angiogênese com a finalidade de promover irrigação e nutrição das células tumorais, resultando no aumento da proliferação celular e invasão tecidual pelas mesmas. Este fator encontra-se aumentado em tumores malignos, e sugere-se que o mesmo pode representar um marcador tanto da malignidade quanto da progressão tumoral, inclusive nos carcinomas orofaciais (BAGNATO e SPINELLA, 2002; HOFFMAN et al., 2010; SALANI et al., 2000; SUGIURA et al., 2009; TANAKA et al., 2012).

Além da importante participação da ET-1 nos diferentes tipos de câncer citados acima, a endotelina também tem sido apontada como importante mediador na manutenção e progressão do SCC de cabeça e pescoço. As ações da ET incluem a modulação do sistema imunológico, sobrevivência, proliferação, invasão e metástase celular, além de participação na geração da dor associada ao desenvolvimento e progressão tumoral (para revisões ver MCKENZIE et al., 2014; RUSSO et al., 2010).

1.3.2 Endotelinas e dor associada ao câncer

No sistema sensorial trigeminal a demonstração da participação das endotelinas como importantes mediadores da hiperalgesia orofacial foi previamente estabelecida pelo nosso grupo (CHICHORRO et al., 2006a; 2006b; 2009; 2010). A administração de ET-1 no lábio de ratos induziu hiperalgesia térmica ao calor e ao frio, mediada por receptores ET_A e ET_B , além de hiperalgesia mecânica, promovida pela ativação de receptores ET_A e/ou ET_B presentes nas fibras C e $A\delta$, ou ainda através da ativação de receptores ET_B expressos em células da glia (CHICHORRO et al., 2010). Além disso, através de um modelo de neuralgia do trigêmeo, foi observado o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica, reduzidas pelo bloqueio de receptores ET_A e/ou ET_B e apenas pelo bloqueio de receptores ET_B , respectivamente (CHICHORRO et al., 2006a; 2006b; 2009). Assim, estes estudos sugerem o bloqueio de receptores ET_A e ET_B , como potenciais alvos terapêuticos para o controle de dores crânio faciais de diferentes origens (CHICHORRO et al., 2006a; 2006b; 2009; 2010).

As endotelinas também têm sido demonstradas como importantes mediadores nociceptivos em modelos animais de câncer. Nesse sentido, foi observado que a indução tumoral através da inoculação de SCC na pata de camundongos promoveu o aumento dos níveis de ET-1 no microambiente tumoral, além do desenvolvimento

de hiperalgesia mecânica. Este estudo sugere que o aumento dos níveis de ET-1 seja mais importante para as alterações nociceptivas associadas ao tumor do que para o aumento do volume tumoral (PICKERING et al., 2008).

Diversos estudos têm demonstrado que antagonistas de receptores ET_A e/ou ET_B reduzem significativamente parâmetros como dor espontânea, hiperalgesia térmica e mecânica em diferentes modelos animais de câncer (FUGITA et al., 2008, 2007; HAMAMOTO et al., 2008; HANS et al., 2009; SCHMIDT et al., 2007). No estudo de Schmidt et al. (2007) observou-se que o tratamento local com um antagonista de receptores ET_A promovia efeito antinociceptivo similar àquele obtido com o tratamento sistêmico com morfina, em um modelo de câncer induzido por inoculação de SCC na pata de camundongos. Em concordância, Quang e colaboradores (2010a) verificaram que a inoculação de SCC proveniente da região oral na pata de camundongos promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, que foi revertida pela administração local de um antagonista de receptores ET_A. Interessantemente, esse mesmo grupo demonstrou um efeito antinociceptivo semelhante com o tratamento local com um agonista de receptores ET_B, e ambos os tratamentos promoveram a liberação de opioides endógenos no microambiente tumoral (QUANG et al., 2010b). Corroborando dados anteriores, Viet e colaboradores (2011), após a inoculação de SCC em camundongos, observaram a ocorrência de hipermetilação de um gene responsável pela expressão de receptores ET_B no tumor, resultando em uma *downregulation* dos mesmos, a qual foi relacionada ao desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. O bloqueio da metilação excessiva, e por consequência a re-expressão de receptores ET_B, reduziu a hiperalgesia mecânica. Além disso, Hamamoto et al. (2008), demonstrou, em um modelo de câncer ósseo em camundongos, que a ET-1 no local do tumor contribuía para a ativação e sensibilização dos nociceptores através da ativação de receptores ET_A.

Em carcinomas orofaciais já foram demonstrados níveis aumentados de ET-1, bem como aumento da expressão dos receptores ET_A e ET_B em neurônios (AWANO et al., 2006; FUJITA et al., 2007; PICKERING et al., 2008). Pacientes com SCC apresentam aumento nos níveis de ET-1 no local do carcinoma, o qual tem sido relacionado a relatos de alodinia mecânica (para revisão ver LAM e SCHMIDT, 2012; CONNELLY e SCHMIDT, 2007; KOLOKYTHAS et al., 2007; PICKERING et al., 2007). Ademais, no estudo de Awano e colaboradores (2006) foi detectada

expressão aumentada de ET-1 e de receptores ET_B em SCC humanas. Além disso, foi relatado por esses autores que a ET-1 estimula a proliferação de SCC e esta estimulação é inibida tanto por antagonistas de receptores ET_A quanto ET_B. Recentemente, foi demonstrado aumento dos níveis de ET-1 no plasma de pacientes com dor do tipo *breakthrough* associadas a diversos tipos de câncer, em comparação a pacientes com câncer sem dor dessa qualidade, e pacientes sem câncer (YAN et al., 2015). Por fim, esses autores sugerem que a modulação do sistema endotelinérgico representaria um novo alvo terapêutico para o tratamento do câncer oral. No entanto, o efeito do bloqueio farmacológico de receptores ET_A e ET_B nas alterações sensoriais da face associadas ao câncer ainda não foi investigada.

Atualmente, quatro antagonistas endotelinérgicos estão sendo avaliados em estudos clínicos, tanto como monoterapia quanto em associação, para diferentes tipos de câncer, inclusive próstata, glioblastoma, pulmão, entre outros. Os antagonistas avaliados incluem zibotentan e atrasentan, seletivos para os receptores ET_A, além de bosentana e macitentan, antagonistas duais ET_A/ET_B (para revisões ver BAGNATO et al., 2011; ROSANO et al., 2013). Os resultados parciais desses estudos são conflitantes, principalmente no que diz respeito à participação das ETs na progressão de diversos carcinomas. Ademais, é importante ressaltar que em nenhum desses estudos está sendo avaliada a dor associada ao câncer dos pacientes. Esses dados reforçam a importância da investigação da participação das endotelinas, bem como de seus receptores, na dor, no desenvolvimento e na progressão tumoral em modelos pré-clínicos que utilizem diferentes linhagens tumorais e regiões de inoculação (para revisões ver BAGNATO et al., 2011; ROSANO et al., 2013; WANG et al., 2011).

Em vista dessas considerações, apesar das diversas evidências do papel relevante das endotelinas no câncer de cabeça e pescoço, não temos conhecimento de estudos que tenham avaliado o papel das endotelinas nas alterações sensoriais associadas a este tipo de câncer, a despeito das inúmeras evidências da sua importância na transmissão nociceptiva trigeminal. Ainda, é importante ressaltar que diversos antagonistas de receptores de endotelina avaliados em estudos clínicos, com a finalidade de serem utilizados como adjuvantes no tratamento de diferentes tipos de câncer, poderiam contribuir também para a modulação da dor associada a essa condição. Assim, a elucidação do papel das endotelinas e seus receptores em um modelo de carcinoma orofacial poderá indicar a utilidade desses alvos

terapêuticos nesse tipo de carcinoma, bem como contribuir para o entendimento da sua fisiopatologia. Portanto, esse estudo além de caracterizar as alterações sensoriais na face utilizando um modelo de carcinoma de Walker-256, teve como objetivo investigar o papel das endotelinas nas alterações sensoriais observadas nesse modelo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar as alterações sensoriais na face no modelo de carcinoma de Walker 256/B e investigar o papel das endotelinas nessas alterações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o surgimento de aumento do volume tumoral e alterações de peso dos animais associados à inoculação de células tumorais na face;
- Avaliar o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (frio e calor) e mecânica na face após a inoculação das células tumorais;
- Verificar o surgimento de comportamentos sugestivos de dor espontânea (i.e. *grooming* espontâneo) nos animais em diferentes períodos após a inoculação das células tumorais;
- Avaliar a existência de possível correlação entre o crescimento tumoral e o desenvolvimento das alterações sensoriais;
- Investigar o efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgesia térmica (frio e calor) e mecânica em animais com carcinoma facial;
- Avaliar o efeito do tratamento local e sistêmico com antagonistas dos receptores de endotelina (ET_A e ET_B) na hiperalgesia mecânica e ao calor após em animais com carcinoma facial;
- Verificar o efeito da associação de morfina com bosentana na hiperalgesia ao calor e mecânica em animais com carcinoma facial;
- Avaliar o efeito do tratamento local e sistêmico com morfina no *grooming* espontâneo e teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma facial;
- Investigar o efeito do tratamento local e sistêmico com bosentana no *grooming* espontâneo e teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma facial.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Em todos os experimentos comportamentais foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 200-250 g. Adicionalmente, para a manutenção *in vivo* das células tumorais foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, fêmeas, pesando entre 180-200 g. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram 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 antes dos experimentos. No mínimo 3 dias antes dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Para todos os experimentos comportamentais foram utilizados grupos independentes de 6-16 animais por grupo experimental. O número total de animais utilizados neste estudo foram 950 animais. 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 submetidos à aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA/BIO) da UFPR (autorização número 645, demonstrada no ANEXO I).

3.2 DROGAS UTILIZADAS

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

- Cloridrato de morfina (Merck, Kenilworth, NJ, USA);
- Bosentana (Actelion, Auschwil, Suíça), antagonista não peptídico e não seletivo dos receptores ET_A e ET_B ;
- BQ-123 (ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu], American Peptide, Sunnyvale, CA, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET_A ;
- BQ-788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L-y-metileucil-D-1 metoxycarbonil-D-norleucina, American Peptide, Sunnyvale, CA, USA), antagonista peptídico seletivo de receptores ET_B ;
- Cloridrato de lidocaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

- Cloridrato de cetamina (Rhobifarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, SP, Brasil);
- Xilazina (Laboratórios König S.A., Avellaneda, Argentina);
- Halotano (Cristália, Itapira, SP, Brasil);
- Solução salina estéril 0,9% (Samtec biotecnológica, Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Azul de tripan (Alphatec, Macaé, RJ, Brasil);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA, Amresco LLC, Cleveland, OH, USA);
- Salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline* – PBS, Laborclin, Vargem Grande, PR, Brasil).

O cloridrato de morfina foi diluído em solução salina estéril 0,9%, imediatamente antes da sua utilização, sendo administrado na dose de 30 µg/50 µL, localmente por via subcutânea (s.c.) no lábio superior direito dos animais, ipsilateralmente à inoculação das células tumorais, e sistemicamente nas doses de 0,625 e 2,5 mg/kg. O veículo da bosentana também foi solução salina estéril 0,9%, sendo administrado nas doses de 10 e 30 µg/50 µL, s.c., no lábio superior direito dos animais, ipsilateralmente à indução do tumor, e sistemicamente nas doses de 100 e 300 mg/kg, subcutaneamente. As soluções estoque de BQ-123 e BQ-788 (10^{-3} M) foram preparadas em PBS e mantidas a uma temperatura de - 20°C, sendo diluídas em solução salina estéril 0,9%, para 30 µg/50 µL, momentos antes dos experimentos. Ambas as drogas foram administradas no lábio superior direito dos animais por via subcutânea, ipsilateralmente à inoculação das células tumorais. O cloridrato de lidocaína foi dissolvido em solução salina estéril 0,9% para a concentração trabalho de 4%, sendo administrado no lábio superior direito dos animais em um volume de 50 µL, s.c., ipsilateralmente à indução do tumor. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), utilizado para a coleta do fluido ascítico contendo as células tumorais, foi dissolvido em salina tamponada com fosfato (PBS) a uma concentração de 0,5 M, mantido em pH 8. O azul de tripan, utilizado para o teste de viabilidade celular, foi dissolvido em salina tamponada com fosfato (PBS) para a concentração trabalho de 0,4%.

3.3 MANUTENÇÃO E INOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS

Foram utilizadas células tumorais da linhagem Walker-256/B mantidas na cavidade peritoneal de ratos Wistar fêmeas, inoculadas na concentração de 1×10^7

por 1 mL, a cada 5-7 dias. Entre o quinto e o sétimo dia pós-inoculação, os animais foram anestesiados por via inalatória com halotano (2% por 5 minutos), eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada laparotomia para coleta do fluido ascítico, ao qual adicionou-se EDTA (0,5 M, pH 8) proporção de 3:1 com EDTA. Após a coleta do fluido, a viabilidade celular foi observada pelo teste de exclusão com azul de Tripán a 0,4% em câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem das células. Para a manutenção da linhagem através da inoculação intraperitoneal, as células foram diluídas em PBS de forma a se obter uma suspensão na concentração de 1×10^7 por 1 mL e cada rato foi inoculado com 1 mL desta suspensão (BRIGATTE et al., 2007).

Para a indução do carcinoma facial, ratos Wistar machos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (80 e 10 mg/kg, respectivamente), via intraperitoneal. As células tumorais foram diluídas em PBS na concentração de 2×10^6 região direita de inserção das vibrissas num volume de 100 μ L/rato. Animais do grupo sham (controle) foram inoculados na face com 100 μ L de PBS (ONO et al., 2009; 2012).

3.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MASSA TUMORAL

Para avaliação do crescimento da massa tumoral, o tumor foi medido com o auxílio de um paquímetro, além disso, ao final do período de tratamento, o peso e volume do tumor também foram avaliados. Para tanto, os ratos foram submetidos à eutanásia e o tumor foi removido. O volume tumoral foi calculado segundo a descrição de MIZUNO et al. (1999) usando a fórmula descrita abaixo:

$$V(\text{cm}^3) = 4\pi/3.a^2.(b/2)$$

Onde a é o menor diâmetro e b é o maior diâmetro do tumor, medidos em centímetros.

3.5 TESTES NOCICEPTIVOS

3.5.1 Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor

Para a avaliação da hiperalgesia térmica ao calor, os animais foram contidos pela mão do experimentador e uma fonte de calor radiante (~50°) foi posicionada a aproximadamente 1 cm da área de inserção das vibrissas (região de inoculação das células tumorais). Este aparato foi modificado para permitir o controle correto da distância da fonte de calor radiante e a região de face. Em seguida, foi realizado o registro da latência para que os animais afastem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas, conforme previamente descrito por Chichorro et al. (2009). A aplicação do estímulo foi realizada em duplicata, e a média foi registrada como a latência para a resposta. Foram incluídos nos experimentos apenas animais que apresentaram latência para a resposta entre 9 e 15 s a partir da aplicação do estímulo. Além disso, foi estabelecido um tempo de corte de 20 s após a aplicação do estímulo com a finalidade de evitar danos no tecido. Esse teste foi realizado imediatamente antes e após a inoculação das células tumorais, com a intenção de determinar a responsividade basal dos animais frente a este estímulo e detectar reduções na latência basal, um indicativo de hiperalgesia ao calor.

3.5.2 Avaliação da hiperalgesia térmica ao frio

Para a realização deste teste, os animais foram previamente habituados em caixas de observação por aproximadamente 30 minutos e em seguida um spray de tetrafluoreto 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. A aplicação do estímulo foi realizada em duplicata, e a média foi registrada como o tempo de resposta. Foram incluídos nos experimentos apenas animais cujo tempo de *grooming* facial foi ≤ 15 s antes da realização da inoculação das células tumorais na face de ratos (CHICHORRO et al., 2006b). Esse teste foi realizado imediatamente antes e após da inoculação das células tumorais, com a intenção de se determinar a responsividade basal dos animais frente a este estímulo e detectar aumento no comportamento de *grooming* bilateral após a aplicação do spray, um indicativo de hiperalgesia ao frio.

3.5.3 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Para a aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram habituados individualmente por pelos menos 2 horas nas caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma pré-seleção dos animais, a qual consiste na aplicação crescente de 8 filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein *monofilaments*, Stoelting, USA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g) na região de inserção das vibrissas. Cada filamento foi aplicado por 3 vezes consecutivas, com um intervalo de ~30 s entre cada aplicação. Foi considerado o limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica o filamento que evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape (CHICHORRO et al., 2006a). 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 superior ou igual a 8 g. Os testes para avaliação da hiperalgesia mecânica foram realizados imediatamente antes e após a inoculação das células tumorais, com a intenção de realizar a pré-seleção dos animais frente a este estímulo e detectar reduções no limiar de resposta frente ao limiar mecânico após a indução tumoral, um indicativo de hiperalgesia mecânica.

3.5.4 Avaliação do *grooming* espontâneo

Para a realização desse teste, os animais foram previamente habituados em caixas individuais de observação por aproximadamente 15 min, e foram mantidos nessas caixas nos 10 min subsequentes para registro do tempo despendido para a realização do *grooming* facial espontâneo, considerado a limpeza bilateral da face com as patas dianteiras (HIDAKA et al., 2011). O aumento significativo do tempo de *grooming* em relação aos animais controle é considerado um indicativo de dor facial espontânea (HIDAKA et al., 2011)

3.5.5 Teste de preferência condicionada ao lugar

Para avaliação da dor tônica associada ao câncer facial foi utilizado o paradigma do teste de preferência condicionada ao lugar (CPP) do alívio de dor,

descrito primeiramente por King e colaboradores (2009). Nesse teste foi utilizado um aparato de madeira contendo três compartimentos (A, B e C), com o compartimento B, denominado câmara neutra, localizado no centro do aparato (Altura: 36 cm, largura: 25 cm e comprimento: 10 cm), responsável pela separação de cada um dos compartimentos adjacentes por um divisor com uma porta de entrada, contendo uma luz de LED (100 lux), que nessa intensidade é aversiva para os animais. Os compartimentos A e C, denominados câmaras testes, (Altura: 36 cm, largura: 25 cm e comprimento: 40 cm) apresentavam paredes e pisos com texturas distintas para melhorar a percepção visual e tátil, respectivamente. Em cima do aparato foi posicionada uma câmera utilizada para registrar o tempo despendido pelos animais em cada compartimento nos dias 4 e 6 após a inoculação das células tumorais na face dos ratos. O teste foi realizado nos dias 3, 4, 5 e 6 após inoculação das células tumorais ou veículo na face dos animais, através de ensaio com dois dias de condicionamento (i.e. dia de pré-condicionamento, 2 dias de condicionamento e dia de teste). No dia do pré-condicionamento, os animais foram colocados individualmente na câmara neutra, permitindo o livre acesso em todas as câmaras do aparato por 15 minutos e foi contabilizado o tempo de permanência em cada câmara, tendo como parâmetro de exclusão tempo de permanência em uma das câmaras teste, menor que 20% ou maior que 80% do tempo total. Com a finalidade de evitar um viés para o estudo, após a contabilização do tempo de todos os animais, foi realizado um balanceamento para o condicionamento, de maneira que os grupos não tivessem diferença estatística. Nos dias de condicionamento, os animais foram tratados com o veículo pela manhã, seguido de condicionamento restrito por 30 minutos ou uma hora, na câmara definida através do balanceamento. Após o condicionamento da manhã, os animais foram alocados nas suas próprias caixas. No período da tarde, quatro horas após o condicionamento com o veículo, os animais foram tratados com a droga e após o tratamento, os animais foram submetidos a um condicionamento restrito por 30 minutos ou uma hora, na câmara oposta a câmara de condicionamento com o veículo, também definida através do balanceamento. Já no dia teste, os animais foram colocados individualmente na câmara neutra, sem qualquer tratamento, permitindo o livre acesso em todas as câmaras do aparato por 15 minutos e foi contabilizado o tempo de permanência em cada câmara, com a finalidade de avaliar a preferência condicionada ao lugar pela associação com o alívio da dor.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.6.1 Experimentos para investigar as alterações sensoriais associadas ao câncer facial

Para a determinação das alterações associadas ao câncer facial em um modelo experimental, grupos independentes de animais foram inoculados com células tumorais na face (2×10^6 células/100 μ L) ou veículo (PBS/100 μ L), e submetidos à avaliação de peso corporal, comportamento de *grooming* espontâneo e verificação da resposta frente à estimulação bilateral térmica (frio e calor) e mecânica, previamente e nos dias 2, 4 e 6 após a inoculação. Adicionalmente, foi realizada avaliação do crescimento da massa tumoral nos dias 3, 4, 5 e 6 após inoculação, além da avaliação da massa do tumor dissecado, após a eutanásia dos animais (6° dia após inoculação). Para os demais experimentos, todos os animais foram inoculados na região da face com as células tumorais ou veículo (PBS), e no sexto dia, foram realizadas avaliações do efeito dos tratamentos farmacológicos nas alterações sensoriais desenvolvidas. Vale mencionar, que para os demais experimentos relacionados à hiperalgesia ao calor e mecânica, as avaliações frente a aplicação dos estímulos foram realizadas somente ipsilateralmente à inoculação. Com a finalidade de evitar viés nesse estudo, todos os animais foram eutanasiados no 6° dia após inoculação para prevenir o aparecimento de necrose tecidual na região de inoculação e comprometer a ingestão de água e ração.

3.6.2 Avaliação do efeito do tratamento com morfina nas alterações sensoriais associadas ao câncer de face

Para avaliação do efeito do tratamento local e sistêmico com a morfina na hiperalgesia térmica, e mecânica, grupos independentes de animais foram inoculados e avaliados frente à estimulação ao frio, calor e mecânica previamente ao tratamento. Em seguida, um grupo de animais recebeu injeção local de morfina na dose de 30 μ g/50 μ L, s.c., ou veículo (salina, 50 μ L) enquanto que outro grupo foi tratado sistemicamente com morfina nas doses de 0,625 ou 2,5 mg/kg,s.c., ou veículo (salina, 1 mL/kg). A avaliação da hiperalgesia foi realizada aos 30 minutos e

em intervalos de uma hora até a quarta hora após os tratamentos. Para avaliação do efeito do tratamento local e sistêmico com a morfina no comportamento de *grooming* espontâneo, os animais foram submetidos à inoculação, e no sexto dia os animais foram avaliados por 10 minutos, 30 minutos após o tratamento com morfina local (30 µg/50 µL, s.c.), ou sistêmico (0,625 e 2,5 mg/kg, s.c.), ou com os veículos supracitados. Vale ressaltar que as doses de morfina utilizadas nesse estudo não produzem efeito sedativo (NONES et al., 2013).

3.6.3 Avaliação do efeito do bloqueio de receptores de endotelina na hiperalgesia mecânica em animais com carcinoma de face

Para a avaliação da influência do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina frente à estimulação mecânica, grupos independentes animais foram inoculados com as células tumorais ou veículo, e no sexto dia os animais foram avaliados previamente ao tratamento frente à estimulação mecânica, seguido de tratamento sistêmico com bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., ou veículo (salina, 1 mL/kg, v.o.). Medidas do limiar mecânico foram realizadas de hora em hora até a sexta hora após o tratamento. Além disso, para a determinação do efeito da combinação do tratamento sistêmico de morfina e bosetan, nas doses mais baixas, frente ao desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, os animais foram inoculados, e avaliados previamente ao tratamento frente à estimulação mecânica, seguido de tratamento sistêmico com bosentana, na dose de 100 mg/kg, v.o., ou veículo (salina, 1 mg/mL, v.o.), e 30 minutos após o tratamento, os animais receberam uma administração de morfina, na dose de 0,625 mg/kg, s.c., ou veículo (salina, 1 mg/mL, s.c.). O limiar mecânico foi avaliado aos 30 minutos, e de hora em hora até a sexta hora após o último tratamento (i.e. morfina ou veículo).

3.6.4 Avaliação do efeito do bloqueio de receptores de endotelina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face

Para a avaliação da influência do bloqueio local de receptores de endotelina na hiperalgesia térmica ao calor, os animais foram inoculados e avaliados frente à estimulação ao calor, previamente ao tratamento local com BQ-123 e BQ-788, respectivamente, na dose de 30 nmol/50 µL cada, ou BQ-123 em associação com

BQ-788, na dose de 30 nmol/30 µL cada, ou bosentana nas doses de 10 e 30 µg/50 µL, bem como, seus respectivos veículos (salina, 30 ou 50 µL). Avaliações da latência para a resposta frente à estimulação térmica foram realizadas aos 30 minutos e em intervalos de uma hora até a quarta hora após os tratamentos.

Para a avaliação da influência do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina na hiperalgesia térmica ao calor, o tumor foi induzido, e realizado avaliação frente à estimulação ao calor, previamente ao tratamento sistêmico com bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., ou veículo (salina, 1 mL/kg, v.o.). A hiperalgesia térmica foi avaliada aos 30 minutos e de hora em hora até a sexta hora após os tratamentos. Além disso, para a determinação do efeito da combinação do tratamento sistêmico de morfina e bosentana, nas doses mais baixas, na hiperalgesia térmica ao calor, as células foram inoculadas e foi realizada avaliação frente à estimulação ao calor, previamente ao tratamento sistêmico com bosentana (100 mg/kg, v.o.), ou veículo (salina, 1 mL/kg, v.o.). Decorridos 30 minutos os animais receberam morfina (0,625 mg/kg, s.c.) ou veículo (salina, 1 mL/kg, s.c.), e a latência pra resposta foi avaliada aos 30 minutos, e de hora em hora até a sexta hora após o último tratamento (i.e. morfina ou veículo).

3.6.5 Avaliação do efeito do bloqueio de receptores de endotelina no comportamento de *grooming* espontâneo em ratos com carcinoma de face

Para a determinação do papel das endotelinas frente ao comportamento de *grooming* espontâneo, os animais foram inoculados e no dia teste foram tratados localmente com BQ-123 e BQ-788, respectivamente, na dose de 30 nmol/50 µL cada, ou BQ-123 em associação com BQ-788, na dose de 30 nmol/30 µL cada, ou bosentana nas doses de 10 e 30 µg/50 µL, bem como, seus respectivos veículos (salina, 30 ou 50 µL). Trinta minutos após os tratamentos foi contabilizado por 10 minutos o tempo despendido realizando o *grooming* espontâneo.

Para avaliação da influência do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina frente ao comportamento de *grooming* espontâneo, o tumor foi induzido, e no sexto dia, os animais foram tratados sistemicamente, com bosentana (100 mg/kg, v.o.), ou veículo (salina, 1 mg/kg, v.o.), e uma hora após o tratamento, foi contabilizado por 10 minutos o tempo despendido pelo animal realizando o *grooming* espontâneo.

3.6.6 Avaliação do efeito da morfina, lidocaína e bosentana no teste de preferência condicionada ao lugar após inoculação de células tumorais na face de ratos

Para a realização do teste de CPP, os animais foram inoculados e nos dias 3, 4, 5 e 6 após a inoculação foram realizadas as etapas do paradigma de CPP definidas como pré-condicionamento, 2 dias de condicionamento e teste, respectivamente. Para a avaliação do efeito do tratamento local com morfina, lidocaína e bosentana no CPP, os animais foram submetidos à inoculação, e nos 2 dias de condicionamento desse protocolo, dias 4 e 5 após inoculação, os animais foram tratados pela manhã na região direita do lábio superior, com veículo (salina, 50 µL, s.c.), e imediatamente após, submetidos a um condicionamento restrito por 30 minutos. No período da tarde (4 horas após o condicionamento com o veículo), os animais foram tratados localmente com morfina (30 µg/50 µL, s.c.), lidocaína (4%/50 µL, s.c.), ambos utilizados como controle positivo do teste, ou bosentana (30 µg/50 µL, s.c.), e imediatamente após, submetidos a um condicionamento restrito por 30 minutos, na câmara oposta a câmara de condicionamento com o veículo.

Por fim, para a avaliação do efeito do tratamento sistêmico com morfina e bosentana frente ao paradigma de CPP, os animais foram submetidos à inoculação, e nos 2 dias de condicionamento, foram tratados pela manhã, com veículo (salina, 1 mL/kg, s.c. ou v.o.), e após os tratamentos, os animais foram submetidos a um condicionamento restrito. No período da tarde, os animais foram tratados com morfina (2,5 mg/kg, s.c.), ou bosentana (100 mg/kg, v.o.), e após os tratamentos, os animais foram submetidos a um condicionamento restrito por uma hora, na câmara oposta a câmara de condicionamento com o veículo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos testes de estimulação térmica, mecânica e *grooming* espontâneo foram verificados por análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) seguida por teste *post-hoc* de *Tukey* para comparação entre grupos, com a condição (tumor ou sham) e/ou tratamento e/ou tempo como fatores independentes. Para as análises de correlação entre volume tumoral e hiperalgesia ao calor, após análise da distribuição normal dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, foi realizada análise de correlação de Pearson. Para avaliação da área sobre a curva

(AUC e AOC) dos resultados obtidos nos testes de estimulação térmica e mecânica foi realizada análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de teste *post-hoc* de *Tukey* para avaliar as diferenças entre grupos. Para a análise dos dados do teste de CPP, os efeitos do tratamento sobre o os animais inoculados com tumor ou veículo bem como, condicionamento nas respectivas câmaras, foram analisados por análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de *Tukey* entre os valores do pré-condicionamento versus valores do pós-condicionamento. Análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) sobre a diferença de pontuação do tempo gasto na câmara pareada com a droga no dia teste entre a pontuação do tempo gasto na câmara pareada com a droga na medida basal foi aplicada para avaliação de diferença entre os grupos. Todos os dados foram analisados com o *software* GraphPad Prism 6 e foram expressos como média \pm S.E.M. com um nível de probabilidade (P) inferior a 0,05 utilizado para considerar os resultados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ASSOCIADAS AO CÂNCER FACIAL APÓS A INOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NA FACE DE RATOS

A indução experimental de câncer facial através da inoculação de uma suspensão de 2×10^6 células tumorais de Walker-256 em 100 μ L na região direita da face dos animais promoveu diversas alterações morfológicas e sensoriais associadas a essa condição. A inoculação facial de células tumorais induziu um crescimento tempo-dependente da massa tumoral, com um aumento significativo observado a partir do dia 3 após a indução do tumor até o sexto dia (Figura 3A). Esse período de avaliação de 6 dias, foi definido de acordo com um estudo piloto de avaliação física dos animais, realizado no laboratório, no qual os mesmos, demonstraram-se incapazes de se alimentar, além da presença de sinais de necrose na região do tumor, após o sexto dia de inoculação tumoral na face dos ratos. Por outro lado, a inoculação tumoral não promoveu alteração de peso dos animais inoculados comparados com os animais controle, i.e. sham, inoculados com veículo (PBS), durante todo o período de avaliação (Figura 3B). Adicionalmente, a inoculação tumoral não promoveu alteração na ingestão de água e ração dos animais inoculados comparados com os animais controle até o sexto dia de avaliação (dados não mostrados).

A inoculação de células de carcinoma induziu o aumento do *grooming* facial espontâneo, alteração sugestiva de comportamento nociceptivo espontâneo. Esse comportamento foi avaliado no dia 0 (i.e. antes da inoculação), e nos dias 2, 4 e 6 após inoculação facial, sendo que diferença significativa entre os animais inoculados com as células de câncer e animais sham (inoculados com veículo), foi observada apenas no dia 6 após a inoculação (Figura 4A).

A indução do tumor também promoveu o desenvolvimento tempo-dependente de hiperalgesia mecânica em ambos os lados da face dos animais, observado pela diminuição do limiar mecânico, que se mostrou significativo a partir do dia 4, persistindo até o dia 6 após a inoculação (Figura 4B).

Outra alteração sensorial associada ao tumor foi o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor, observado pela diminuição da latência para a resposta, que foi significativa a partir do dia 4, persistindo até o dia 6 após a inoculação (Figura 4C).

De maneira análoga, a aplicação ipsilateral e contralateral à inoculação, do estímulo frio, antes e nos dias 2, 4 e 6 após a promoção do tumor, induziu o desenvolvimento da hiperalgesia ao frio, observado pelo aumento no comportamento de *grooming* facial, que foi significativo no dia 6 após a inoculação (Figura 4D).

É importante ressaltar que animais do grupo sham não apresentaram alterações significativas em nenhuma das respostas comportamentais avaliadas (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D). Assim, com os resultados descritos acima, foi estabelecido o dia 6 após inoculação das células tumorais na face de ratos como o pico do comportamento de *grooming* espontâneo, hiperalgesia mecânica e térmica (ao calor e frio) (Figura 4).

Volume tumoral e peso corporal

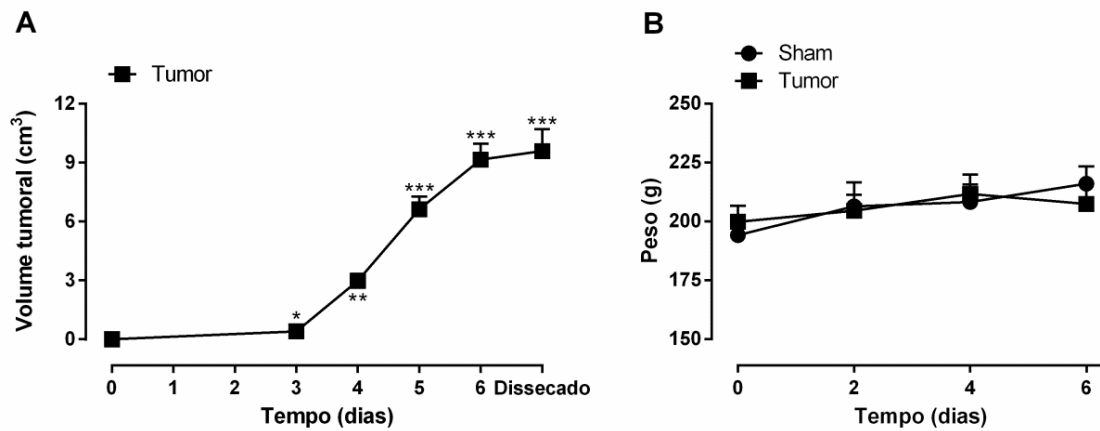


FIGURA 3 - Decurso temporal do crescimento tumoral e do peso de ratos submetidos à inoculação de células tumorais na face. O volume tumoral dos animais inoculados com as células de carcinoma foi mensurado para a avaliação do crescimento do tumor antes (dia 0) e nos dias 3, 4, 5 e 6 após a inoculação, além do tumor dissecado, no dia 6, após a eutanásia dos animais (Painel A). A avaliação de peso dos animais inoculados com as células tumorais ou com veículo (sham) foi realizada antes (dia 0) e nos dias 2, 4 e 6 após a inoculação (Painel B). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-14 animais. No painel A, *, ** e *** indicam $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, versus dia 0 (ANOVA de uma via de medidas repetidas seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para a avaliação do decurso temporal do volume tumoral, e ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para a avaliação do decurso temporal de peso).

Alterações sensoriais

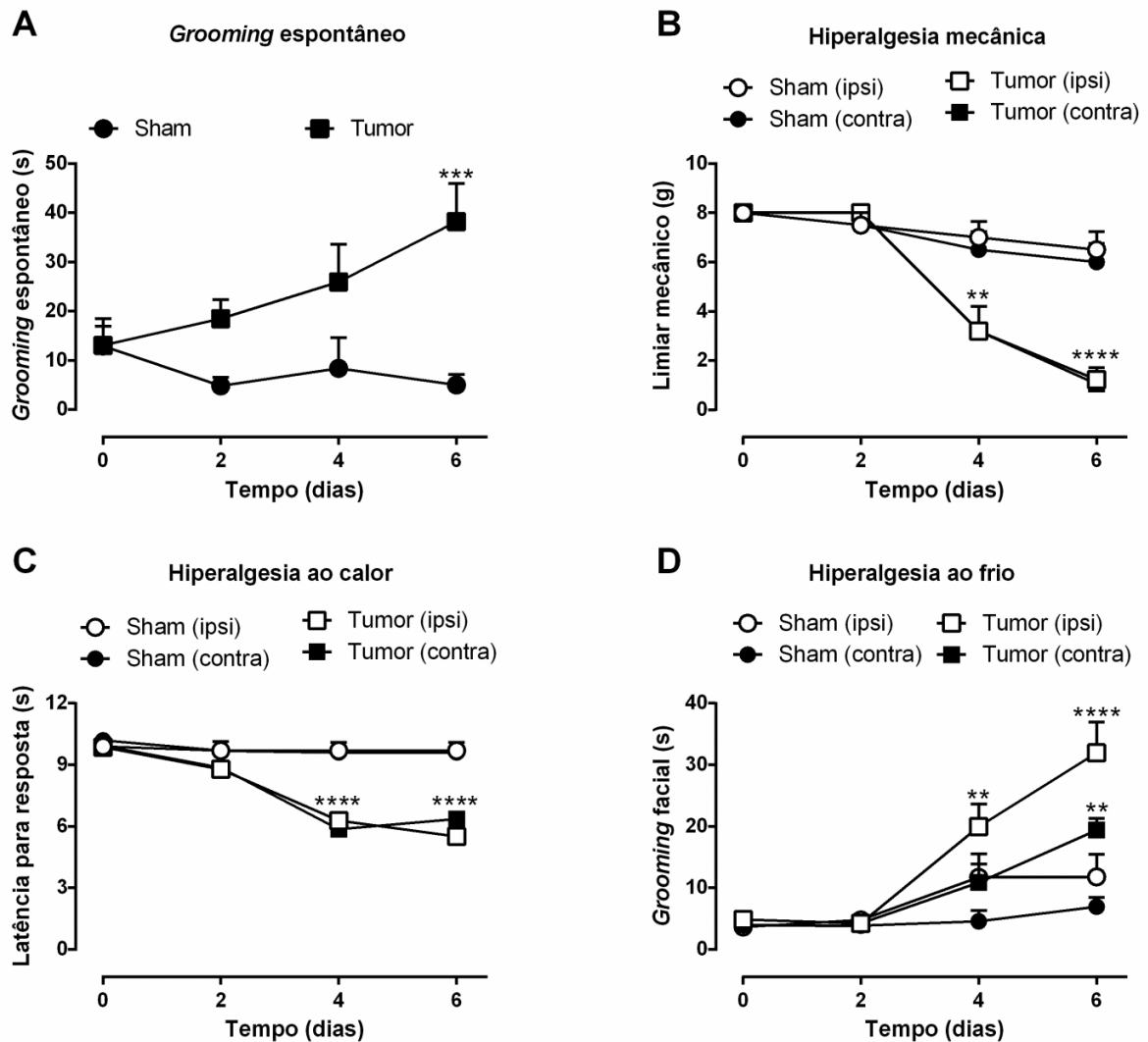


FIGURA 4 - Decurso temporal das alterações sensoriais em animais submetidos à inoculação de células tumorais na face. A avaliação da resposta espontânea bem como, frente à estimulação térmica (calor e frio) e mecânica de animais inoculados com as células tumorais ou com veículo (sham) foram realizadas antes (dia 0) e nos dias 2, 4 e 6 após a inoculação. Decurso temporal da avaliação do *grooming* espontâneo para a verificação do desenvolvimento de comportamento sugestivo de nocicepção espontânea (Painel A). Decurso temporal da avaliação do limiar mecânico, frente à aplicação, ipsilateral (ipsi) e contralateral (contra) à inoculação, dos filamentos de Von Frey, para a verificação do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (Painel B). Decurso temporal da avaliação da latência para resposta, após a aplicação, ipsi- e contralateral à inoculação, de uma fonte de calor radiante, para a observação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor (Painel C). Decurso temporal da avaliação do *grooming* facial, após a aplicação, ipsi- e contralateral à inoculação, do spray de tetrafluoretano, para a verificação do desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio (Painel D). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8-14 animais. Nos painéis A, B, C e D, **, *** e **** indicam $P < 0,01$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente, versus grupo sham (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Sidak, para a avaliação do decurso temporal do desenvolvimento de *grooming* espontâneo e ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para a avaliação do decurso temporal de desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica).

4.2 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO TUMORAL E DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR

Para avaliação de uma possível relação entre o crescimento tumoral e o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor, foi realizada a análise de correlação de Pearson entre essas duas alterações após a inoculação de células tumorais na face de ratos.

Após a inoculação tumoral, pode-se observar que a média da latência para a resposta diminui significativamente à medida que o volume tumoral aumenta. A análise de correlação de Pearson envolvendo os dias avaliados (3, 4, 5 e 6 após inoculação) revelou um valor de r^2 de 0.92, indicando uma correlação entre crescimento tumoral e desenvolvimento de hiperalgesia térmica (Figura 5).

Contudo, a análise de Pearson entre o volume tumoral e a intensidade de hiperalgesia térmica avaliada em cada um dos dias após inoculação não revelou correlação positiva entre esses dois parâmetros (Figura 6).

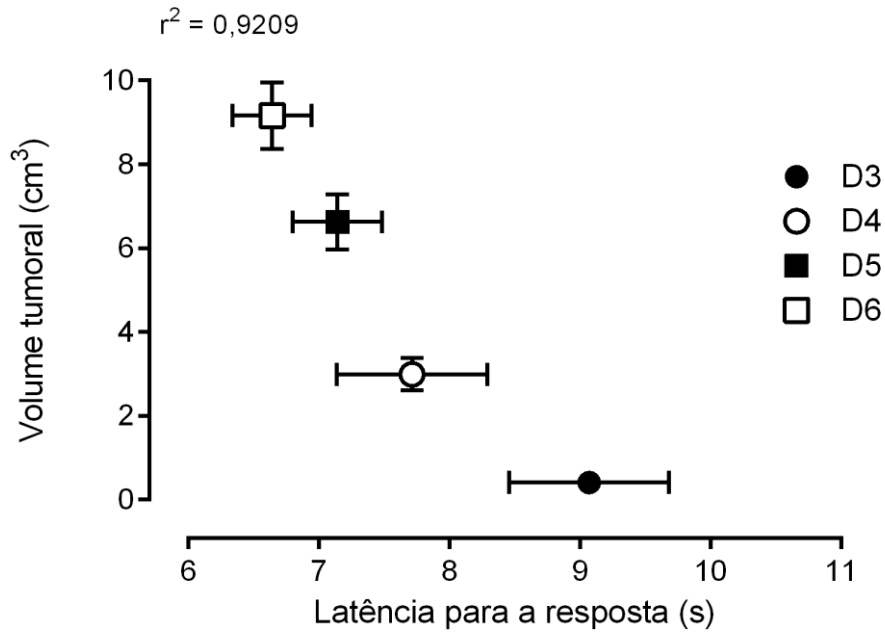
Relação entre desenvolvimento da hiperalgesia ao calor e progressão tumoral

FIGURA 5 - Relação entre desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor e progressão tumoral. O volume tumoral e a latência para a resposta dos animais inoculados com as células tumorais foram avaliados nos dias 3, 4, 5 e 6. Os valores para a correlação foram plotados como a média do volume tumoral e a média da latência para a resposta de cada dia de avaliação. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7 animais, para cada dia de avaliação (Análise de correlação de Pearson).

Relação entre volume tumoral e hiperalgesia ao calor

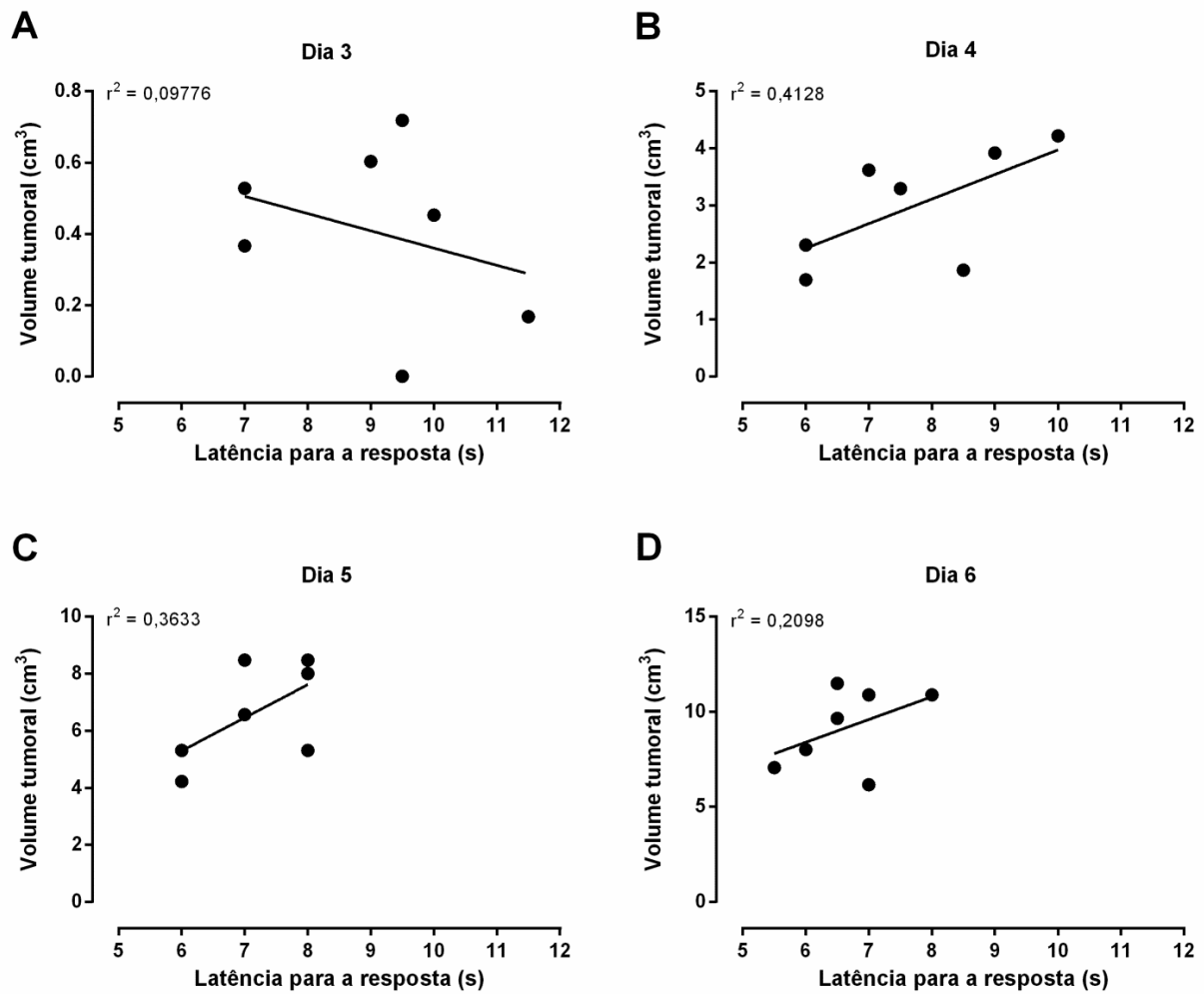


FIGURA 6 - Relação entre volume tumoral e hiperalgesia térmica ao calor em diferentes períodos após inoculação de células tumorais na face. O volume tumoral e a latência para a resposta dos animais inoculados com as células tumorais foram avaliados nos dias 3, 4, 5 e 6. Os painéis A, B, C e D mostram a correlação entre volume tumoral e a latência para a resposta nos dias 3, 4, 5 e 6, respectivamente, após inoculação. Os valores representam o volume tumoral e latência para a resposta de cada animal, n=7 animais (Análise de correlação de Pearson).

4.3 EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS ASSOCIADAS AO CÂNCER FACIAL

O tratamento local com morfina na dose de 30 µg/50 µL reduziu o comportamento de *grooming* espontâneo, em animais com carcinoma facial, no sexto dia de indução tumoral, quando comparado aos animais tratados com veículo (Figura 7A). O tratamento sistêmico com morfina nas doses de 0,625 mg/kg não modificou o comportamento de *grooming*, mas na dose de 2,5 mg/kg reduziu de esse comportamento em relação aos animais do grupo controle (Figura 7B).

O tratamento local com morfina na dose de 30 µg/50 µL, s.c., não modificou o limiar mecânico de animais com carcinoma de face ou de animais inoculados com veículo (Figura 8A). Já o tratamento sistêmico com morfina na maior dose (2,5 mg/kg, s.c.) reduziu a hiperalgesia mecânica, 30 minutos após o tratamento, em animais inoculados com células tumorais na face em comparação aos animais tratados com veículo (Figura 8C).

Na hiperalgesia ao frio associada ao tumor, o tratamento local com morfina (30 µg/50 µL, s.c.), promoveu a redução do comportamento de *grooming* evocado apenas 30 minutos após o tratamento (Figura 9A). Já o tratamento sistêmico com morfina na dose de 2,5 mg/kg, s.c., aboliu a hiperalgesia ao frio, 30 minutos e uma hora após o tratamento, em animais inoculados com células tumorais na face em comparação aos animais tratados com veículo (Figura 9C).

Na hiperalgesia térmica ao calor, o tratamento local com morfina (30 µg/50 µL), promoveu aumento significativo da latência de resposta a partir de 30 minutos até 2 horas após o tratamento (Figura 10A). Por fim, o tratamento sistêmico com morfina nas doses de 0,625 e 2,5 mg/kg, s.c., reduziu a hiperalgesia ao calor, 30 minutos e uma hora após o tratamento, em animais inoculados com células tumorais na face em comparação aos animais tratados com veículo (Figura 10C).

É importante ressaltar que animais do grupo sham não apresentaram alterações significativas em nenhuma das respostas comportamentais avaliadas (Figuras 7A, 7B, 8A, 8C, 9A, 9C, 10A, 10C).

Os dados das respostas comportamentais utilizados na avaliação do efeito da morfina nas alterações sensoriais associadas ao câncer de face também foram representados através da área sob a curva (Figura 8B, 8D, 9B, 9D, 10B e 10D).

Adicionalmente, pode ser observado um sumário na forma de esquema

(ESQUEMA 3) na conclusão desta tese (item 6), resumindo o efeito dos diferentes tratamentos utilizados neste estudo sobre as condições de hiperalgesia térmica e mecânica, *grooming* espontâneo, bem como CPP.

Grooming espontâneo

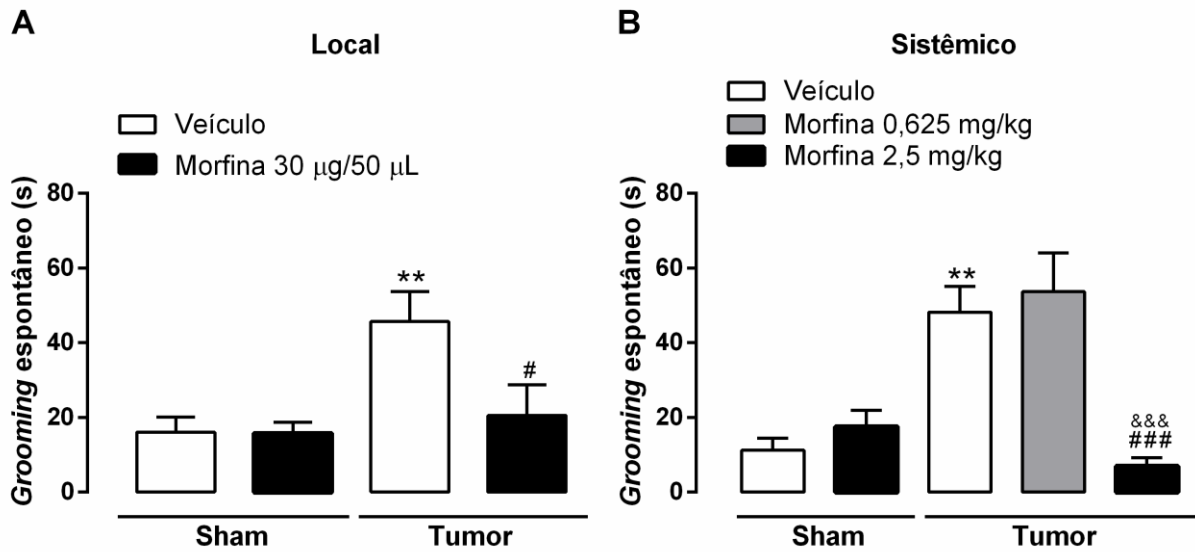


FIGURA 7 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina no comportamento de *grooming* espontâneo em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente com morfina na dose de 30 µg/50 µL, s.c. (Painel A), e sistemicamente nas doses de 0,625 e 2,5 mg/kg, s.c. (Painel B), ou com os respectivos veículos. Decorridos 30 minutos dos tratamentos, o comportamento *grooming* espontâneo foi avaliado durante 10 minutos. Os valores representam a média ± e.p.m. de 10-14 animais. Nos painéis A e B, **, #, ### e &&& indicam P<0,01; P<0,05; P<0,01 e P<0,001, respectivamente, versus grupo sham-veículo, tumor-veículo e tumor-morfina 0,625 mg/kg (ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey).

Hiperalgisia mecânica

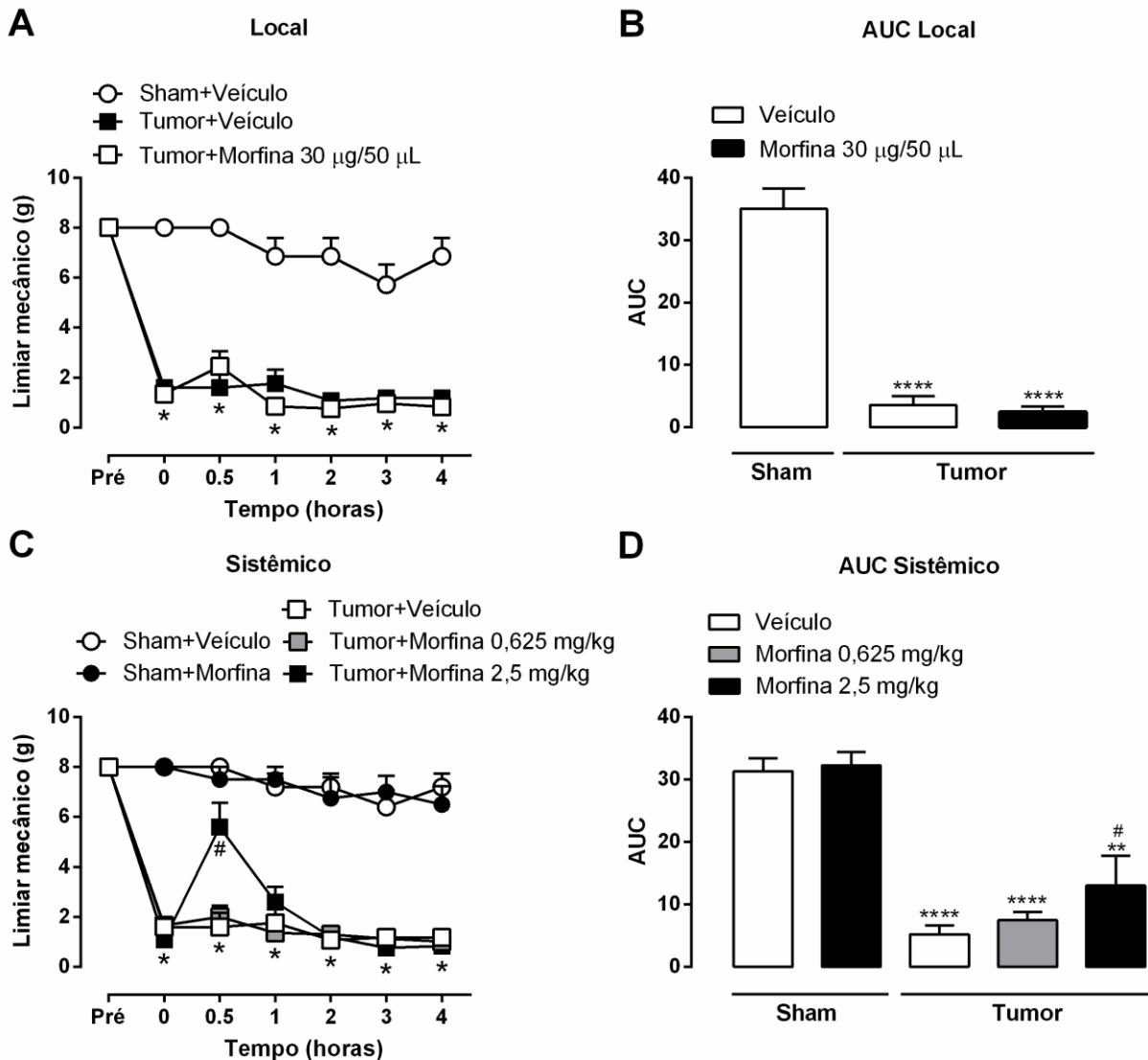


FIGURA 8 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgisia mecânica em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente (Painel A) com morfina, na dose de 30 µg/50 µL, s.c., ou sistemicamente (Painel C), nas doses de 0,625 e 2,5 mg/kg, s.c., ou respectivos veículos, seguido de avaliação do limiar mecânico. Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento local (Painel B) ou sistêmico (Painel D) com morfina, frente à hiperalgisia mecânica dos animais com tumor tratados com veículo ou morfina. Os valores representam a média ± e.p.m. de 8-10 animais. Nos painéis A e C, * e # indicam $P < 0,05$ versus grupos sham- e tumor-veículo, respectivamente. Nos painéis B e D, **, **** e # indicam $P < 0,01$; $P < 0,0001$ e $P < 0,05$ versus sham e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

Hiperalgesia ao frio

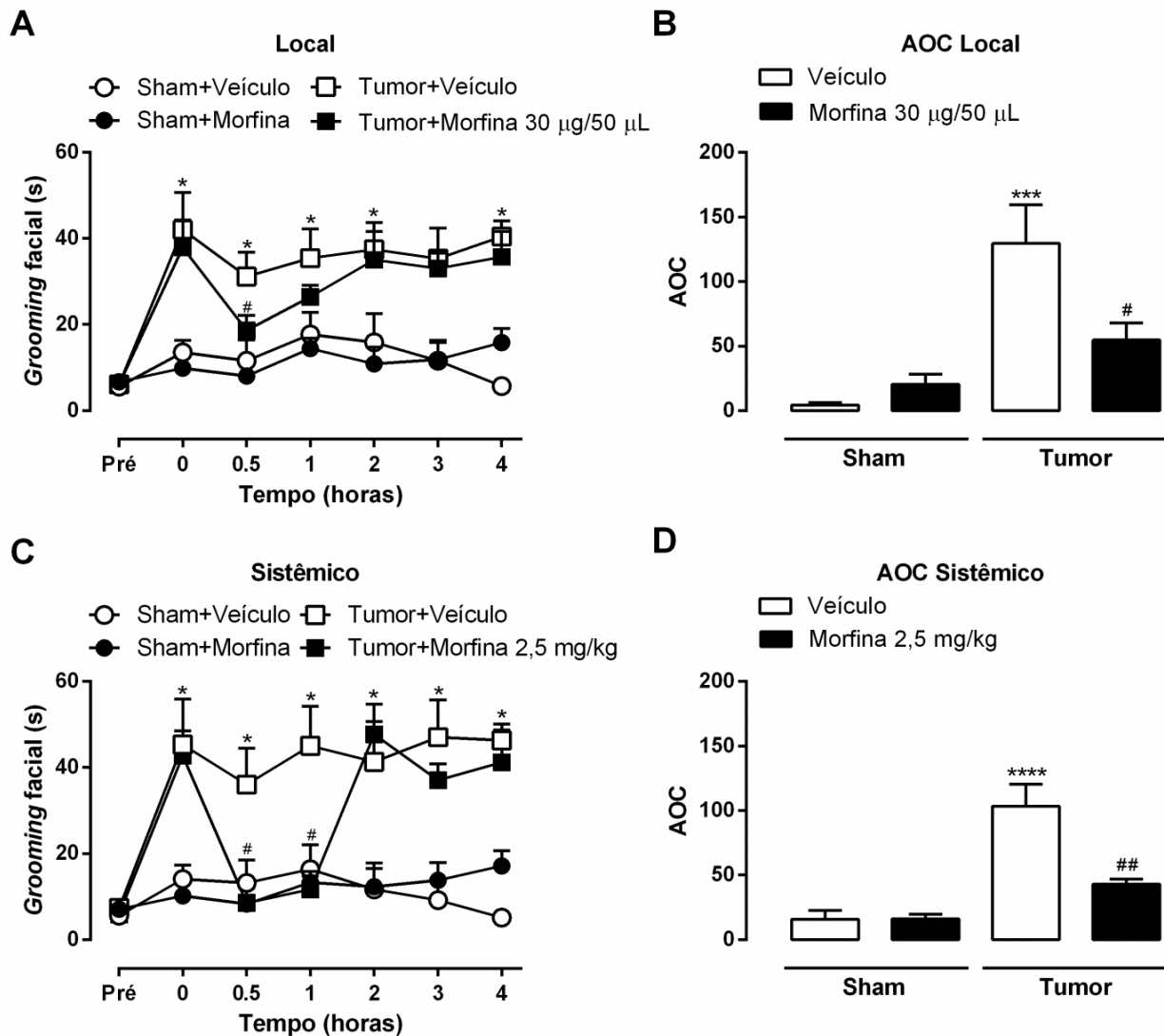


FIGURA 9 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperalgesia térmica ao frio em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente (Painel A) com morfina, na dose de 30 µg/50 µL, s.c., ou sistemicamente (Painel C) com morfina, na dose de 2,5 mg/kg, s.c., ou respectivos veículo, seguido de avaliação do comportamento de *grooming* facial após a estimulação térmica. Representação da área sobre a curva (AOC) do decurso temporal do efeito do tratamento local (Painel B) ou sistêmico (Painel D), com morfina frente à hiperalgesia ao frio dos animais com tumor tratados com veículo ou morfina. Os valores representam a média ± e.p.m. de 6-7 animais. Nos painéis A e C, * e # indicam $P < 0,05$ versus grupos sham- e tumor-veículo, respectivamente. Nos painéis B e D, ***, **** e #, ## indicam $P < 0,001$; $P < 0,0001$; $P < 0,05$ e $P < 0,01$ versus sham e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

Hiperálgia ao calor

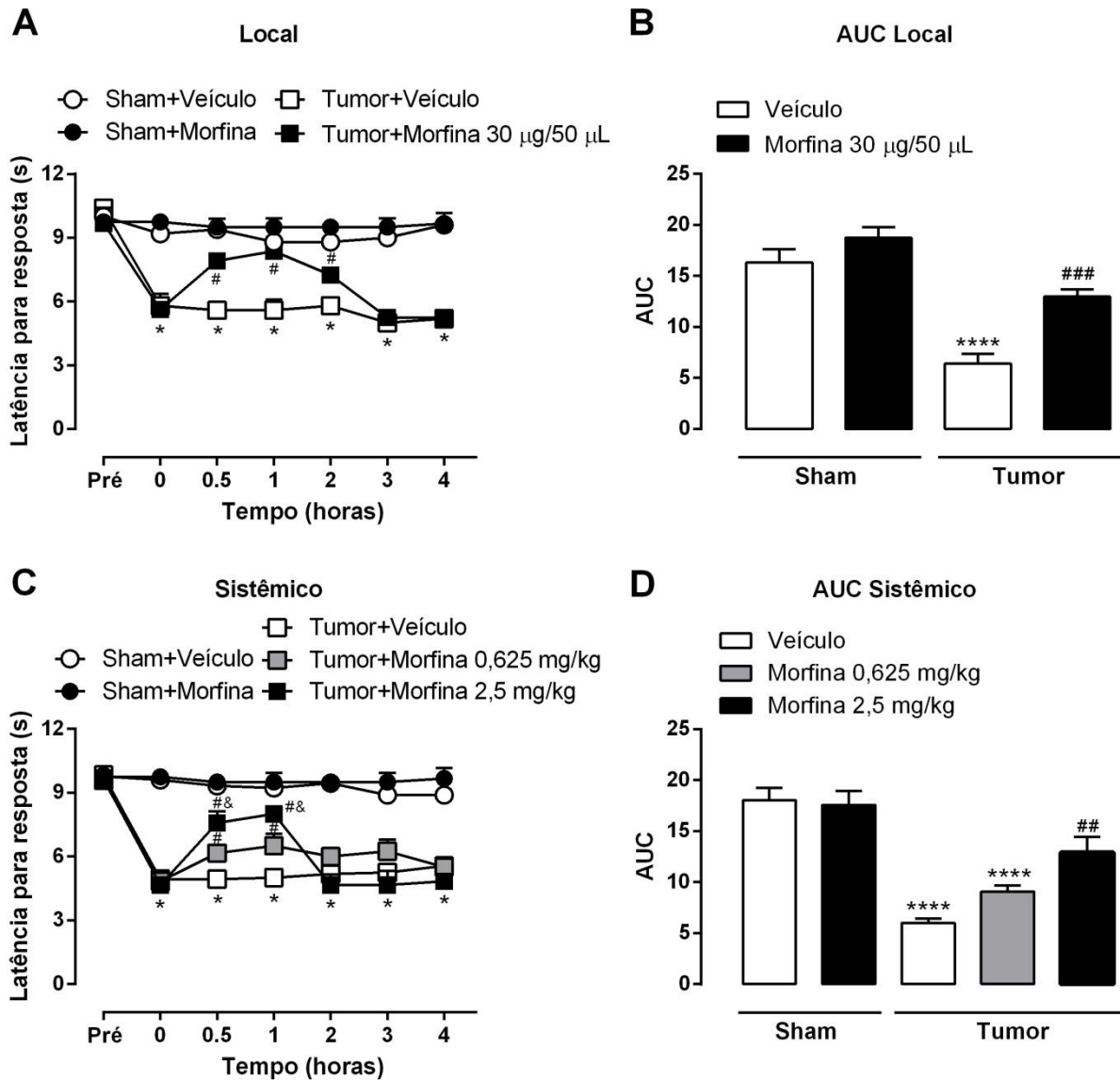


FIGURA 10 - Efeito do tratamento local e sistêmico com morfina na hiperálgia térmica ao calor em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente (Painel A) com morfina, na dose de 30 μg/50 μL, s.c., ou sistemicamente (Painel C), nas doses de 0,625 e 2,5 mg/kg, s.c., ou veículo, seguido de avaliação da latência para resposta após a estimulação térmica. Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento local (Painel B) ou sistêmico (Painel D) com morfina, frente à hiperálgia ao calor dos animais com tumor tratados com veículo e morfina (Painel D). Os valores representam a média ± e.p.m. de 6-10 animais. Nos painéis A e C, *, # e & indicam P<0,05 versus grupos sham-veículo, tumor-veículo e tumor-morfina 0,625, respectivamente. Nos painéis B e D, **** e ##, ### indicam P<0,0001; P<0,01 e P<0,001 versus sham e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NA HIPERALGESIA MECÂNICA EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

Uma única administração sistêmica do antagonista não seletivo de receptores de endotelina ET_A e ET_B, bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., no dia 6 após a inoculação das células tumorais, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo experimental, em nenhum período avaliado após o tratamento (Figura 11A). Os dados representados através da área sob a curva confirmam a falha do tratamento sistêmico com bosentana na redução da hiperalgesia mecânica (Figura 11B).

Por outro lado, no dia 6 após inoculação das células tumorais, a administração de bosentana na dose de 100 mg/kg, v.o., em combinação com a administração de morfina na dose de 0,625 mg/kg, s.c., ambos em doses ineficazes quando administrados individualmente, promoveu um efeito analgésico sinérgico, reduzindo a hiperalgesia mecânica, 30 minutos e uma hora após a combinação do tratamento de animais inoculados com as células tumorais na face, em comparação ao grupo controle. Os animais do grupo sham não demonstraram alterações de resposta frente à estimulação mecânica durante todo o período de avaliação (Figura 12A). Os dados representados através da área sob a curva confirmam o efeito analgésico sinérgico do tratamento sistêmico com bosentana em combinação com morfina na redução da hiperalgesia mecânica (Figura 12B).

Hiperálgia mecânica

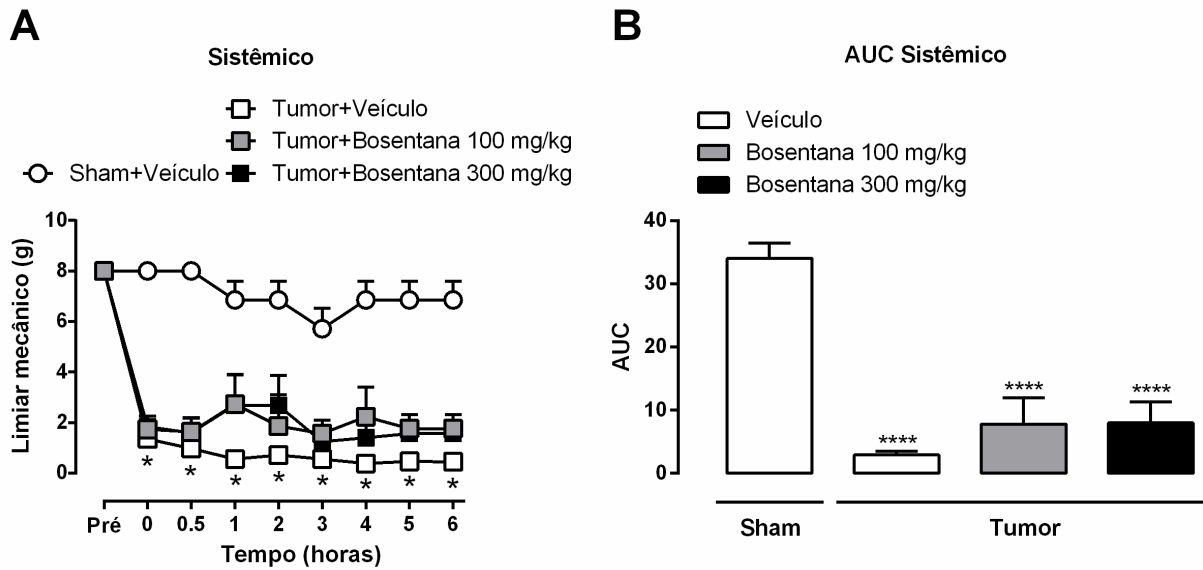


FIGURA 11 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina na hiperálgia mecânica em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados sistemicamente com bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., ou veículo, seguido de avaliação do limiar mecânico (Painel A). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento sistêmico com bosentana frente à hiperálgia mecânica dos animais com tumor tratados com veículo ou bosentana (Painel B). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6-7 animais. No painel A, * indica $P < 0,05$ versus grupo sham-veículo. No painel B, **** indica $P < 0,0001$ versus sham-veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

Hiperalgisia mecânica

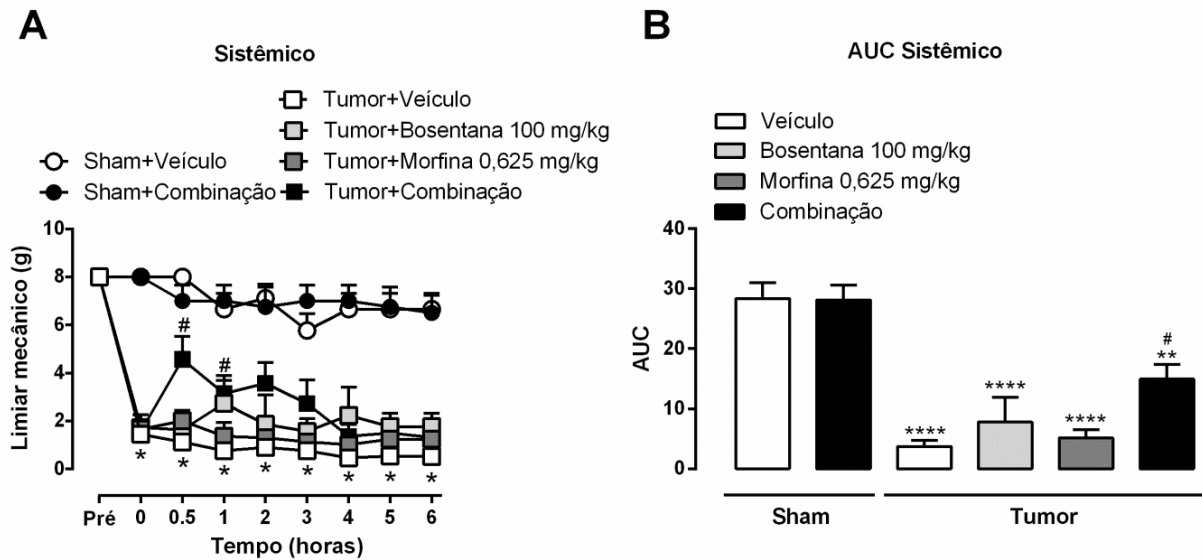


FIGURA 12 - Efeito do tratamento sistêmico com bosentana em combinação com morfina na hiperalgisia mecânica em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados sistemicamente com bosentana, nas doses de 100 mg/kg, v.o., ou veículo, e 30 minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção de morfina, na dose de 0,625 mg/kg, s.c., seguido de avaliação do limiar mecânico (Painel A). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento sistêmico com bosentana em combinação com morfina frente à hiperalgisia mecânica dos animais com tumor tratados com veículo, bosentana, morfina ou combinação (Painel B). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6-8 animais. No painel A, * e # indicam $P < 0,05$ versus grupos sham- e tumor veículo, respectivamente. No painel B, * indica $P < 0,05$ versus grupo tumor-veículo (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

O tratamento local BQ-123 e BQ-788 na dose de 30 nmol/50 µL, s.c., cada, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia ao calor nos animais com carcinoma de face, em nenhum período avaliado após o tratamento (Figura 13A). Adicionalmente, a associação de BQ-123 e BQ-788 (30 nmol/30 µL, s.c., cada) administrada no lábio superior, também não foi capaz de promover alteração da hiperalgesia ao calor dos animais inoculados (Figura 13A). Por outro lado, o tratamento local, no dia 6 após inoculação, com bosentana, nas doses de 10 e 30 µg/50 µL foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor em animais com tumor, 30 minutos e uma hora após o tratamento, em comparação com o grupo controle (Figura 13C).

Uma única administração sistêmica de bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., no dia 6 após inoculação, foi capaz de promover a redução da hiperalgesia ao calor induzida pelo modelo experimental, apenas na maior dose, da primeira a quinta hora após o tratamento, em comparação aos animais inoculados com células tumorais tratados com veículo (Figura 14A). Além disso, o tratamento sistêmico repetido com bosentana, na dose de 100 mg/kg, v.o., diário, do dia 0 (pré-inoculação) até o sexto dia após inoculação, avaliado nos dias pré e nos dias 2, 4 e 6 após inoculação, não promoveu alterações de resposta frente à estimulação térmica durante todo período de avaliação (dados não mostrados).

Adicionalmente, a administração de bosentana (100 mg/kg), em combinação com a administração de morfina (0,625 mg/kg) promoveu um efeito analgésico sinérgico, reduzindo a hiperalgesia ao calor de 30 minutos até duas horas após o tratamento (Figura 15A).

É importante ressaltar que animais do grupo sham não apresentaram alterações significativas em nenhuma das respostas comportamentais avaliadas (Figuras 13A, 13C, 14A e 15A).

Os dados das respostas comportamentais utilizado na avaliação do efeito do bloqueio de receptores de endotelina nas alterações sensoriais associadas ao câncer de face também foram representados através da área sob a curva (Figura 13B, 13D, 14B, 15B).

Hiperálgia ao calor

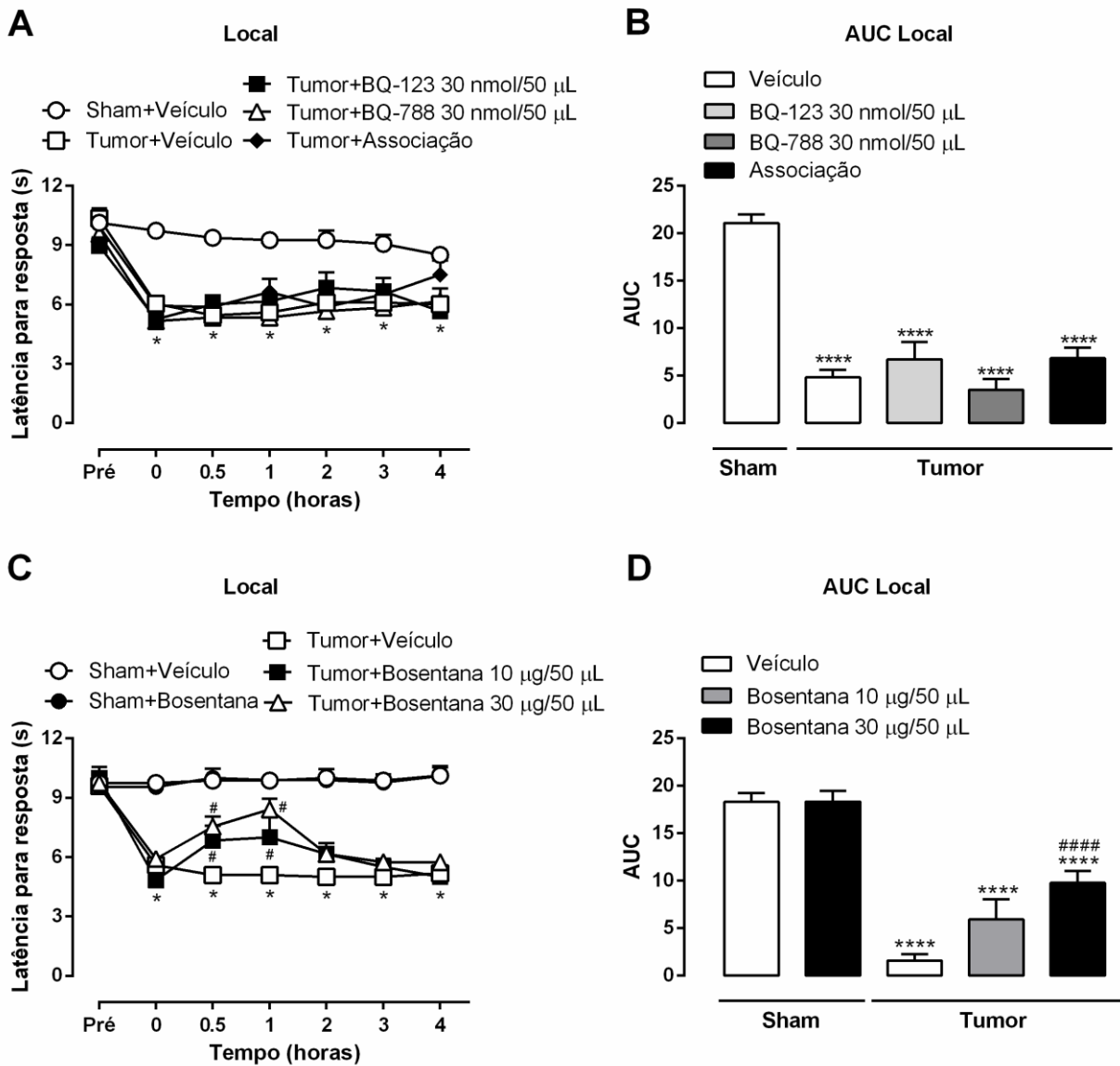


FIGURA 13 - Efeito do bloqueio local de receptores de endotelina na hiperálgia térmica ao calor em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente com BQ-123, BQ7-788, na dose de 30 nmol/50 µL, s.c., cada, ou associação de BQ-123 e BQ-788, na dose de 30 nmol/30 µL, s.c., cada, ou veículo, seguido de avaliação da latência para resposta (Painel A). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento local com os BQs frente à hiperálgia ao calor dos animais com tumor tratados com veículo, BQs ou a associação (Painel B). No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente com bosentana, nas doses de 10 e 30 µg/50 µL, s.c., ou veículo, seguido de avaliação da latência para resposta (Painel C). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento local com bosentana frente à hiperálgia ao calor dos animais com tumor tratados com veículo ou bosentana (Painel D). Os valores representam a média ± e.p.m. de 8-10 animais. Nos painéis A e C, * e # indicam $P < 0,05$ versus grupos sham- e tumor-veículo, respectivamente. Nos painéis B e D, **** e ##### indicam $P < 0,0001$ versus Sham e Tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

Hiperálgia ao calor

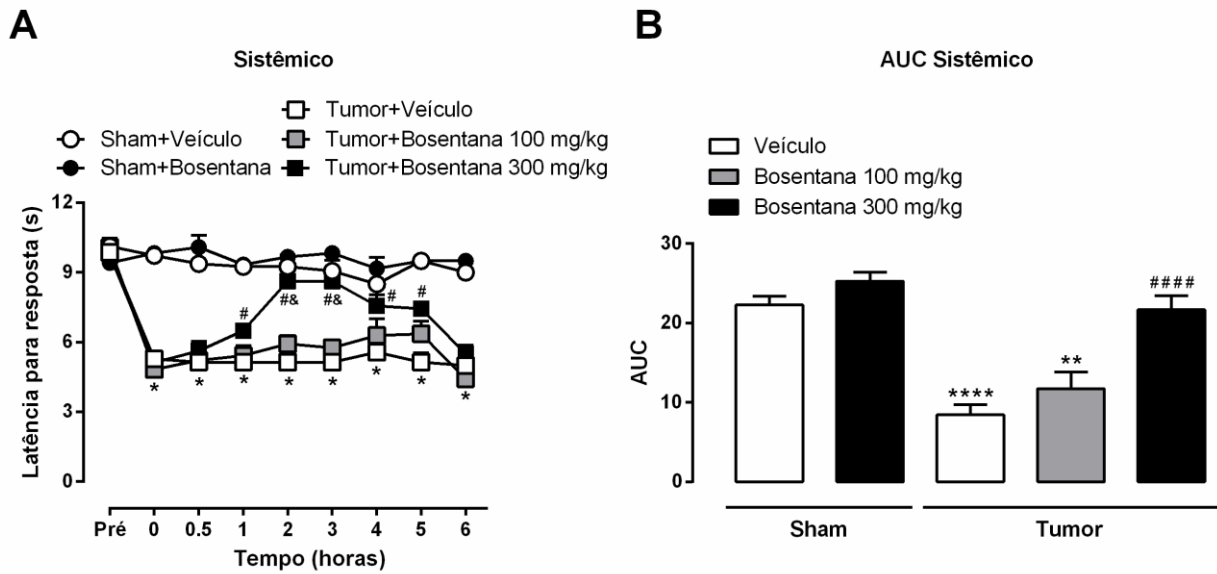


FIGURA 14 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina na hiperálgia térmica ao calor em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados sistemicamente com bosentana, nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., ou veículo, seguido de avaliação da latência para resposta (Painel A). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento sistêmico com bosentana frente à hiperálgia ao calor dos animais com tumor tratados com veículo ou bosentana (Painel B). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-8 animais. No painel A, *, # e & indicam $P < 0,05$ versus grupos sham-veículo, tumor-veículo e tumor-bosentana 100, respectivamente. No painel B, **, **** e ##### indicam $P < 0,01$; $P < 0,0001$ versus Sham e Tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

Hiperalgesia ao calor

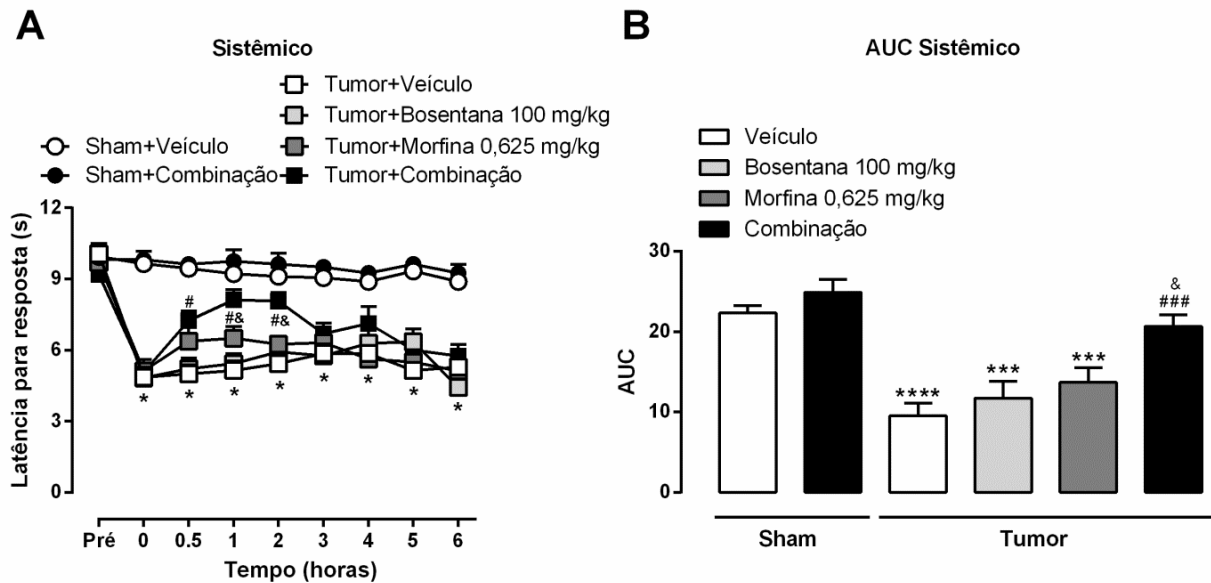


FIGURA 15 - Efeito do tratamento sistêmico com a bosentana em combinação com morfina na hiperalgesia térmica ao calor em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados sistemicamente com bosentana, na dose de 100 mg/kg, v.o., e 30 minutos após o tratamento, os animais receberam uma injeção de morfina, na dose de 0,625 mg/kg, s.c., seguido de avaliação da latência para resposta (Painel A). Representação da área sobre a curva (AUC) do decurso temporal do efeito do tratamento sistêmico com bosentana em combinação com morfina frente à hiperalgesia ao calor dos animais com tumor tratados com veículo, bosentana, morfina ou combinação (Painel B). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-9 animais. No painel A, *, # e & indicam $P < 0,05$ versus grupos sham-veículo, tumor-veículo e tumor -bosentana ou -morfina respectivamente. No painel B, ***, ****, ### e & indicam $P < 0,001$; $P < 0,0001$, $P < 0,001$ e $P < 0,05$ versus Sham, Tumor-veículo, Tumor-tratamento individual respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados do decurso temporal e ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey, para avaliação dos resultados da área sob a curva).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* ESPONTÂNEO EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

O tratamento local com BQ-123 ou BQ-788, no dia 6 após indução do tumor, não foi capaz de promover a redução do comportamento de *grooming* espontâneo nos animais com carcinoma de face, em nenhum período avaliado após o tratamento (Figura 16A). Adicionalmente, a administração local de BQ-123 associado à BQ-788 também não alterou o tempo de *grooming* espontâneo dos animais (Figura 16A).

Por outro lado, o tratamento local com bosentana (30 µg/50 µL) no dia 6 após inoculação, foi capaz de reduzir o comportamento de *grooming* espontâneo em animais com tumor, em comparação com o grupo controle. Efeito semelhante foi obtido com a injeção do anestésico local lidocaína (4% em 50 µL) no lábio superior dos animais (Figura 16B).

Adicionalmente, uma única administração sistêmica de bosentana (100 mg/kg), no dia 6 após inoculação, reduziu o comportamento de *grooming* espontâneo uma hora após o tratamento (Figura 17).

Os animais do grupo sham não demonstraram alterações de resposta frente ao *grooming* espontâneo durante todos os períodos de avaliação (Figura 16A, 16B e 17).

Grooming espontâneo

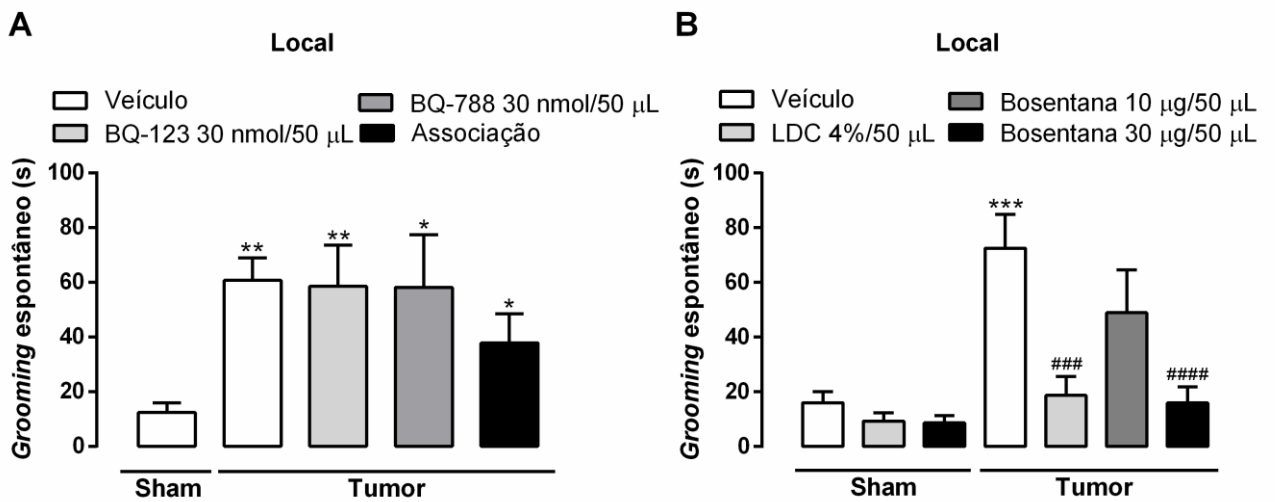


FIGURA 16 - Efeito do bloqueio local de receptores de endotelina no comportamento de *grooming* espontâneo em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente com BQ-123, BQ7-788, na dose de 30 nmol/50 µL, s.c., cada, ou associação de BQ-123 e BQ-788, na dose de 30 nmol/30 µL, s.c., cada, ou veículo, seguido de avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo (Painel A). No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados localmente com bosentana, nas doses de 10 e 30 µg/50 µL, s.c., ou lidocaína 4%/50 µL, ou veículo, seguido de avaliação do comportamento de nocicepção espontânea (Painel B). Os valores representam a média ± e.p.m. de 11-16 animais. No painel A, * e ** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, versus grupo sham-veículo. No painel B, ***, ### e #### indicam $P < 0,001$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, versus sham e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey).

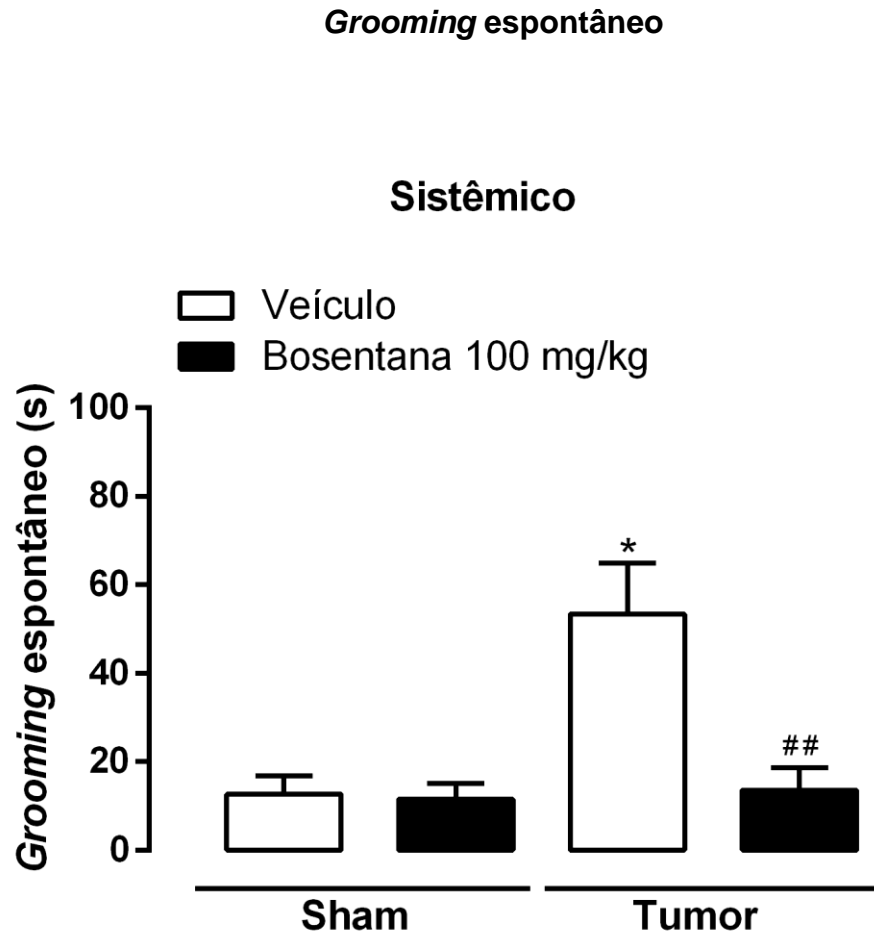


FIGURA 17 - Efeito do bloqueio sistêmico de receptores de endotelina no comportamento de *grooming* espontâneo em animais com carcinoma de face. No dia 6 após a inoculação, os animais foram tratados sistemicamente com bosentana, na dose de 100 mg/kg, v.o., seguido de avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-10 animais. * e ## indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, versus grupo sham- e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Tukey).

4.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM MORFINA E DO BLOQUEIO DE RECEPTORES DE ENDOTELINA NO TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

O tratamento local com bosentana e morfina, na dose de 30 µg/50 µL, cada e lidocaína 4%/50 µL, nos dias 4 e 5 após inoculação (dias de condicionamento), não induziu preferência condicionada de lugar (CPP) em ratos com carcinoma de face (Figura 18A). Análise de diferenças entre os grupos de tratamento do tempo gasto na câmara pareada com a droga no dia teste e no dia do pré-teste (basal) confirmou a falha do tratamento local na produção de preferência condicionada ao lugar (Figura 18B).

Diferentemente do tratamento local, os tratamentos sistêmicos, nos dias 4 e 5 após inoculação (dias de condicionamento), com morfina (2,5 mg/kg, s.c.) e bosentana (100 mg/kg, v.o.) induziram CPP em ratos com carcinoma de face, observado pelo aumento no tempo gasto na câmara pareada com a droga, em comparação com o tempo gasto na câmara pareada com o veículo (Figura 19A). Nos animais inoculados com as células tumorais, além da preferência condicionada pela câmara pareada com a droga em comparação com a câmara pareada com o veículo, a administração sistêmica de morfina e bosentana resultou em aumento significativo no tempo despendido na câmara pareada com a droga no dia teste (dia 6 após inoculação), comparado com os valores do pré-condicionamento (basal). Os valores do pré-condicionamento (basal) não divergiram entre a câmara de pareamento com veículo e a câmara de pareamento com as drogas, portanto, os dados para os animais tratados com morfina e bosentana foram agrupados para representação gráfica (Figura 19A). Os valores do teste de animais sham, não diferiram entre a câmara de pareamento com veículo e a câmara de pareamento com as drogas, portanto, os dados para os animais tratados com morfina e bosentana também foram agrupados para representação gráfica (Figura 19A). A análise de diferenças entre os grupos de tratamento verificado através da diferença do tempo gasto na câmara pareada com a droga no dia teste e no dia do pré-teste (basal), demonstrou que somente o tratamento sistêmico com bosentana promoveu o aumento do tempo gasto na câmara de pareamento com a droga (Figura 19B).

CPP

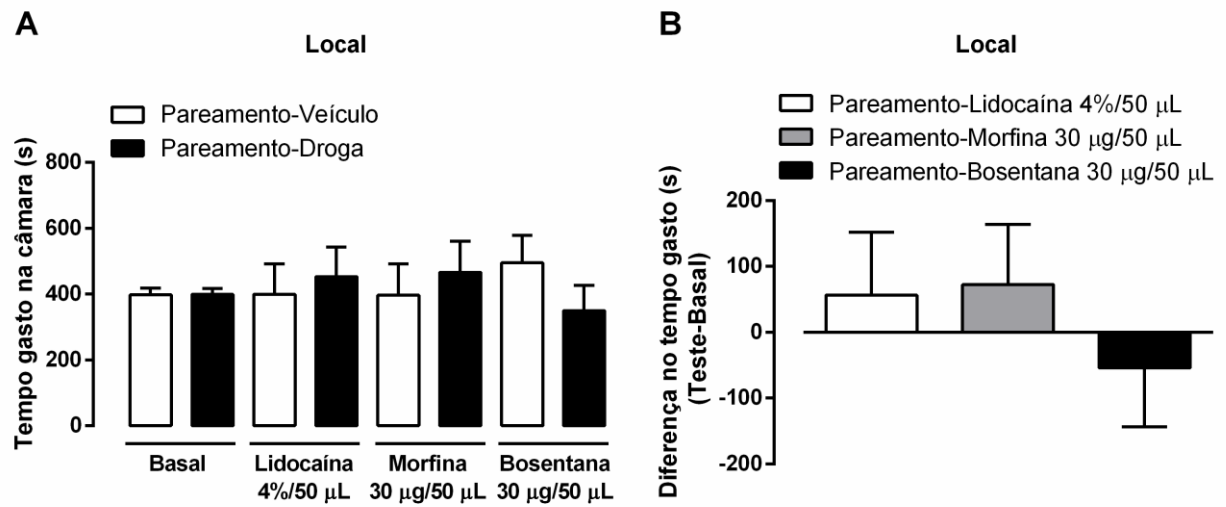


FIGURA 18 - Efeito do tratamento local com lidocaína, morfina e bosentana no teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma de face. Após a inoculação das células tumorais na face, os animais foram submetidos ao teste de preferência condicionada ao lugar nos dias 3, 4, 5 e 6 após inoculação. Avaliação do tempo gasto nas câmaras pareadas com o tratamento local com lidocaína 4%/50 µL, morfina e bosentana, nas doses de 30 µg/50 µL, cada, ou respectivos veículos (Painel A). Diferença entre os grupos do tempo gasto nas câmaras de pareamento com drogas no dia teste e basal (Painel B). Os Valores representam a média ± e.p.m. de 10-12 animais (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post-hoc* de Tukey, para avaliação do tempo gasto na câmara e ANOVA de uma via seguida do teste de *post-hoc* de Tukey, para avaliação da diferença no tempo gasto).

CPP

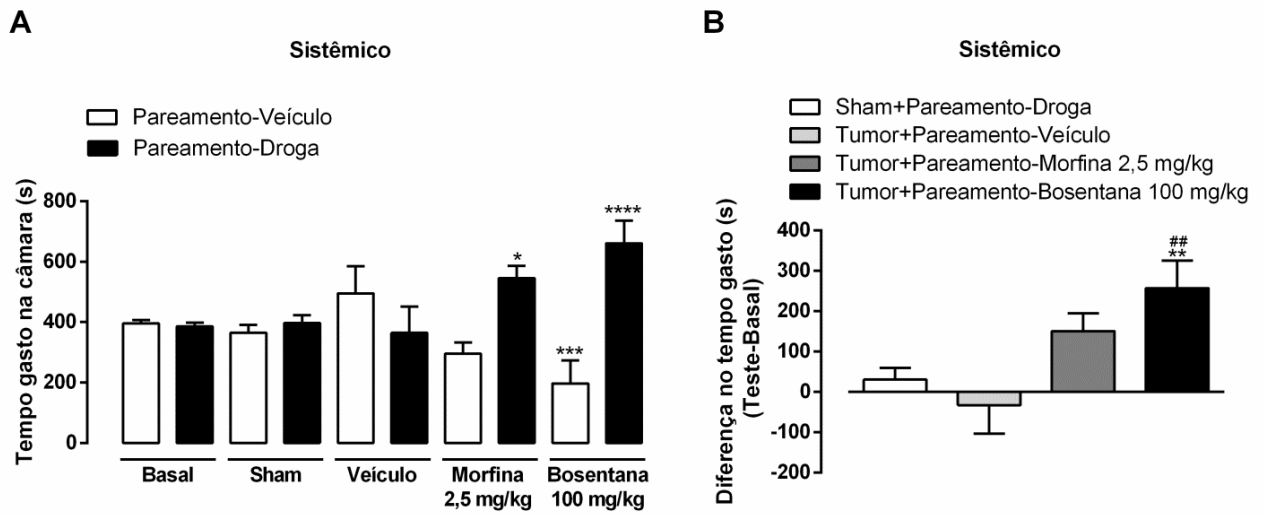


FIGURA 19 - Efeito do tratamento sistêmico com morfina e bosentana no teste de preferência condicionada ao lugar em animais com carcinoma de face. Após a inoculação das células tumorais na face, os animais foram submetidos ao teste de preferência condicionada ao lugar nos dias 3, 4, 5 e 6 após inoculação. Avaliação do tempo gasto nas câmaras pareadas com o tratamento sistêmico com morfina, na dose de 2,5 mg/kg, s.c. e bosentana, na dose de 100 mg/kg, v.o., ou respectivos veículos (Painel A). Diferença entre os grupos do tempo gasto nas câmaras de pareamento com drogas no dia teste e basal (Painel B). Os Valores representam a média \pm e.p.m. de 7-10 animais. No painel A, *, ** e **** indicam $P < 0,05$; $P < 0,001$ e $P < 0,0001$, respectivamente versus grupo Basal. No painel B, ** e ## indicam $P < 0,01$ versus grupos sham- e tumor-veículo, respectivamente (ANOVA de duas vias seguida do teste de *post-hoc* de Tukey, para avaliação do tempo gasto na câmara e ANOVA de uma via seguida do teste de *post-hoc* de Tukey, para avaliação da diferença no tempo gasto).

5 DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR INOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS NA FACE DE RATOS

A indução de câncer através da inoculação unilateral de células tumorais da linhagem Walker-256B na face de ratos, foi proposta por Ono e colaboradores em 2009, como um modelo para o estudo de mecanismos e novas estratégias farmacológicas para o controle da dor associada à essa condição. No presente estudo, os animais submetidos à inoculação de células tumorais apresentaram aumento do volume tumoral a partir do dia 3 após inoculação, com aumento progressivo até o dia 6, não demonstrando alteração de peso e diminuição de ingestão de água e alimentos até o sexto dia (Figura 3). Além disso, a indução do tumor facial promoveu desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica ao calor e ao frio, a partir do dia 4, a qual se mostrou mais acentuada no dia 6 após a inoculação, bem como desenvolvimento de comportamentos sugestivos de dor espontânea (Figura 4). De uma maneira geral, nossos dados estão de acordo com os resultados apresentados por Ono et al. (2009) e Nagamine et al., (2006).

Ono e colaboradores (2009) demonstraram diversas alterações relacionadas ao câncer facial, tais como o desenvolvimento tempo-dependente da massa tumoral, com crescimento celular a partir do dia 4 e aumento progressivo, até o dia 10 após inoculação. Ademais, os animais não apresentaram alterações de peso, bem como de consumo de água e ração nos dias 4 e 7 após inoculação, em comparação aos animais sham. Contudo, a partir do dia 10 após inoculação, os animais demonstraram perda de peso e diminuição do consumo de líquidos e alimentos, persistindo até o dia 14 após indução tumoral, quando foram eutanasiados. Além disso, foi verificado o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica ao calor, apenas no lado ipsilateral ao crescimento tumoral, a partir do quarto dia após inoculação, persistindo até o sétimo, bem como hipoalgesia após o décimo dia após a indução do tumor (ONO et al., 2009).

Através de um modelo de inoculação de SCC na gengiva de ratos, Nagamine e colaboradores (2006) observaram que os animais também não apresentaram alterações de peso após inoculação. Contudo, em estados mais avançados, isto é, a partir do dia 20 após a inoculação, os animais passaram a apresentar essas

alterações. Ademais, os animais também apresentaram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica ao calor apenas ipsilateralmente ao tumor, a partir do oitavo dia após inoculação, persistindo até o vigésimo oitavo dia. Essas alterações sensoriais foram observadas tanto com a estimulação na região das vibrissas, quanto na região submandibular, sugerindo o envolvimento de diferentes ramos periféricos do nervo trigêmeo, ou ainda alterações centrais do processamento somatossensorial.

Contudo, apesar de nossos resultados corroborarem dados da literatura, diferentemente de estudos descritos anteriormente (NAGAMINE et al., 2006; ONO et al., 2009), no presente estudo foi demonstrado o desenvolvimento bilateral das alterações sensoriais evocadas desde o início, o que sugere um processo de sensibilização central, bem como a ocorrência de alterações a nível supra-espinhal (Figura 4).

Com relação à perda de peso e redução do consumo de água e alimentos, clinicamente isso é observado apenas em estados terminais de câncer orofacial (LAM e SCHMIDT, 2011). No presente estudo, a fim de minimizar o sofrimento dos animais, os mesmos foram utilizados e eutanasiados antes do aparecimento destas alterações. Entretanto, quando os animais são mantidos por mais tempo após a indução do tumor na face, estas alterações são relatadas (NAGAMINE et al., 2006; ONO et al., 2009), corroborando as observações clínicas.

A alodinia mecânica é um dos sintomas mais comuns em pacientes com dor associada ao carcinoma de face e o modelo empregado no presente estudo mimetiza essa alteração sensorial (CONNELLY e SCHMIDT, 2007; LAM e SCHMIDT, 2011). Diversos mecanismos periféricos e centrais têm sido propostos para o desenvolvimento da alodinia mecânica associada ao carcinoma de face. Dentre eles, a liberação contínua de vários mediadores nociceptivos, provenientes de células tumorais e/ou de células do microambiente tumoral, pode produzir ativação contínua dos aferentes nociceptivos primários, o que contribuiria para a manutenção da alodinia mecânica persistente em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (LAM e SCHMIDT, 2011). Experimentalmente, Nagamine e colaboradores (2006) sugeriram que a hiperalgesia mecânica induzida pela inoculação de SCC em ratos está associada com a expressão aumentada de alguns peptídeos e receptores, tais como CGRP, SP, P2X3, e TRPV1 no gânglio do trigêmeo, assim como nos terminais periféricos dos aferentes nociceptivos. Em adição, a inoculação de SCC na língua de

camundongos, promoveu o desenvolvimento de hiperalgisia mecânica, a qual foi relacionada ao aumento de moléculas de ATP (YE et al., 2014). Sugere-se que esse mediador seria secretado pelo tumor e mantido pelo microambiente tumoral, resultando na ativação contínua dos receptores P2X2 e P2X3, presentes nos aferentes nociceptivos primários, o que contribuiria para a persistência da hiperalgisia (YE et al., 2014). Ainda nesse sentido, após inoculação de SCC na gengiva de ratos, demonstrou-se o aumento da expressão de receptores TRPV1 e TRPV2, além do aumento da ativação microglial no gânglio do trigêmeo, mecanismos relacionados com a manutenção direta e indireta, respectivamente, da hiperalgisia mecânica promovida pelo tumor (HIRONAKA et al., 2014).

Os resultados do presente estudo sugerem que mecanismos periféricos e centrais participem do desenvolvimento da hiperalgisia mecânica induzida pelo tumor, visto que esta alteração foi observada em ambos os lados da face (Figura 4B). Nesse sentido, vários estudos têm mostrado alterações a nível espinhal que parecem contribuir para o desenvolvimento da hiperalgisia mecânica. Ono e colaboradores (2009) demonstraram o aumento da proteína c-fos reativa no corno dorsal trigeminal bulbar (especialmente lâminas I e II) após a indução do tumor na face. Adicionalmente, utilizando o mesmo modelo do presente estudo para indução de câncer de face, Hidaka e colegas (2011) demonstraram a ativação da micróglia no subnúcleo *caudalis* e sugeriram sua relação com o desenvolvimento de hiperalgisia mecânica. Corroborando este dado, após indução de tumor na língua de ratos, também foi demonstrado aumento da atividade microglial no subnúcleo *caudalis*, o qual parece estar relacionado ao desenvolvimento da hiperalgisia mecânica (TAMAGAWA et al., 2016). Sago e colaboradores (2012), também verificaram que a hiperativação da glia centralmente, bem como a hiperativação persistente de astrócitos, contribuem para o desenvolvimento de hiperalgisia mecânica induzida pela inoculação de células tumorais na região das vibrissas de ratos.

Clinicamente, ainda não existem evidências de hiperalgisia térmica ao calor em pacientes com câncer orofacial, no entanto, este fato pode estar relacionado à falta de estudos que avaliem esse aspecto em pacientes. Nesse sentido, foi iniciado um estudo clínico objetivando a aplicação do teste sensorial quantitativo (QST) com a finalidade de verificar a qualidade da dor de pacientes com dor associada ao câncer de cabeça e pescoço (CLINICALTRIAL.GOV - NCT01846286). No entanto,

diversos estudos experimentais, incluindo o presente, relatam o surgimento dessa alteração concomitantemente ao desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em animais com carcinoma de face (Figuras 4B, 4C e 4D) (HARANO et al., 2010; ONO et al., 2009; TAMAGAWA et al., 2016).

Com relação aos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia ao calor, estudos indicam que receptores TRPV1 presentes em fibras C desempenham papel fundamental (HARANO et al., 2010; NAGAMINE et al., 2009; ONO et al., 2009; YE et al., 2014). Nesse sentido, Ye e colegas (2014) observaram o aumento de neurônios imunorreativos para TRPV1 no corno dorsal da medula espinhal, em um modelo que mimetiza o câncer facial por inoculação de células escamosas na pata de ratos, bem como demonstraram sua participação no desenvolvimento da hiperalgesia térmica. Em adição, Nagamine e colaboradores (2006) sugerem que a hiperalgesia térmica ao calor associada ao câncer orofacial em ratos esteja envolvida com a expressão aumentada de peptídeos como o CGRP e SP, receptores P2X3 e principalmente de receptores TRPV1 no gânglio do trigêmeo, bem como nos terminais periféricos dos aferentes nociceptivos. Ainda, assim como para o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica, também foi sugerida a participação de células da micróglia presentes no subnúcleo *caudalis* na indução e manutenção da hiperalgesia térmica ao calor (HIDAKA et al., 2011). Portanto, mecanismos periféricos e centrais parecem participar do desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor associada ao câncer de face.

No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio em animais com carcinoma de face, a qual ocorreu de maneira bilateral, no dia 6 após a inoculação (Figura 4D). De maneira análoga a condução de estímulos ao calor, estudos indicam que as fibras C são responsáveis pela condução de estímulos ao frio, contudo, os mecanismos pelos quais essas fibras realizam esta função ainda não estão totalmente elucidados. Receptores TRPA1 são fortes candidatos a transdutores do frio nocivo, inclusive no sistema trigeminal, e os mesmos são expressos por uma sub-população de fibras C imunorreativas para TRPV1 (CHICHORRO, 2006; para revisão ver FOULKES e WOOD, 2007). Entretanto, a participação de receptores TRPA1, além de outros prováveis mediadores da hiperalgesia térmica ao frio, tais como receptores TRPM8 e canais de potássio, no modelo de câncer de face ainda precisa ser investigada (GERHOLD e BAUTISTA, 2009; FAROOQI et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Adicionalmente, existem resultados demonstrando a existência de neurônios sensoriais sensíveis a baixas temperaturas que não expressam esses receptores, sugerindo a participação de outros transdutores de estímulo frio ainda desconhecidos (para revisão ver FOULKES e WOOD, 2007; YIN et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, faltam estudos clínicos que avaliem alterações térmicas em pacientes com dor relacionada ao câncer (ELIAV et al., 2003). O aumento da sensibilidade ao frio associada ao carcinoma foi relatado apenas por Potter e colaboradores (2003), onde pacientes com carcinoma de face relataram sensibilidade após ingestão de líquidos gelados. A aplicação do teste sensorial quantitativo (QST) tem sido sugerida para a avaliação da qualidade da dor de pacientes com dor associada ao carcinoma de cabeça e pescoço, e recentemente foi iniciado um estudo clínico objetivando a aplicação de teste QST (ELIAV et al., 2004; CLINICALTRIAL.GOV - NCT01846286).

Pelo fato da semelhança no decurso temporal do desenvolvimento da hiperalgesia ao frio e ao calor, escolhemos este último estímulo para dar sequência ao estudo, devido à maior facilidade da técnica, necessidade de número menor de animais e alta reprodutibilidade dos dados (Figuras 4C e 4D). Entretanto, é válido ressaltar que possivelmente diferentes mecanismos contribuam para o desenvolvimento de cada uma das alterações sensoriais.

Em uma análise de correlação realizada nos dias 3, 4, 5 e 6 após inoculação, observamos que o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor estava relacionado ao crescimento tumoral, visto que a média da latência para a resposta diminuiu significativamente à medida que o volume tumoral aumentou (Figura 5). Contudo, apesar da correlação positiva entre desenvolvimento da hiperalgesia térmica e crescimento tumoral, não foi observada relação entre o volume tumoral e a intensidade de hiperalgesia térmica avaliada em cada um dos dias após inoculação (Figura 6). Esses dados sugerem que um volume tumoral maior não implica em hiperalgesia térmica mais intensa. Esses resultados corroboram as observações clínicas de que, apesar da severidade da dor aumentar com a progressão tumoral, não há relação entre o tamanho do tumor da face e a intensidade de dor relatada pelo paciente (para revisão ver LAM e SCHMIDT, 2011; SCHMIDT, 2010; 2015; VIET e SCHMIDT, 2011; PICKERING et al., 2007).

Neste estudo também foi evidenciado o aumento do tempo de *grooming* espontâneo após a inoculação de células tumorais na face de ratos, comportamento

sugestivo de dor espontânea, que será discutido mais adiante (Figura 4A).

Com a finalidade de avaliar a eficácia do fármaco aprovado pela OMS para o controle da dor associada ao câncer de intensidade moderada a severa, os animais submetidos à inoculação das células tumorais na face foram tratados sistemicamente com morfina, e os resultados demonstraram a efetividade do tratamento sistêmico frente à redução da hiperalgesia mecânica e térmica (i.e. ao frio e calor), no dia 6 após inoculação (Figuras 8B, 9B e 10B, respectivamente). Nossos resultados corroboram o estudo de Hironaka e colaboradores (2014), no qual também foi relatado o efeito anti-hiperalgésico do tratamento sistêmico com morfina na hiperalgesia mecânica após inoculação de SCC humano na gengiva de ratas. O tratamento sistêmico com morfina também foi capaz de promover a redução da hiperalgesia mecânica, além da hiperalgesia térmica e comportamento sugestivo de dor espontânea, em um modelo de inoculação de células SCC na pata de camundongos (SHINODA et al., 2008). Assim, o tratamento sistêmico com morfina é amplamente utilizado em modelos de dor de câncer como controle positivo, devido à sua alta eficácia e correlação com a clínica (BAAMONDE et al., 2004; LUGER et al., 2002; LLORIÁN-SALVADOR et al., 2015; SCHMIDT et al., 2007).

Além disso, estudos experimentais têm reportado o efeito analgésico local de opioides no controle da hiperalgesia associada ao câncer, em diferentes modelos de indução tumoral, sendo descrita como uma alternativa relevante no controle dessas condições (BAAMONDE et al., 2005; MENÉDEZ et al., 2003). Dessa maneira, em um modelo de câncer ósseo foi evidenciado o efeito analgésico do tratamento local com morfina, bem como com loperamida na redução da hiperalgesia térmica ao calor induzida pelo tumor (MENÉDEZ et al., 2003). Utilizando outro modelo de indução de câncer ósseo, Curto-Reyes et al. (2008) demonstrou a efetividade do tratamento local com loperamida, na redução da hiperalgesia térmica induzida neste modelo. É válido ressaltar que a loperamida é um agonista μ -opioide que não atravessa a barreira hematoencefálica. Adicionalmente, esse tratamento intraplantar não modificou o limiar de resposta dos animais frente à hiperalgesia mecânica desenvolvida pela inoculação (CURTO-REYES et al., 2008). Em concordância, nossos resultados sugerem a participação dos receptores opioides periféricos na analgesia induzida pela morfina, no modelo de dor associada ao carcinoma de face, pois sua administração local (i.e. lábio superior) promoveu redução significativa da hiperalgesia térmica ao calor e frio (Figuras 9A e 10A). No entanto, não foi

observado efeito na redução da hiperalgesia mecânica, o que corrobora a sugestão de alguns autores de que a hiperalgesia mecânica seja mantida principalmente por estruturas centrais (Figura 8A) (HIDAKA et al., 2011; ONO et al., 2009).

5.2 PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS ASSOCIADAS AO CARCINOMA FACIAL

Em muitos tipos de câncer, a dor que está associada apresenta características de dor inflamatória, além de características de dor neuropática, o que torna a dor refratária a uma grande diversidade de tratamentos, impulsionando novos estudos para o entendimento da fisiopatologia da dor e busca de novas estratégias farmacológicas para o seu controle (EPSTEIN et al., 2009). Nesse sentido, as endotelinas representam um alvo bastante promissor, pois participam de diversos processos relacionados ao câncer, tais como indução e manutenção da proliferação celular, invasão para tecidos adjacentes, bem como sensibilização de neurônios sensoriais periféricos culminando no aumento da percepção sensorial (para revisão ver LAM e SCHMIDT, 2012; SCHMIDT 2014; 2015).

O nosso grupo demonstrou pela primeira vez a expressão de receptores ET_B em fibras C no sistema sensorial trigeminal, bem como a sua participação na transdução nociceptiva. Além disso, em concordância à Brändli et al. (1996) e Kitano et al., (1998), confirmou a presença de receptores ET_A e ET_B no sistema trigeminal, demonstrando a expressão de receptores ET_A em fibras A e C, e receptores ET_B em células da glia do gânglio do trigêmeo. Em adição, fornecemos diversas evidências da participação das endotelinas na transmissão nociceptiva no sistema trigeminal (CHICHORRO et al., 2006a; 2006b; 2009; 2010).

Níveis circulantes aumentados de endotelinas foram reportados em pacientes acometidos por câncer de face, e tem sido sugerido que esses mediadores estejam intimamente relacionados a processos nociceptivos associados ao carcinoma (PICKERING et al., 2007; SCHMIDT et al., 2007; para revisão ver HOFFMAN et al., 2010; LAM e SCHMIDT, 2012). Foi verificado que SCC de face expressam receptores ET_A e ET_B em sua membrana e promovem a liberação de endotelinas no microambiente tumoral (AWANO et al., 2006). Experimentalmente, a inoculação de SCC na pata de camundongos, resultou em aumento intratumoral do RNA mensageiro para ET-1, além do aumento do próprio peptídeo, paralelamente ao

desenvolvimento de hiperalgisia mecânica (SCHMIDT et al., 2007). Em concordância, Pickering et al. (2008) reportou níveis elevados de ET-1 no tumor na pata de camundongos, e relatou uma contribuição mais significativa deste mediador no desenvolvimento das alterações nociceptivas do que no próprio desenvolvimento tumoral. Assim, o bloqueio de receptores de endotelina representa uma alternativa interessante para o controle da dor associada ao câncer.

Nesse sentido, o primeiro relato do efeito analgésico do bloqueio de receptores de endotelina em modelos de câncer foi descrito por Baamonde et al. (2004). Após a indução do tumor em pata de camundongos, esse grupo verificou o efeito do tratamento local com BQ-123 na redução desta hiperalgisia em estágios iniciais e avançados do carcinoma (até 25 semanas), enquanto que o efeito anti-hiperalgésico do tratamento local com BQ-788 foi observado apenas no estágio inicial do desenvolvimento da hiperalgisia térmica. Esses dados sugerem a importância de receptores ET_A e ET_B para o desenvolvimento das alterações sensoriais térmicas, e apenas dos receptores ET_A para a manutenção dessa condição (BAAMONDE et al., 2004). Schmidt e colaboradores (2007) verificaram o efeito anti-hiperalgésico do tratamento local com BQ-123 no desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica após inoculação de SCC na pata de camundongos. Em 2010a, utilizando o mesmo modelo, Quang e Schmidt também observaram o efeito analgésico da administração local de BQ-123 na hiperalgisia mecânica a qual demonstraram ser dependente da ativação de receptores μ e δ opioides.

O efeito analgésico decorrente do bloqueio seletivo de receptores ET_A também tem sido reportado em outros modelos de dor de câncer. Yuayama et al., (2004) demonstrou o efeito analgésico do bloqueio local destes receptores em um modelo de câncer de próstata, enquanto Peters e colaboradores (2004) relataram redução da hiperalgisia mecânica frente ao tratamento sistêmico, agudo e crônico, de animais com câncer ósseo. Dessa maneira, pode ser observado que a maioria dos estudos destaca a importância apenas do bloqueio de receptores ET_A no controle da hiperalgisia associada ao câncer.

Interessantemente, a ativação, e não o bloqueio de receptores ET_B, tem se mostrado eficaz na redução da hiperalgisia, através da indução da liberação de opioides endógenos no modelo de indução de câncer na pata de camundongos (QUANG e SCHMIDT, 2010b). Corroborando esse dado, no modelo de câncer ósseo relatado por Peters et al. (2004), o bloqueio seletivo de receptores ET_B induziu o

aumento da hiperalgesia mecânica.

Contudo, outros estudos utilizando diferentes modelos de dor crônica reportam efeito analgésico do bloqueio seletivo de receptores ET_B . Kim et al. (2015) demonstrou esse efeito analgésico através da administração intratecal de BQ-788 em um modelo de síndrome de dor complexa regional em ratos, ressaltando a falha no controle da hiperalgesia mecânica através do tratamento com BQ-123. Em um modelo de neuralgia do trigêmeo, Chichorro e colaboradores (2009) evidenciaram a seletividade do bloqueio sistêmico de receptores ET_B , para a redução da hiperalgesia mecânica induzida pela constrição do nervo infra-orbital. Dessa maneira, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a participação dos receptores ET_B da dor associada ao câncer.

No presente estudo o bloqueio sistêmico de receptores ET_A e ET_B com o antagonista não seletivo bosentana, nas diferentes doses avaliadas, não alterou a hiperalgesia mecânica associada ao câncer de face em ratos (Figura 11). Em contraste, os estudos de Schmidt et al. (2007) e Quang e Schmidt (2010a) mostraram que o tratamento local com o antagonista seletivo de receptores ET_A , BQ-123, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica. No entanto, vale ressaltar que apesar desses estudos utilizarem células de câncer orofacial, a hiperalgesia mecânica foi avaliada na pata de animais, um sistema sensorial distinto do sistema trigeminal.

Adicionalmente, nossos dados mostram que o tratamento local com BQ-123 e BQ-788 ou a associação dos dois antagonistas, não foi capaz de promover a redução da hiperalgesia ao calor em animais com carcinoma de face (Figura 13A). É possível que a falha na efetividade destes antagonistas peptídicos tenha ocorrido devido ao aumento dos níveis de proteases sintetizadas e liberadas pelas células tumorais, resultando na hidrólise, e por consequência, na degradação das moléculas de BQs previamente à ligação aos receptores (HARDT et al., 2011; para revisão ver SCHMIDT 2014). Corroborando essa hipótese, o tratamento local com bosentana, um antagonista não peptídico e não seletivo reduziu significativamente a hiperalgesia ao calor nos animais com câncer facial (Figura 13B). É válido ressaltar que não temos conhecimento de outros estudos que avaliaram o efeito da administração local desse fármaco em modelos de câncer.

Em concordância ao efeito do bloqueio local, os dados do presente estudo demonstram que o tratamento sistêmico com bosentana, na maior dose avaliada,

bloqueou a hiperalgesia ao calor associada ao câncer de face (Figura 14). Esses resultados corroboram dados anteriores do nosso grupo, onde foi ressaltada a participação de ambos receptores no desenvolvimento da hiperalgesia térmica em um modelo de dor neuropática trigeminal (CHICHORRO et al., 2006b; 2009). De modo geral, o processamento nociceptivo trigeminal de estímulos térmicos, promovidos por alterações como neuropatia e câncer, parecem ser mediados por receptores ET_A e ET_B.

Periféricamente, a bosentana poderia estar atuando no bloqueio de receptores ET_A presentes nos aferentes sensoriais primários, impedindo a sensibilização periférica associada ao desenvolvimento da hiperalgesia. Ainda, esse fármaco poderia estar promovendo o bloqueio de receptores ET_A e principalmente, receptores ET_B, presentes nas células tumorais, promovendo a redução da liberação de ET-1 dessas células, contribuindo para a redução da sensibilização das fibras sensoriais periféricas (para revisão ver BARR et al., 2012; KHODOROVA et al., 2009; SMITH et al. 2014; SCHMIDT 2010; 2014). No entanto, seria necessário demonstrar a presença de receptores ET_A e ET_B no carcinoma de Walker para dar suporte a esta hipótese. Além disso, receptores ET_A são expressos nas mesmas fibras sensoriais periféricas que expressam receptores TRPV1, inclusive no sistema trigeminal (CHICHORRO et al., 2009). Em virtude desta co-localização, estudos têm demonstrado a capacidade dos receptores de endotelina em promover a sensibilização dos receptores TRPV1, via ativação de PKC intracelular, resultando no aumento da sensibilidade frente à estimulação térmica ao calor (PLANT et al., 2006; 2007).

A capacidade da bosentana de ultrapassar a barreira hematoencefálica, nos permite discutir possíveis ações no SNC em adição às suas ações periféricas (MCAULEY et al., 1996). Assim, estudos reportaram o efeito antinociceptivo do bloqueio espinal de receptores ET_A e ET_B em diversos modelos de dor crônica, destacando mais uma região que poderia contribuir para o controle da nocicepção induzida pelo tumor (KIM et al., 2015; TAI et al., 2013). Outro possível mecanismo relacionado ao efeito analgésico da bosentana seria o bloqueio de receptores ET_B em células da glia. Esse bloqueio resultaria na diminuição da liberação de mediadores nociceptivos promovidos pela ativação glial, e por consequência redução da sensibilização de neurônios presentes no corno dorsal da medula espinal (para revisão ver BARR et al., 2012; KHODOROVA et al., 2009; SMITH et

al. 2014; SCHMIDT 2010; 2014). Apesar da sugestão de vários mecanismos de ação para o efeito antinociceptivo local e sistêmico promovido pelo bloqueio de receptores ET_A e ET_B, estudos devem ser conduzidos para a elucidação do real mecanismo responsável por esse efeito na hiperalgesia térmica associada ao câncer de face.

5.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO TRATAMENTO DE MORFINA E BOSENTANA NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

Fármacos opioides representam a classe de medicamentos mais prescrita para pacientes acometidos por dor associada ao câncer, contudo, o uso contínuo desta classe é responsável pelo desenvolvimento de diversos efeitos adversos. Dessa maneira, a busca de novas estratégias que visem o controle analgésico e redução da ocorrência dos efeitos adversos tem sido considerada, sendo uma delas, a associação da morfina e antagonistas de endotelina (BHALLA et al., 2002; GULATI et al., 2004; SCHMIDT, 2014).

Nosso estudo, além de mostrar uma estratégia monoterapêutica analgésica através do bloqueio de receptores de endotelina ET_A e ET_B, demonstra pela primeira vez o efeito analgésico da combinação de morfina e bosentana, em doses ineficazes quando administradas isoladamente, frente à hiperalgesia mecânica e térmica associada ao câncer de face, sugerindo um possível efeito sinérgico (Figuras 12 e 15, respectivamente).

Vários estudos têm explorado os efeitos da associação de opioides com antagonistas de receptores de endotelina, principalmente com o receptor do tipo ET_A, contudo, a maioria dos estudos evidenciam essa interação frente à redução da tolerância e hiperalgesia induzida pela utilização crônica do opioide (BHALLA et al., 2010; 2015; GULATI et al., 2004). Nesse sentido, foi reportada a interação entre a morfina e o receptor ET_A em animais *naive*, demonstrando que a administração de BQ-123 i.c.v., potencializou o efeito analgésico da administração sistêmica de morfina, verificado através do teste de *tail-flick*, que avalia a resposta do animal frente à estimulação ao calor (BHALLA et al., 2002).

Também em animais *naive*, Matwyshyn et al. (2006) destacou a importância de mecanismos centrais do bloqueio de receptores ET_A para a potenciação do efeito analgésico da morfina, através da administração i.c.v. do antagonista BMS182874.

Este estudo sugere o envolvimento apenas desse receptor de endotelina, além de mecanismo central para esse aumento da analgesia, visto que a administração intraperitoneal do antagonista de receptores ET_A , que não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, não modificou a analgesia promovida pela morfina, bem como a administração i.c.v. e intraperitoneal de um agonista de receptores ET_B (MATWYSHYN et al., 2006).

O estudo de Bhalla et al. (2002) sugere que a modulação das ações farmacológicas da morfina pelo BQ-123 envolva mecanismos centrais. Apesar de não demonstrar por qual mecanismo isso ocorre, o estudo descarta a ação do antagonista ET_A em receptores opioides presentes no SNC, visto que a administração i.c.v. de BQ-123 não modificou a interação de naloxona com o receptor opioide. Ainda, além de potencializar o efeito analgésico da morfina, a administração do antagonista de receptores ET_A promoveu o aumento do tempo de analgesia promovida pela administração de morfina. O mesmo grupo demonstrou que o bloqueio de receptores ET_A é capaz de potencializar o efeito antinociceptivo não somente de agonistas μ opioides, mas também de agonistas de receptores μ , κ e δ opioides em camundongos *naive* (BHALLA et al., 2010).

Entretanto, em nenhum desses estudos foi relatado o bloqueio de receptores ET_B . Dessa maneira, nossos dados corroboram em parte o achado de Bhalla et al. (2002) e Matwyshyn et al. (2006), fornecendo evidências de que, pelo menos no modelo de câncer de face, não somente o bloqueio de receptores ET_A seja importante para potencializar o efeito analgésico da morfina, mas também o bloqueio de receptores ET_B . Ademais, devido à característica de atravessar a barreira hematoencefálica demonstrada pela bosentana, os efeitos anti-hiperalgésicos, em combinação com a morfina, observado nesse estudo, podem estar ocorrendo em regiões do SNC.

A interação entre os receptores ET_A e morfina já foi descrita em diversos estudos relacionados à tolerância induzida pela utilização prolongada do opioide. Tem sido sugerido que a interação do antagonista com os receptores ET_A favoreça o reacoplamento de proteínas G com os receptores μ -opioides, reestabelecendo o efeito analgésico (para revisão ver BHALLA et al., 2016). Nesse sentido, o efeito antihiperalgésico observado nesse estudo, decorrente da combinação de morfina e bosentana em animais com carcinoma de face, poderia estar ocorrendo pelo bloqueio de receptores ET_A , com consequente favorecimento da interação do

receptor opioide e proteína G intracelular, após a ligação da morfina. Ademais, esse efeito explicaria a ineficácia analgésica das doses utilizadas em combinação, quando administradas individualmente.

Além disso, estudos tem demonstrado a potenciação do efeito analgésico do tratamento com a morfina, através do bloqueio de células da glia em condições de dor neuropática (para revisão ver MIKA, 2008). Aparentemente, a morfina exerce uma ação contrária ao seu efeito analgésico em células da glia, promovendo a liberação de mediadores excitatórios responsáveis pelo aumento da sensibilização dos neurônios sensoriais. Dessa maneira, o bloqueio da ativação poderia contribuir para potenciação do efeito analgésico do opioide (para revisão ver MIKA, 2008). Observada a presença de receptores ET_B na microglia do sistema sensorial trigeminal, o efeito analgésico relatado da combinação, de morfina e bosentana, também poderia estar relacionado ao bloqueio da ativação glial mediada por receptores ET_B . Esse bloqueio impediria a ação da morfina na micróglia, impedindo a liberação de mediadores neuroexcitatórios no SNC ou na região periférica, diminuindo a sensibilização, e por consequência a redução dos comportamentos de hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pelo tumor de face (CHICHORRO et al., 2010; HIDAKA et al., 2011; para revisão ver MIKA, 2008). Entretanto, estudos devem ser realizados para a busca de mecanismos que expliquem o sinergismo do efeito analgésico decorrente da interação de agonistas de receptores opioides e de antagonistas endotelinérgicos.

Uma diferença que aumenta a relevância do achado, entre os nossos resultados e estudos relatados anteriormente, é a dosagem utilizada. Nossos resultados evidenciam o surgimento do efeito analgésico entre a combinação de doses de morfina e bosentana ineficazes quando administradas individualmente, já os demais estudos relatam a efetividade do bloqueio de receptores ET_A na potenciação do efeito analgésico promovido pela morfina já administrada individualmente. Em nosso estudo, pode ter sido observado este efeito analgésico, não somente pela interação do opioide e de receptores ET_A , mas também devido ao bloqueio de receptores ET_B . Dessa maneira, esses dados sugerem que o efeito analgésico com a redução da dose de morfina, poderia diminuir os efeitos adversos promovidos pela utilização prolongada do opioide (BHALLA et al., 2002; 2010; MATWYSHYN et al., 2006).

Por fim, visto que o aumento da sensibilidade frente à estimulação mecânica

é um dos sintomas de dor evocada mais frequentemente relatados na clínica por pacientes acometidos com carcinoma de face, esses resultados revelaram um efeito muito interessante e promissor para o controle dessa condição evocada, sugerindo a avaliação da efetividade analgésica dessa combinação na clínica (CONNELLY e SCHMIDT, 2007; LAM e SCHMIDT, 2011).

5.4 DESENVOLVIMENTO DE NOCICEPÇÃO ESPONTÂNEA EM ANIMAIS COM CARCINOMA DE FACE

Dor espontânea no local do tumor, definida como uma dor que ocorre na ausência de qualquer estímulo, é o sintoma mais comumente relatado, contribuindo drasticamente para a redução da qualidade de vida de pacientes acometidos ao carcinoma de face (CONNELLY e SCHMIDT, 2006; CUFFARI et al., 2006; LAM e SCHMIDT, 2011; NAVRATILOVA et al., 2013; 2016; VIET et al., 2011). Na busca de alternativas que permitam a avaliação deste parâmetro em roedores, estudos observaram que, a limpeza ou *grooming* facial realizada com as patas dianteiras após a aplicação de estímulo nocivo na face, poderia representar um comportamento sugestivo de dor espontânea. No entanto, quando o animal utiliza as patas traseiras para a realização desse comportamento, estudos sugerem que o mesmo esteja relacionado ao prurido (AKIYAMA et al., 2010; SPRADLEY et al., 2012).

Nesse sentido, Ono e colaboradores (2009) demonstraram que a inoculação de células tumorais na face de ratos, promovia o desenvolvimento de *grooming* espontâneo a partir do dia 4, persistindo até o dia 14, após inoculação. Outros estudos, utilizando o mesmo modelo experimental, observaram o aumento do tempo de *grooming* facial a partir do dia 1 ou 2 após a inoculação (HIDAKA et al., 2011; SAGO et al., 2012). Corroborando esses dados, no presente estudo foi demonstrado que a inoculação da mesma linhagem de células tumorais na face de ratos, promove aumento do tempo de *grooming* espontâneo, em relação aos animais controle, contudo, no dia 6 após a inoculação (Figura 4A).

Além do desenvolvimento deste comportamento, Ono e colegas (2009) demonstraram a efetividade do bloqueio do *grooming* espontâneo através do tratamento com anestésico local. Corroborando os dados deste estudo, nossos resultados também demonstram a efetividade do bloqueio do *grooming* espontâneo

após inoculação, frente ao tratamento local com lidocaína, bem como ao tratamento local e sistêmico com morfina, demonstrando a utilidade da avaliação deste comportamento para verificação de sinais de dor espontânea.

A dor espontânea ocorre na forma de ataques não evocados, e caracteriza-se por dor de intensidade moderada à severa, de curta duração, podendo ocorrer várias vezes ao dia. Dessa maneira, os mecanismos de desenvolvimento dessa qualidade de dor estão começando a ser estudados, embora, existam evidências de que os mecanismos de desenvolvimento da dor espontânea diferem daqueles relacionados às dores evocadas, visto que com exceção de opioides, fármacos utilizados na clínica para o controle da dor evocada não possuem efetividade no controle da dor espontânea (KING et al., 2009; para revisão ver MANTYH, 2006; NAVRATILOVA et al., 2013; 2016).

Algumas diferenças no desenvolvimento da dor espontânea e evocada já foram evidenciadas em modelos de câncer facial, bem como alguns mecanismos têm sido propostos. Ono e colegas (2009) observam o surgimento de dor evocada e não evocada em um mesmo período de tempo após indução de carcinoma facial. No entanto, o comportamento de *grooming* espontâneo observado nesses animais perdurou por um período de tempo mais prolongado, em comparação com o período de tempo dos comportamentos de nocicepção evocada. Esses autores sugerem que a manutenção do comportamento de dor espontânea e evocada está relacionada ao aumento da atividade de neurônios no subnúcleo *caudalis* (ONO et al., 2009). Hidaka e colegas (2011) sugerem que a ativação microglial seja um dos mecanismos em comum para o desenvolvimento da dor evocada e espontânea após indução de carcinoma na face de ratos, visto que o tratamento com propentofilina reduziu ambos os comportamentos. Sago e colaboradores (2012) sugerem a existência de uma via dependente, bem como uma via independente da ativação microglial para o desenvolvimento do comportamento de *grooming* espontâneo induzido pelo tumor de face, visto que o tratamento com propentofilina causou redução parcial deste comportamento. A propentofilina é um vasodilatador periférico e central derivado da xantina, e foi utilizado nos estudos anteriores por possuir como mecanismo de ação secundário inibição da atividade glial (HIDAKA et al., 2011; SAGO et al., 2012).

Por outro lado, Lam e Schmidt (2011) sugerem um mecanismo periférico em comum entre o desenvolvimento da dor evocada e espontânea, a liberação contínua de vários mediadores nociceptivos, provenientes de células de câncer de face, e de

células do microambiente tumoral, contribuindo para a ativação contínua dos aferentes nociceptivos primários e por consequência comportamentos nociceptivos espontâneos (PICKERING et al., 2008; QUANG e SCHMIDT, 2010). Tem sido sugerido que esse mecanismo contribua para a indução do *sprouting* (i.e brotamento) de nervos sensoriais periféricos e centrais em diversos tipos de dor associada ao câncer. O *sprouting* neuronal promove uma reorganização neuronal, a qual parece contribuir diretamente para o surgimento e manutenção de alterações relacionadas principalmente à dor espontânea (para revisão ver MANTHY, 2002; MANTHY et al., 2002; 2010). Assim, com a finalidade de buscar melhores alternativas para o controle da dor, o conhecimento da fisiopatologia dessa condição é indispensável. Dessa maneira, estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão das diferenças entre o desenvolvimento e manutenção da dor espontânea e evocada.

A dor é uma experiência subjetiva composta por componentes sensoriais, afetivos/emocionais e cognitivos, no entanto, a maioria dos estudos experimentais apenas avaliam os componentes sensoriais da dor, devido a dificuldade de se avaliar os demais componentes em animais. Nos últimos anos, tem sido validado um modelo que propõe avaliar os demais aspectos da dor em roedores (KING et al., 2009; para revisão ver NAVRATILOVA et al., 2013; 2016). O comportamento motivacional promovido por estados de dor é fundamental para a sobrevivência e parece ser codificada por circuitos neurais conservados entre roedores e humanos. Estudos recentes têm procurado capturar os aspectos aversivos da dor, utilizando o impulso motivador dos animais para evitar essa condição, buscando o alívio. Essa motivação para manter um estado normal, não-doloroso, facilita a aprendizagem a fim de evitar comportamentos que resultam em danos ou ferimentos. Assim, estes princípios formam a base do reforço negativo e podem ser utilizados para avaliar indiretamente os aspectos afetivos da dor em roedores. Dessa maneira, comportamentos de aprendizagem operante, como a preferência/aversão condicionada ao lugar, fuga de um estímulo nocivo, e auto-administração sistêmica e espinhal de drogas analgésicas têm sido empregadas no estudo de aspectos motivacionais da dor.

O teste de preferência condicionada ao lugar (CPP) é usado para revelar a presença de dor espontânea e ajudar na validação de mecanismos que possam gerar alívio dessa condição. O ensaio é composto por um dia de pré-

condicionamento, condicionado, seguido por um dia de teste. Dessa maneira, um tempo gasto na câmara pareada com a droga maior, e conseqüente diminuição do tempo gasto na câmara oposta, indica preferência pelo efeito proporcionado pelo tratamento com a droga. Assim, a aversão da dor fornece uma forte motivação para a busca por alívio da dor, e o pareamento com tratamentos que produzem esse alívio, com um contexto de promover o CPP, revela a presença de dor espontânea em animais.

No presente estudo, o tratamento local com lidocaína e morfina, ambos eficazes no controle do comportamento de *grooming* espontâneo, não promoveram CPP em animais inoculados com as células tumorais na face (Figura 18). Em contraste, Remeniuk et al. (2015), utilizando um modelo de dor associada ao câncer ósseo, demonstrou a eficácia do tratamento local com lidocaína, na mesma dose empregada neste estudo, frente ao desenvolvimento de CPP. Essa divergência no efeito analgésico da lidocaína pode contribuir para os estudos que sugerem mecanismos nociceptivos distintos nestes dois sistemas sensoriais ou pode estar relacionado ao modelo de câncer empregado. No entanto, o tratamento sistêmico com morfina induziu CPP nos animais com câncer de face, assim como nos animais com dor associada ao câncer ósseo (REMENIUK et al., 2015). Como já observado por Volkow e Li (2005), a morfina é intrinsecamente recompensadora, de tal modo que poderia gerar discussões sobre o efeito do opioide na promoção do CPP. Entretanto, tanto no presente estudo, quanto no de Remeniuk (2015), somente os animais com tumor apresentaram CPP, enquanto que o tratamento com morfina não induziu CPP nos animais sham.

Estudos têm sugerido a participação do sistema mesolímbico e mesocortical de recompensa para o alívio da dor espontânea. Este sistema compreende a VTA com suas projeções dopaminérgicas que se estendem até o NAc. Dessa maneira, acredita-se que o mecanismo relacionado com o alívio da dor espontânea no teste de CPP seja através da ativação de neurônios presentes na VTA através de projeções neuronais que partem do ACC, resultando na ativação de projeções neuronais no NAc, e liberação de dopamina nessa região (GEAR e LEVINE, 2011; para revisão ver NAVRATILOVA et al., 2013; 2014; 2016). Corroborando essa hipótese, Remeniuk e colegas (2015) observaram que a indução do CPP pelo tratamento com morfina, promoveu um aumento na liberação de dopamina no NAc cinco vezes maior nos ratos inoculados com células de tumor ósseo em comparação

aos animais do grupo sham do aquela indicando que o aumento estaria relacionado ao alívio da dor e não ao efeito reforçador da droga. Nesse estudo foi demonstrado ainda que a administração de um antagonista de receptores opioides do tipo μ seguida do tratamento com morfina resultava em bloqueio da liberação de dopamina promovida pelo alívio da dor em animais com tumor, mas não da liberação de dopamina promovida pelo efeito reforçador do fármaco opioide. Outra evidência para a importância do ACC em comportamentos espontâneos é que a hiperalgesia mecânica permanece inalterada após bloqueio dessa estrutura (para revisão ver NAVRATILOVA et al., 2013; 2014; 2016; REMENIUK et al., 2015).

Por fim, visto que o tratamento local com morfina foi eficaz somente no controle do *grooming* espontâneo, pode-se destacar a participação do sistema nervoso periférico para o controle dessa situação, no entanto, o tratamento sistêmico com morfina foi eficaz tanto para o controle do *grooming* espontâneo, bem como para o CPP, sugerindo a adição da participação do SNC para a modulação dessas condições (Figura 19). Por se apresentarem de maneira diferente, é provável que possuam mecanismos de desenvolvimento distintos, instigando novas pesquisas que contribuirão para o conhecimento, bem como a elaboração de novas estratégias farmacológicas para o controle dessas condições.

5.5 PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA DOR ESPONTÂNEA ASSOCIADA AO CARCINOMA DE FACE EM RATOS

Diversos estudos clínicos e pré-clínicos descrevem a importância da ET-1 para a promoção e manutenção da dor espontânea. A injeção intradérmica de ET-1 em humanos induz dor espontânea (HANS et al., 2007). Experimentalmente, a injeção local de ET-1 também induz comportamentos sugestivos de dor espontânea em roedores (GOKIN et al., 2001). Além disso, a relação entre o aumento dos níveis de ET-1 com o desenvolvimento de alterações sensoriais espontâneas tem despertado o interesse em pesquisas que demonstrem a efetividade de antagonistas de endotelina nessa condição (HANS et al., 2007; para revisão ver KHODOROVA et al., 2009; SMITH et al., 2014).

Nossos dados mostram pela primeira vez a participação das endotelinas no desenvolvimento da dor espontânea no modelo de câncer de face. Foi observado que o tratamento local com BQ-123 e/ou BQ-788 não promoveram a redução do

comportamento de *grooming* espontâneo (Figura 16A). Em oposição, Tang e colaboradores (2016) observaram que o bloqueio de receptores ET_A pelo tratamento local com BQ-123 reduziu o comportamento de dor espontânea do tipo *breakthrough* em animais inoculados de células tumorais na pata. No entanto, o tratamento local com bosentana bloqueou o comportamento de *grooming* espontâneo (Figura 16B). Como já discutido anteriormente, acredita-se que os BQs não foram efetivos no bloqueio do *grooming*, devido ao grande número de peptidases presentes no microambiente tumoral, responsáveis pela degradação rápida destas moléculas (para revisão ver SCHMIDT, 2014).

Ademais, o bloqueio sistêmico de receptores ET_A e ET_B promovido pela bosentana, na menor dose utilizada nesse estudo, inibiu de maneira semelhante ao tratamento com morfina, o *grooming* espontâneo em animais com carcinoma de face (Figura 17). Assim, podemos evidenciar uma maior efetividade do bloqueio sistêmico dos receptores de endotelina, no comportamento de dor espontânea quando comparado com comportamentos relacionados à dor evocada.

Embora tenha sido efetivo no controle do comportamento de *grooming* espontâneo, o tratamento local com bosentana não foi capaz de induzir CPP nos animais inoculados com as células tumorais (Figura 18). No entanto, o bloqueio sistêmico com bosentana, induziu CPP apenas nos animais inoculados com tumor na face, indicando alívio da dor espontânea semelhante ao efeito promovido pela morfina (Figura 19A). Interessantemente, de acordo com os dados de diferença no tempo gasto na câmara pareada com a droga no dia teste e no dia do pré-teste, pode ser verificado uma melhor eficácia na indução de CPP pelo tratamento com bosentana em comparação ao efeito promovido pelo tratamento com a morfina (Figura 19B).

Estudos sugerem que a liberação contínua de ET-1, provenientes de células tumorais, contribua periféricamente para a ocorrência do fenômeno de dor espontânea persistente, por produzir ativação contínua dos aferentes nociceptivos primários, culminando na sensibilização de neurônios nociceptivos de segunda ordem (para revisão ver BARR et al., 2012).

Na maioria dos estudos em roedores, acredita-se que a indução da dor espontânea relacionada ao aumento dos níveis de endotelina é mediada via ativação de receptores ET_A. No modelo de dor de câncer ósseo, Peters e colaboradores (2004) verificaram um aumento de ET-1 no microambiente tumoral, o

qual foi relacionado com a ocorrência de comportamentos de dor espontânea, bem como reduzido pela administração sistêmica de um antagonista de receptores ET_A. Em contraste, o tratamento sistêmico com antagonista de receptores ET_B promoveu o aumento do comportamento de dor espontânea. Além disso, o tratamento crônico com o antagonista de receptores ET_A manteve o efeito analgésico frente ao comportamento de dor espontânea, e promoveu uma redução na expressão de neurônios positivos para a proteína c-fos nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal, indicando uma redução da sensibilização dos aferentes primários e corroborando as observações de Barr e colaboradores (2012).

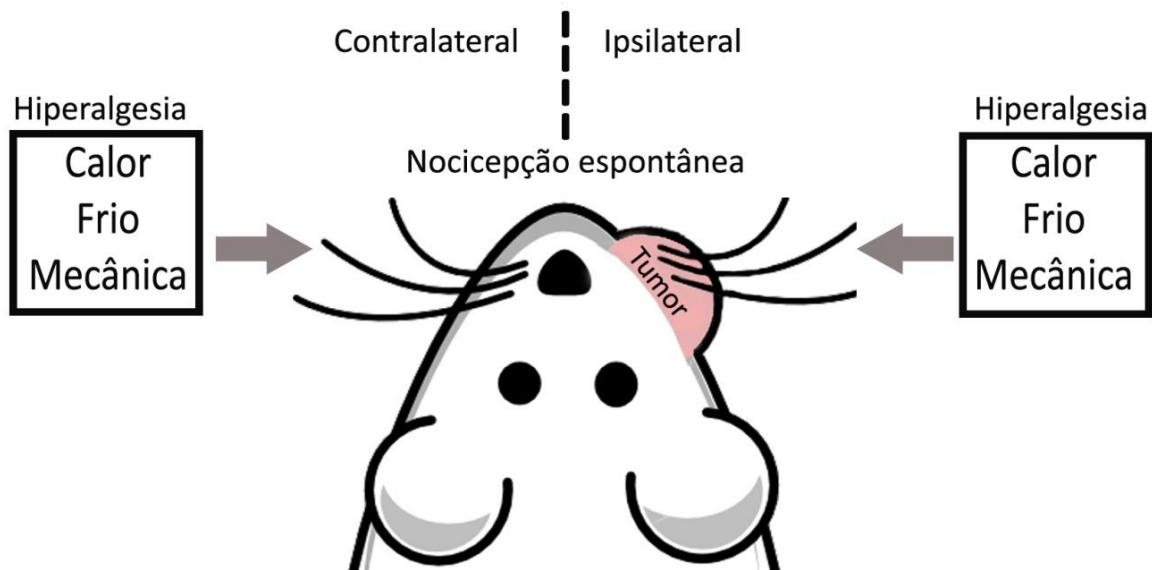
No presente estudo foi observada diferença de efeito do tratamento local com bosentana no comportamento de *grooming* espontâneo e no teste de CPP, como já descrito anteriormente. Dessa forma, de maneira especulativa, pode ser sugerido o envolvimento de mecanismos distintos para o desenvolvimento desses comportamentos. A eficácia do tratamento sistêmico com bosentana no *grooming* espontâneo e no teste de CPP pode estar relacionada a um efeito central da droga, devido a sua habilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Assim, a ocorrência desse efeito pode estar ocorrendo através de bloqueio de receptores endotelinérgicos em diferentes regiões do SNC, bem como no subnúcleo *caudalis*.

É importante ressaltar, que o antagonista não seletivo de receptores ET_A e ET_B, utilizado nesse estudo, a bosentana, já foi aprovado em diversos países pelas agências regulamentadoras responsáveis, incluindo o Brasil, para o tratamento de hipertensão pulmonar, o que facilita a investigação do efeito dessa droga em condições confirmadas da importância das endotelinas, além de aumentar a chance de que outros antagonistas sejam avaliados e aprovados para a utilização clínica. Nas dores associadas a diversos tipos de câncer, bem como em fenômenos relacionados ao desenvolvimento tumoral, as endotelinas têm se mostrado extremamente relevantes (para revisão ver BAGNATO et al., 2011; MCKENZIE et al., 2013; RUSSO et al., 2010).

Assim, os resultados desse estudo em conjunto mostram uma importante participação das endotelinas, bem como dos receptores ET_A e ET_B nas alterações sensoriais induzidas no modelo experimental de câncer de face em ratos, destacando sua melhor eficácia frente ao comportamento de dor espontânea, e sinergismo analgésico após o tratamento com antagonista de receptores de endotelina em combinação com morfina.

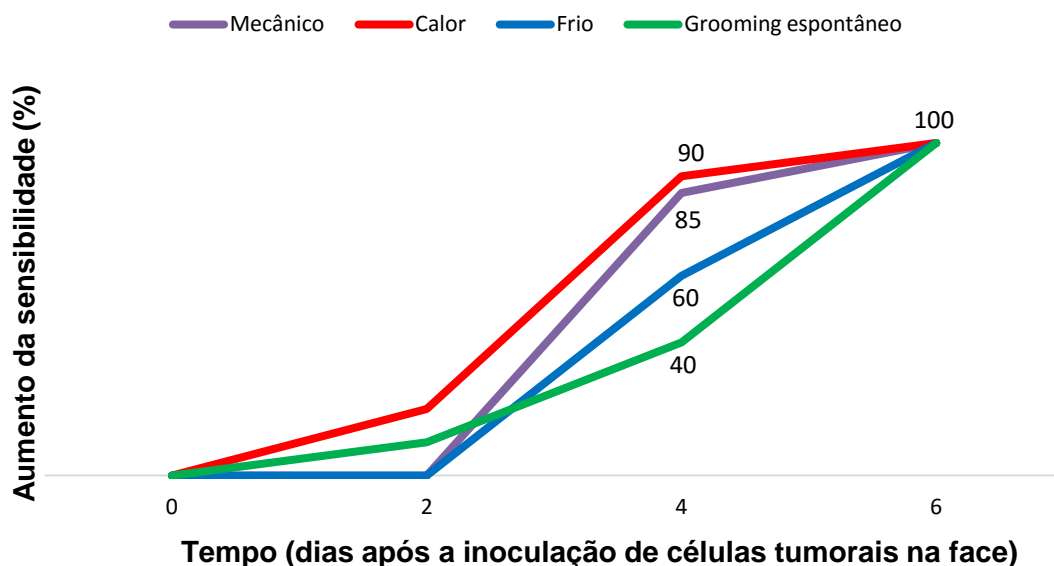
6 CONCLUSÃO

➤ A inoculação de células tumorais no lado direito da face de ratos, na região de inserção das vibrissas, induziu tumor facial, bem como o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica (ao frio e ao calor) bilateral e aumento do *grooming* espontâneo, comportamento sugestivo de dor espontânea (Esquema 1).



ESQUEMA 1 - Desenvolvimento de alterações sensoriais relacionadas à indução do tumor na face de ratos. Em rosa, verifica-se a localização da indução e do crescimento tumoral. Na região central, observa-se a indicação do desenvolvimento do *grooming* espontâneo. A linha pontilhada divide a região ipsilateral e contralateral à inoculação das células tumorais. As flechas apontam as regiões de aplicação dos estímulos mecânicos e térmicos e os quadrados indicam as respostas promovidas pela aplicação dos mesmos após a inoculação.

➤ À inoculação de células tumorais induziu alterações sensoriais evocadas (hiperalgesia ao frio, calor e mecânica) e espontânea (aumento do tempo de *grooming* facial), após indução do carcinoma, com pequenas variações no início do seu desenvolvimento, mas com pico no dia 6 após indução do tumor (Esquema 2).



ESQUEMA 2 - Decurso temporal do desenvolvimento das alterações sensoriais associadas à inoculação de células tumorais na face de ratos. As alterações sensoriais são significativas a partir do dia 4 (para estímulos calor e mecânico) ou 6 (para estímulo frio e *grooming* espontâneo), sendo que todas apresentam um pico no último dia de avaliação (o qual foi considerado 100%).

- O tratamento local ou sistêmico com morfina reduziu o *grooming* espontâneo e hiperalgesia térmica ao calor e ao frio, mas somente o reduziu a hiperalgesia mecânica e induziu preferência condicionada ao lugar (Esquema 3).
- O tratamento individual ou em associação com os antagonistas peptídicos dos receptores de endotelina, BQ-123 e BQ-788, não modificou a hiperalgesia térmica, nem o tempo de *grooming* facial. Já o bloqueio não seletivo dos receptores ET_A e ET_B, com o antagonista não peptídico bosentana, reduziu a hiperalgesia ao calor, bem como o *grooming* espontâneo (Esquema 3).
- A bosentana administrada sistemicamente reduziu a hiperalgesia ao calor e o *grooming* espontâneo, além de induzir CPP (Esquema 3).
- A hiperalgesia mecânica e térmica ao calor associadas ao tumor de face em ratos, ainda foi reduzida pela combinação sistêmica de morfina e bosentana, ambos em doses ineficazes quando administrados individualmente (Esquema 3).

Tratamento	Hiperalgisia mecânica	Hiperalgisia ao calor	Hiperalgisia ao frio	Grooming espontâneo	CPP
Morfina (L)	↔	↓	↓	↓	↔
Morfina (S)	↓	↓	↓	↓	↑
BQ-123 (L)	X	↔	X	↔	X
BQ-788 (L)	X	↔	X	↔	X
BQ-123/788 (L)	X	↔	X	↔	X
Bosentana (L)	X	↓	X	↓	↔
Lidocaína (L)	X	X	X	↓	↔
Bosentana (S)	↔	↓	X	↓	↑
Morfina/Bosentana (S)	↓	↓	X	X	X

ESQUEMA 3 - Influência dos diferentes tratamentos utilizados nesse estudo na hiperalgisia mecânica e térmica, *grooming* espontâneo e preferência condicionada ao lugar (CPP). Os símbolos ↓, ↑, ↔ e X indicam redução, indução, sem alteração e não avaliado, respectivamente. (L) e (S) indicam tratamento local e sistêmico, respectivamente.

Por fim, os resultados sugerem que as endotelinas, atuando sistemicamente através dos receptores ET_A e ET_B podem participar no desenvolvimento da hiperalgisia e dor espontânea associada ao carcinoma de face e indicam um potencial efeito antinociceptivo sinérgico entre morfina e antagonistas de endotelinas nessa condição. Além disso, a melhor eficácia da bosentana no controle da dor espontânea sugere uma nova estratégia farmacológica para o controle dessa qualidade de dor.

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA/BIO) da UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 645

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.034823/2012-11

APROVADO: 01/11/2012 – R.O. 10/2012

TÍTULO: Estudo do desenvolvimento de alterações sensoriais e avaliação da participação das endotelinas em um modelo de carcinoma orofacial

AUTORES: Juliana Geremias Chichorro, Caroline Machado Kopruszinski, Renata Cristiane dos Reis, Alexandra Acco

DEPARTAMENTO: Farmacologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, A.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; DREIFUSS, A. A. Characteristics and Applications of the Walker-256 Rat Tumour. In: S.G. Pandalai; Daniel Pouliquen (Org.). The rat in cancer research: a crucial tool for all aspects of translational studies. 1 ed. Trivandrum: Research Signpost/ Transworld Research Network, 2012, v. 1, p. 00-00.

AKIYAMA, T.; CARSTENS, M. I.; CARSTENS, E. Spontaneous itch in the absence of hyperalgesia in a mouse hindpaw dry skin model. **Neurosci Lett.** v. 484, n. 1, p. 62-65, 2010.

ALVES, A. P. N. N.; GUEDES, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. E. A. M.; PESSOA, C. O.; FERREIRA, F. V. A., MORAES, M. O. M. Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma developed in the oral cavity of rats. **Acta Cir Bras.** v. 19, n.4, 2004.

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.

AWANO, S.; DAWSON, L. A.; HUNTER, A. R, TURNER, A. J, USMANI, B. A. Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: Specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. **Int J Cancer.** v. 118, p. 1645–1652, 2006.

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; FRESNO, M. F.; LLAMES, S.; MEANA, A.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Implantation of tumoral XC cells induces chronic, endothelin-dependent, thermal hyperalgesia in mice. **Cell Mol Neurobiol.** v. 24, n. 2, p.269-281, 2004.

BAAMONDE, A.; LASTRA, A.; JUÁREZ.; GARCÍA, V.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L. Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 372, n. 3, p. 213-219, 2005.

BACHMANN-BRANDT, S.; BITTNER, I.; NEUHAUS, P.; FREI, U.; SCHINDLER, R. Plasma levels of endothelin-1 in patients with the hepatorenal syndrome after successful liver transplantation. **Transpl Int.** v. 13, p. 357-362, 2000.

BAE, Y. C.; YOSHIDA, A. Ultrastructural basis for craniofacial sensory processing in the brainstem. **Int Rev Neurobiol.** v. 97, p. 99-141, 2011.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol.** v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010.

BAGNATO, A.; LOIZIDOU, M.; PFLUG, B. R.; CURWEN, J.; GROWCOTT, J. Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. **Br J Pharmacol.** v. 163, p. 220-233, 2011.

BAGNATO, A.; SPINELLA, F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis.

Trends Endocrinol Metab. v. 14, n. 1, p. 44-50, 2002.

BAGNATO, A.; SPINELLA, F.; ROSANÒ, L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly target therapy. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 86, p.473–84, 2008.

BARR, T. P.; KAM, S.; KHODOROVA, A.; MONTMAYEUR, J. P.; STRICHARTZ, G. R. New perspectives on the endothelin axis in pain. **Pharmacol Res.** v. 63, n. 6, p. 532-540, 2011.

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.

BHALLA, S.; ANDURKAR, S. V.; GULATI, A. Neurobiology of opioid withdrawal: Role of the endothelin system. **Life Sci.** 2016.

BHALLA, S.; MATWYSHYN, G.; GULATI, A. Potentiation of morphine analgesia by BQ123, an endothelin antagonist. **Peptides.** v. 23, n. 10, p. 1837-1845, 2002.

BHALLA, S.; PAIS, G.; TAPIA, M.; GULATI, A. Endothelin ETA receptor antagonist reverses naloxone-precipitated opioid withdrawal in mice. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 93, n. 11, p. 935-944, 2015.

BHALLA, S.; ZHANG, Z.; PATTERSON, N.; GULATI, A. Effect of endothelin-A receptor antagonist on mu, delta and kappa opioid receptor-mediated antinociception in mice. **Eur J Pharmacol.** v. 635, n. 1-3, p. 62-71, 2010.

BONGENHIELM, U.; BOISSONADE, F. M.; WESTERMARK, A.; ROBINSON, P. P.; FRIED, K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. **Pain.** v. 82, p. 283-288, 1999.

BRÄNDLI, P.; LOFFLER, B. M.; BREU, V.; OSTERWALDER, R.; MAIRE, J.P.; CLOZEL, M. Role Of Endothelin In Mediating Neurogenic Plasma Extravasation In Rat Dura Mater. **Pain.** v. 64, p. 315-322, 1996.

BRIGATTE, P. SAMPAIO, S. C.; GUTIERREZ, V. P.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; CURI, R.; CURY, T. Walker-256 Tumor-Bearing Rats as a Model to Study Cancer Pain. **The Journal of Pain.** v. 8, n. 5, p. 412-421, 2007.

CALDERON, S. P.; REIS, K. R.; DA SILVA, P. M. B.; CONTI, P. C. R. Neurotransmissores e as dores orofaciais. **Rev Dor.** v. 10, n. 1, p. 51-55, 2009.

CAMPANA, I. G.; GOIATO, M. C. HEAD AND NECK TUMORS: EPIDEMIOLOGY, RISK FACTORS, DIAGNOSIS AND TREATMENT. **Revista Odontológica de Araçatuba.** v. 34, n. 1, p. 20-26, 2013.

CAAP, C.; ZENNING, N.; WAJNER, S.; MAIA, A. L. The role of vascular endothelial growth factor in tumor. **HCPA.** v. 29, n. 1, p. 51-59, 2009.

CARACENI, A. P. R. An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. **Pain.** v. 82, p. 263–74, 1999.

CARDUCCI, M. A.; JIMENO, A. Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonists. **Clin Cancer Res.** v. 1, p. 6296, 2006.

CONNELLY, S. T.; SCHMIDT, B. L. Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Pain.** v. 5, n. 9, p. 505-510.

COOPER, J. S.; PORTER, K.; MALLIN, K.; HOFFMAN, H. T.; WEBER, R. S.; ANG, K. K.; GAY, E. G.; LANGER, C. J. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. **Head Neck.** v. 31, n. 6, p. 748-758, 2009.

CHITAPANARUX, I.; LORVIDHAYA, V.; SITTITRAI, P.; PATTARASAKULCHAI, T.; THARAVICHITKUL, E.; SRIUTHAISIRIWONG, P.; KAMNERDSUPAPHON, P.; CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: Implications for therapy. **J Dent Res.** v. 87, p. 14–32, 2008.

CHICHORRO, J. G.; FIUZA, C. R.; BRESSAN, E.; CLAUDINO, R. F.; LEITE, D. F.; ERA, G. A. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: role of ETA and ETB receptors. **Brain Res.** v. 1345, p. 73-83, 2010.

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.** 43, n. 2, p. 133-142, 2009.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Exp Biol Med.** v. 231, p. 1136–1140, 2006a.

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, 2006b.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: Implications for therapy. **J Dent Res.** v. 87, p. 14–32, 2008.

CLINICALTRIALS.GOV

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01846286?term=01846286&rank=1>

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Genetic changes in head and neck cancer. **Rev Brasil Cancerol.** v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

CUFFARI, L.; TESSEROLI DE SIQUEIRA, J. T.; NEMR, K.; RAPAPORT, A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 102, n. 1, p. 56-61, 2006.

CURTO-REYES, V.; JUÁREZ, L.; GARCÍA-PÉREZ, E.; FRESNO, M. F.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L.; BAAMONDE, A. Local loperamide inhibits thermal hyperalgesia but not mechanical allodynia induced by intratibial inoculation of melanoma cells in mice. **Cell Mol Neurobiol.** v. 28; n. 7, p. 981-990, 2008.

DAHLOF, B.; GUSTAFSSON, D.; HEDNER, D.; JERN, S.; HANSSON, L. Regional hemodynamic effects of endothelin-1 in rat and man: unexpected adverse reactions. **J Hypert.** v. 8, p. 811-817, 1990.

DATTA, S.; PAI, U. T. Interventional approaches to management of pain of oral cancer. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** v. 18, n. 4, p. 627-641, 2006.

DEVAL, E.; GASULL, X.; NOËL, J.; SALINAS, M.; BARON, A.; DIOCHOT, S.; LINGUEGLIA, E. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. **Pharmacol Ther.** v. 128, n. 3, p. 549-558, 2010.

DIOS, D. P.; LESTÓN, J. S. Oral Cancer Pain. **Oral Oncology**, v. 46, p. 448-451, 2010.

DIXIT, R.; WEISSFELD, J. L.; WILSON, D. O.; BALOGH, P.; SUFKA, P.; SIEGFRIED, J. M.; GRANDIS, J. R.; DIERGAARDE, B. Incidence of head and neck squamous cell carcinoma among subjects at high risk of lung cancer results from the Pittsburgh Lung Screening Study. **Cancer.** v. 121, n. 9, p. 1431-1435, 2015.
DOSTROVSKY, J. O. Role of thalamus in pain. **Prog Brain Res.** v. 129, p. 245-245, 2000.

DOSTROVSKY, J. O. Chapter 10 Brainstem and thalamic relays. **Handb Clin Neurol.** v. 81, p. 127-139, 2006.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest.** v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

ELIAV, E.; GRACEY, R. H.; NAHLIELI, O.; BENOLIEL, R. Quantitative sensory testing in trigeminal nerve damage assessment. **J Orofac Pain.** v.18, n. 4, p. 339-344, 2004.

EPSTEIN, J. B.; WILKIE, D. J.; FISCHER, D. J.; KIM, Y. O.; VILLINES, D. Neuropathic and nociceptive pain in head and neck cancer patients receiving radiation therapy. **Head Neck Oncol.** v. 1, p. 26, 2009.

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. 773-787, 2011.

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 13, n.3, p. S220-S222, 1989.

FERNANDES, E. S.; FERNANDES, M. A.; KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol.** v.166, n. 2, p. 510-21, 2012.

FOULKES, T.; WOOD, J. N. Mechanisms of cold pain. *Channels (Austin)*. v. 1, n. 3, p. 154-156, 2007.

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.

FRIEDMAN, W. J.; GREENE, L. A. Neurotrophin signaling via Trks and p75. **Exp Cell Res**. v. 253, p. 131-142, 1999.

FUJITA, M.; ANDOH, T.; SAIKI, I.; KURASHI, Y. Involvement of endothelin and ETA endothelin receptor in mechanical allodynia in mice given orthotopic melanoma inoculation. **J Pharmacol Sci**. v. 106, p. 257 – 263, 2008.

GANDHI, C. R.; BERKOWITZ, D. E.; WATKINS, W. D. Endothelins. **Anesthesiol**. v. 80, n. 4, p. 892-905 , 1994.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neurosci Lett**. v. 619, p. 100-105, 2016.

GARCÍA, M. P. S.; GARCÍA-GARCÍA, A. Epigenome and DNA Methylation in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Methods Mol Biol**. v. 863, p. 207-219, 2012.

GEAR, R. W.; LEVINE, J. D. Nucleus accumbens facilitates nociception. **Exp Neurol**. v. 229, n. 2, p. 502-506, 2011.

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

GÓES, T, M, P, L.; FERNANDES, R, S, M. Neuralgia do trigêmeo: diagnóstico e tratamento. **Int J Dent**, v. 7, n. 2, p. 104-115, 2008.

GOKIN, A. P.; FAREED, M. U.; PAN, H. L.; HANS, G.; STRICHARTZ, G. R.; DAVAR, G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. **J Neurosci**. v. 21, n. 14, p. 5358-5366, 2001.

GORACA, A. New views on the role of endothelin. **Endocr Regul**. v. 36, p. 161–167, 2002.

GORSKY, M.; EPSTEIN, J. B.; OAKLEY, C.; LE, N. D.; HAY, J.; STEVENSON-MOORE, P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 98, n. 5, p. 546–52, 2004.

GUIMARÃES, F.; SCHANOSKI, A. S.; CAVALCANTI, T. C. S.; JULIANO, P.B.; VIEIRA-MATOS, A. N.; RETTORI, O. Tumor growth characteristics of the Walker-256 AR tumor, a regressive variant of the rat Walker-256 A tumor. **Braz Arch Biol Technol**. v. 53, n. 5, p. 1101-1108, 2010.

GULATI, A.; BHALLA, S.; MATWYSHYN, G. A novel combination of opiates and endothelin antagonists to manage pain without any tolerance development. **J Cardiovasc Pharmacol**. v. 44, S. 1, p. S129-31, 2004.

GRELIK, C.; BENNETT, G. J.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. **Eur J Neurosci.** v. 21, n. 9, p. 2475-2478, 2005.

HAMAMOTO, D. T.; KHASABOV, S. G.; CAIN, D. M.; SIMONE, D. A. Tumor-evoked sensitization of C nociceptors: a role for endothelin. **J Neurophysiol.** v. 100, p. 2300-2311, 2008.

HANS, G.; SCHMIDT, B. L.; STRICHARTZ, G. Nociceptive sensitization by endothelin-1. **Brain Res Rev.** v. 60, p. 36–42, 2009.

HARANO N, ONO K, HIDAKA K, KAI A, NAKANISHI O, INENAGA K. Differences between orofacial inflammation and cancer pain. **J Dent Res.** v. 89, n. 6, p.615-620, 2010.

HARDT, M.; LAM, D. K.; DOLAN, J. C.; SCHMIDT, B. L. Surveying proteolytic processes in human cancer microenvironments by microdialysis and activity-based mass spectrometry. **Proteomics Clin Appl.** v. 5; n. 11-12, p. 636-643, 2011.

HIDAKA, K.; ONO, K.; HARANO, N.; SAGO, T.; NUNOMAKI, M.; SHIIBA, S.; NAKANISHI, O.; FUKUSHIMA, H.; INENAGA, K. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. **Neuroscience.** v. 28, n. 180, p. 334-343, 2011.

HIRONAKA, K.; OZAKI, N.; HATTORI, H.; NAGAMINE, K.; NAKASHIMA, H.; UEDA, M.; SUGIURA, Y. Involvement of glial activation in trigeminal ganglion in a rat model of lower gingival cancer pain. Nagoya **J Med Sci.** v. 76, n. 3-4, p. 323-332, 2014.

HOFFMANN, R. R.; YURGEL, L. S.; CAMPOS, M. M. Endothelins and their receptors as biological markers for oral cancer. **Oral Oncol.** v. 46, n. 9, p. 644-647, 2010.

HUMMIG, W.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. **J Oral Facial Pain Headache.** v. 28, n. 4, p. 350-359., 2014.

INCA – Estimativa 2016. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11>.

ISHIMOTO, S.; WADA, K.; TANAKA, N.; YAMANISHI, T.; ISHIHAMA, K.; AIKAWA, T.; OKURA, M.; NAKAJIMA, A.; KOGO, M.; KAMISAKI, Y. Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. **Int J Oncol.** v. 40, n. 4, p. 1011-1019, 2012.

JAINKITTIVONG, A.; SWASDISON, S.; THANGPISITYOTIN, M.; LANGLAIS, R. P. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study of 342 Thai cases. **J Contemp Dent Pract.** v. 10, n. 5, p. 33–40, 2009.

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

KANDALAFT, L. E.; FACCIABENE, A.; BUCKANOVICH, R. J. Endothelin B receptor, a new target in cancer immune therapy. **Clin Cancer Res.** v. 15, 2009.

KHIMKI, A.; ROCKEY, D. C. Endothelin- biology and disease. **Cell Sing.** v. 22, p. 1615-1625, 2010.

KHODOROVA A, MONTMAYEUR JP, STRICHARTZ G. Endothelin receptors and pain. **J Pain.** v. 10, n. 1, p. 4-28, 2009.

KHODOROVA, A.; NAVARRO, B.; JOUAVILLE, L. S.; MURPHY, J. E.; RICE, F. L.; MAZURKIEWICZ, J. E.; LONG-WOODWARD, D.; STOFFEL, M.; STRICHARTZ, G. R.; YUKHANANOV, R.; DAVAR, G. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med.** v. 9, p. 1055-1061, 2003.

KIM, Y. O.; KIM, I. J.; YOON, M. H. Antiallodynic effect through spinal endothelin-B receptor antagonism in rat models of complex regional painsyndrome. **Neurosci Lett.** 2015.

<http://what-when-how.com/neuroscience/the-cranial-nerve-organization-of-the-central-nervous-system-part-3/>. Acessado em 29/08/2016.

KING, T.; VERA-PORTOCARRERO, L.; GUTIERREZ, T.; VANDERAH, T. W.; DUSSOR, G.; LAI, J.; FIELDS, H. L.; PORRECA, F. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. **Nat Neurosci.** v. 12, n. 11, p.1364-1366, 2009.

KITANO, Y.; KURIHARA, H.; KURIHARA, Y.; MAEMURA, K.; RYO, Y.; YAZAKI, Y.; HARII, K. Gene expression of bone matrix proteins and endothelin receptors in endothelin-1-deficient mice revealed by in situ hybridization. **J Bone Miner Res.** v. 13, p. 237-244, 1998.

KOLOKYTHAS, A.; COX, D. P.; DEKKER, N.; SCHMIDT, B. L. Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? **J Oral Maxillofac Surg.** v. 68, n. 6, p. 1290-1295, 2010.

LAHAV, R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. **Int J Dev Biol.** v. 49, p. 173-180, 2005.

LAHAV, R.; HEFFNER, G.; PATTERSON, P. H. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, p. 11496-11500, 1999.

LAM, D. K.; SCHMIDT, B. L. Orofacial pain onset predicts transition to head and neck cancer. **Pain.** v. 152, p.1206-1209, 2011.

LIST, M. A.; STRACKS, J.; COLANGELO, L.; BUTLER, P.; GANZENKO, N.; LUNDY, D.; SULLIVAN, P.; HARAF, D.; KIES, M.; GOODWIN, W.; VOKES, E. E. How Do head and neck cancer patients prioritize treatment outcomes before initiating treatment? **J Clin Oncol.** v. 18, n. 4, p. 877-884, 2000.

LLORIÁN-SALVADOR, M.; PEVIDA, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. T.; LASTRA, A.; OBAYA, A.; CAL, S.; HIDALGO, A.; MENÉNDEZ, L.; BAAMONDE, A. Hypernociceptive responses following the intratibial inoculation of RM1 prostate cancer cells in mice. **Prostate**. v. 75, n. 1, p. 70-83, 2015.

LUGER, N.M.; SABINO, M. A.; SCHWEI, M. J.; MACH, D. B.; POMONIS, J. D.; KEYSER, C. P.; RATHBUN, M.; CLOHISY, D. R.; HONORE, P.; YAKSH, T. L.; MANTYH, P. W. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. **Pain**. v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

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.

MANKAPURE, P. K.; BARPANDE, S. R.; BHAVTHANKAR, J. D.; MANDALE, M. Serum big endothelin-1 as a biomarker in oral squamous cell carcinoma patients: an analytical study. **J Appl Oral Sci**. v. 23, n. 5, p. 491-496., 2015.

MANTYH, P.; CLOHISY, D.; KOLTZENBURG, M.; HUNT, S. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nat Rev Cancer**. v. 2, n. 3, p. 201-209, 2002.

MANTYH, P. W. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. **Nat Rev Neurosci**. v. 7, n. 10, p. 797-809, 2006.

MANTYH, P. W. A mechanism based understanding of cancer pain. **Pain**. v. 96, n. 1-2, p. 1-2, 2002.

MANTYH, W. G.; JIMENEZ-ANDRADE, J. M.; STAKE, J. I.; BLOOM, A. P.; KACZMARSKA, M. J.; TAYLOR, R. N.; FREEMAN, K. T.; GHILARDI, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; MANTYH, P. W. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. **Neuroscience**. v. 171, n. 2, p. 588-598, 2010.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clin Proc**. v. 91, n. 3, p. 386-396, 2016.

MASAKI, T. Historical Review: Endothelin. **Trends Pharmacol Sci**. v. 25, n. 4, p. 219-224, 2004.

MATWYSHYN, G. A.; BHALLA, S.; GULATI, A. Endothelin ETA receptor blockade potentiates morphine analgesia but does not affect gastrointestinal transit in mice. **Eur J Pharmacol**. v. 543, n. 1-3, p. 48-53, 2006.

MCAULEY, M. A.; BREU, V.; GRAHAM, D. I.; MCCULLOCH, J. The effects of bosentan on cerebral blood flow and histopathology following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Eur J Pharmacol**. v. 307, p. 171-181, 1996.

MENÉNDEZ, L.; LASTRA, A.; HIDALGO, A.; MEANA, A.; GARCÍA, E.; BAAMONDE, A. Peripheral opioids act as analgesics in bone cancer pain in mice. **Neuroreport**. v.

14, n. 6, p. 867-869, 2003.

MERCADANTE, S. Management of cancer pain. **Intern Emerg Med.** v. 5, Suppl 1, S31-5, 2001.

MERCADANTE, S. Managing Breakthrough Pain. **Curr Pain Headache Rep.** v. 15, n. 4, p. 244-249, 2011.

MERCADANTE, S. Pharmacotherapy for breakthrough cancer pain. **Drugs.** v. 72, p. 181-190, 2012.

MERCADANTE, S.; FULFARO, F. World Health Organization guidelines for cancer pain: a reappraisal. **Ann Oncol.** v. 16, Suppl 4, S132-135, 2005.

MERCADANTE, S.; GIARRATANO, A. The long and winding Road of non steroidal antiinflammatory drugs and paracetamol in câncer pain management: A critical review. **Crit Rev Oncol Hematol.** v. 87, p. 140-145, 2013.

MCKENZIE, G. A.; HINSLEY, E. E.; HUNTER, K.; LAMBERT, D. W. The endothelin axis in head and neck cancer: a promising therapeutic opportunity? **J Oral Pathol Med.** v. 43, n. 6, 2014.

MIKA, J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. **Pharmacol Rep.** v. 60, n. 3, p. 297-307, 2008.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERA, H.; TSHUCHIDA, H. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochem Mol Biol Int.** v. 47, p. 707-714, 1999.

NAGAMINE, K. et al. Mechanical Allodynia and Thermal Hyperalgesia Induced by Experimental Squamous Cell Carcinoma of the Lower Gingiva in Rats. **The Journal of Pain.** v. 7, n. 9, p. 659-670, 2006.

NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; KING, T.; PORRECA, F. Evaluation of reward from pain relief. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1282, p. 1-11, 2013.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nat Neurosci.** v. 17, n. 10, p. 1304-1312, 2014.

NAVRATILOVA, E.; MORIMURA, K.; XIE, J. Y.; ATCHERLEY, C. W.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Positive emotions and brain reward circuits in chronic pain. **J Comp Neurol.** v. 524, n. 8, p. 1646-1652, 2016.

NONES, C. F.; REIS, R. C.; JESUS, C. H.; VERONEZ, D. A.; CUNHA, J. M.; CHICHORRO, J. G. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Res.** v. 1501, p. 56-67, 2013.

ONO, K.; HARANO, N.; INENAGA, K.; NAKANISHI, O. A rat pain model of facial cancer. **Methods Mol Biol.** v. 85, p. 49-57, 2012.

ONO, K.; HARANO, N.; NAGAHATA, S.; SETA, Y.; TSUJISAWA, T.; INENAGA, K.; NAKANISHI, O. Behavioral characteristics and c-Fos expression in the medullary dorsal horn in a rat model for orofacial cancer pain. **Eur J Pain**. v. 13, n. 4, p. 373-379, 2009.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**. v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**. 8, n. 2, p. 143-151, 2014.

PALAZZO, E.; LUONGO, L.; DE NOVELLIS, V. ROSSI, F.; MARABESE, I.; MAIONE, S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. **Curr Opin Pharmacol**. v.12, n. 1, p. 9-17, 2012.

PAICE, J. A.; FERRELL, B. The management of cancer pain. **CA Cancer J Clin**. v. 61, n. 3, p. 157-182, 2011.

PARISE, L. V.; LEE, J.; JULIANO, R. L. New aspects of integrin signaling in cancer. **Semin Cancer Biol**. v. 10, n. 6, p. 407-414, 2000.

PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L. P. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J Can Dent Assoc**. v. 73, n. 4, p. 339-344, 2007.

PETERS, C. M.; LINDSAY, T. H.; POMONIS, J. D.; LUGER, N. M.; GHILARDI, J. R.; SEVCIK, M. A.; MANTYH, P. W. Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. **Neuroscience**. v. 126, n. 4, p. 1043-1052, 2004.

PICKERING, V. Effect of peripheral endothelin-1 concentration on carcinoma-induced pain in mice. **Eur J Pain**. v. 12, p. 293-300, 2008.

PICKERING, V.; JORDAN, R. C.; SCHMIDT, B. L. Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients--a pilot study. **Oral Oncol**. v. 43, n. 1, p. 37-41, 2007.

PFLUG, B. R.; ZHENG, H.; UDAN, M. S. Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. **Cancer Lett**. v. 246, p. 139-148, 2007.

PLANT, T. D.; ZÖLLNER, C.; MOUSA, S. A.; OKSCHE, A. Endothelin-1 potentiates capsaicin-induced TRPV1 currents via the endothelin A receptor. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 231, n. 6, p. 1161-1164, 2006.

PLANT, T. D.; ZÖLLNER, C.; KEPURA, F.; MOUSA, S. S.; EICHHORST, J.; SCHAEFER, M.; FURKERT, J.; STEIN, C.; OKSCHE, A. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. **Mol Pain**. v. 3, p. 35, 2007.

PORTENOY, R. K.; LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet**. v. 15, n. 353, p. 1695-1700, 1999.

PORTENOY, R. K.; PAYNE, D.; JACOBSEN, P. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. **Pain**. v. 81, n.1-2, p. 129-134, 1999.

QUANG, P. N.; SCHMIDT, B. L. Endothelin-A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain through opioids in mice. **J Pain**. v. 11, n. 7, p. 663-71, 2010a.

QUANG, P. N.; SCHMIDT, B. L. Peripheral endothelin B receptor agonist-induced antinociception involves endogenous opioids in mice. **Pain**. v. 149, n. 2, p. 254-262, 2010b.

REMENIUK, B.; SUKHTANKAR, D.; OKUN, A.; NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; KING, T.; PORRECA, F. Behavioral and neurochemical analysis of ongoing bone cancer pain in rats. **Pain**. v. 156, n. 10, p. 1864-1873, 2015.

ROSANO, L.; SPINELLA, F.; BAGNATO, A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**. v. 13, n. 9, p. 637-51, 2013.

RUPAREL, S.; BENDELE, M.; WALLACE, A.; GREEN, D. Released lipids regulate transient receptor potential channel (TRP)-dependent oral cancer pain. **Mol Pain**. v. 11, p. 30, 2015.

RUSSO, A.; BRONTE, G.; RIZZO, S.; FANALE, D.; DI GAUDIO, F.; GEBBIA, N.; BAZAN, V. Anti-endothelin drugs in solid tumors. **Expert Opin Emerg Drugs**. v. 15, n. 1, p. 27-40, 2010.

SAGO, T.; ONO, K.; HARANO, N.; FURUTA-HIDAKA, K.; HITOMI, S.; NUNOMAKI, M.; YOSHIDA, M.; SHIIBA, S.; NAKANISHI, O.; MATSUO, K.; INENAGA, K. Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model. **Brain Res**. v. 1457, p. 70-80, 2012.

SAKAI, E.; TSUCHIDA, N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. **Oncogene**. v. 7, n. 5, p. 927-933, 1992.

SALANI, D.; TARABOLETTI, G.; ROSANO, L. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. **AmJPathol**. v. 157, p. 1703-7111, 2000.

SAMEK, M.; ZECH, D.; GROND, S. Pain-relieving therapy for 57 patients with malignancies in the head and neck area. **Dtsch Zahnarztl Z**. v. 45, p. 49-51, 1990.

SAYEED, K.; KAUR, A.; BHASKER, S.K.; PANT, A. B. Profile of Cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-10) in Eyelid Tumors. **J Case Rep Stud**. v. 3, n. 6, p. 607, 2015.

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. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol.** v. 71, n. 4, p. 117-136, 2005.

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.

SIEGEL, A.; HREDAY, S. Essential Neuroscience. 3 ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia-USA, 2005, v. 1.

SCHMIDT, B. L. The neurobiology of cancer pain. **Neuroscientist.** v. 20, n. 5, n. 546-562, 2014.

SCHMIDT, B. L. The Neurobiology of Cancer Pain. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 73, n. 12 Suppl, p. S132-S135, 2015.

SCHMIDT, B. L.; HAMAMOTO, D. L.; SIMONE, D. A.; WILCOX, G. L. Mechanism of cancer pain. **Mol Interv.** v. 10, n. 3, p. 164-178, 2010.

SCHMIDT, B. L.; PICKERING, V.; LIU, S.; QUANG, P.; DOLAN, J.; CONNELLY, S. T.; JORDAN, R. C. Peripheral endothelin-A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain. **Eur J Pain.** v. 11, p. 406–414, 2007.

SCULLY, C.; BAGAN, J. V. Recent advances in Oral Oncology. **Oral Oncol.** v. 43, n. 2, p.107-115, 2007.

SHICHIRI, M.; KATO, H.; MARUMO, F.; HIRATA, Y. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. **Hypertension.** v. 30, p. 1198-1203, 1997.

SHINODA, M.; OGINO, A.; OZAKI, N.; URANO, H.; HIRONAKA, K.; YASUI, M.; SUGIURA, Y. Involvement of TRPV1 in nociceptive behavior in a rat model of cancer pain. **J Pain.** v. 9, n. 8, p. 687-699, 2008.

SMITH, T. P.; HAYMOND, T.; SMITH, S. N.; SWEITZER, S. M. Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. **J Pain Res.** v. 7, p. 531-545, 2014.

SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmacol Ther.** v. 68, n. 3, p. 435-471, 1995.

SPRADLEY, J. M.; DAVOODI, A.; CARSTENS, M. I.; CARSTENS, E. Opioid modulation of facial itch- and pain-related responses and grooming behavior in rats. **Acta Derm Venereol.** v. 92, n. 5, p. 515-520, 2012.

SUGIURA, T.; INOUE, Y.; MATSUKI, R.; ISHII, K.; TAKAHASHI, M.; ABE, M.; SHIRASUNA, K. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. **Int J Oncol.** v. 34, p. 673–680, 2009.

TAI, L. W.; HUNG, V. K.; MEI, W.; QIU, Q.; CHUNG, S. K.; CHEUNG, C. W. Effects of repeated central administration of endothelin type A receptor antagonist on the development of neuropathic pain in rats. **Biomed Res.** v. 2013, p. 529871, 2013.

TAL, M.; DEVOR, M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. **Brain Res.** v. 579, n. 1, p.148-151, 1992.

TANAKA, T.; NAKAYAMA, H.; YOSHITAKE, Y.; IRIE, A.; NAGATA, M.; KAWAHARA, K.; TAKAMUNE, Y.; YOSHIDA, R.; NAKAGAWA, Y.; OGI, H.; SHINRIKI, S.; OTA, K.; HIRAKI, A.; IKEBE, T.; NISHIMURA, Y.; SHINOHARA, M. Selective inhibition of nuclear factor- κ B by nuclear factor- κ B essential modulator-binding domain peptide suppresses the metastasis of highly metastatic oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.** v. 103, n. 3, p. 455-463, 2012.

TAMAGAWA, T.; SHINODA, M.; HONDA, K.; FURUKAWA, A.; KAJI, K.; NAGASHIMA, H.; AKASAKA, R.; CHEN, J.; SESSLE, B. J.; YONEHARA, Y.; IWATA, K. Involvement of Microglial P2Y₁₂ Signaling in Tongue Cancer Pain. **J Dent Res.** 2016 [Epub ahead of print].

TAMKUS, D.; AL-JANADI, A.; FINK, G.; KRISHNAN, G.; DIMITROV, N. V. Endothelins as a Potential Target for Anticancer Therapy. **J Cancer Mol.** v. 4, n. 6, p. 163-167, 2009.

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.

TANG, Y.; PENG, H.; LIAO, Q.; GAN, L.; ZHANG, R.; HUANG, L.; DING, Z.; YANG, H.; YAN, X.; GU, Y.; ZANG, X.; HUANG, D.; CAO, S. Study of breakthrough cancer pain in an animal model induced by endothelin-1. **Neurosci Lett.** v. 617, p.108-115, 2016.

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.

UPADHYAY, J.; KNUDSEN, J.; ANDERSON, J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Noninvasive mapping of human trigeminal brainstem pathways. **Magn Reson Med.** v. 60, n. 5, p. 1037-1046, 2008.

VIET, C. T.; SCHMIDT, B. L. Biologic mechanisms of oral cancer pain and implications for clinical therapy. **J Dent Res.** v. 91, n. 5, p. 447-453, 2012.

VIET, C. T.; YE, Y.; DANG, D.; LAM, D. K.; ACHDJIAN, S.; ZHANG, J.; SCHMIDT, B. L. Re-expression of the methylated EDNRB gene in oral squamous cell carcinoma attenuates cancer-induced pain. **Pain.** v. 152, n. 10, p. 2323-2332, 2011.

WACNIK, P. W.; EIKMEIER, L. J.; SIMONE, D. A.; WILCOX, G. L.; BEITZ, A. J. Nociceptive characteristics of tumor necrosis factor-alpha in naive and tumor-bearing mice. **Neuroscience.** v. 132, p. 479-491, 2005.

WANG, R.; DASHWOOD, R. H. Endothelins and their receptors in cancer: identification of therapeutic targets. **Pharmacol Res.** v. 63, n. 6, p. 519-524, 2011.

WEBB, M. L.; MEEK, T. D. Inhibitors of endothelin. **Med Res Rev.** v. 17, n. 1, p. 17-67, 1997.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol.** v. 121, p. 417-424, 1997.

World Health Organization. Cancer pain relief and palliative care. Report of a WHO expert committee [World Health Organization Technical Report Series, 804. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1990. p. 1–75.

WU-WONG, J. R.; CHIOU, W. J.; DICKINSON, R.; OPGENORTH, T. J. Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. **Biochem J.** v. 328, p. 733-737, 1997.

XIE, Y. F.; JIANG, X. H.; SESSLE, B. J.; YU, X. M. Development of regional specificity of spinal and medullary dorsal horn neurons. *World J Biol Chem.* v. 7, n. 1, p. 138-145, 2016.

YEN, L. D.; BENNETT, G. J.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Sympathetic sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the glabrous skin of the rat hind paw following partial peripheral nerve injury. **J Comp Neurol.** v. 495, p. 679–690, 2006.

YE, Y.; DANG, D.; ZHANG, J.; VIET, C. T.; LAM, D. K.; DOLAN, J. C.; GIBBS, J. L.; SCHMIDT, B. L. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. **Mol Cancer Ther.** v. 10, n. 9, p. 1667-1676, 2011.

YE, Y.; ONO, K.; BERNABÉ, D. G.; VIET, C. T.; PICKERING, V.; DOLAN, J. C.; HARDT, M.; FORD, A. P.; SCHMIDT, B. L. Adenosine triphosphate drives head and neck cancer pain through P2X2/3 heterotrimers. *Acta Neuropathol Commun.* v. 2, p. 62, 2014.

YIN, K.; ZIMMERMANN, K.; VETTER, I.; LEWIS, R. J. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. **Biochem Pharmacol.** v. 93, n. 2, p. 125-140, 2015.

YUYAMA, H.; KOAKUTSU, A.; FUJIYASU, N.; TANAHASHI, M.; FUJIMORI, A.; SATO, S.; SHIBASAKI, K.; TANAKA, S.; SUDOH, K.; SASAMATA, M.; MIYATA, K. Effects of selective endothelin ET(A) receptor antagonists on endothelin-1-induced potentiation of cancer pain. **Eur J Pharmacol.** v. 492, n. 2-3, p.177-82, 2004.

VOLKOW, N.; LI, T. Drugs and alcohol: treating and preventing abuse, addiction and their medical consequences. **Pharmacol Ther.** v. 108, p. 3–17, 2005.

ZUCCO, F.; BONEZZI, C.; FORNASARI, D. Breakthrough cancer pain (BTcP): a synthesis of taxonomy, pathogenesis, therapy, and good clinical practice in adult patients in Italy. **Adv Ther.** v. 31, n. 7, p. 657-682, 2014.