

EDUARDO MANOEL PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE RECEPTORES NMDA  
PARA GLUTAMATO NA NOCICEPÇÃO  
OROFACIAL AGUDA E CRÔNICA EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio.

Co-orientadora: Prof. Dra. Daniela de Almeida Cabrini.

CURITIBA

2006

Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.

Sócrates

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, por colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.

Aos animais, pela evidente contribuição neste trabalho, e aos funcionários do biotério, pela prestatividade.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio e à Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini, por toda a paciência, respeito, instrução e confiança na minha capacidade e no meu trabalho.

A toda a minha família, especialmente minha mãe, Sandra, pelo apoio sempre incondicional.

Às minhas amigas-irmãs Márcia, Lucélia, Mariza e Scheila: muito obrigado por terem colocado tanta sabedoria, cuidado e fé em nossa amizade e por compartilhar tantas coisas boas! Obrigado por acreditarem e confiarem em mim, por saberem que podem contar comigo e por terem pedido minha ajuda quando precisaram... Agradeço também por terem sido sempre honestas comigo, gentis e presentes quando necessitei. Enfim, obrigado por serem amigas de tantas e diferentes formas e se importarem comigo. Minha gratidão a vocês é eterna! Essa vitória também é de vocês, meninas!!

À companheira de pesquisa Juliana Geremias Chichorro, pela paciência, compreensão e todos os ensinamentos e às colegas de laboratório Maria Fernanda, Shirley, Evelise, Franciane e Nair pela boa companhia e convivência.

Aos seguintes amigos, cuja pureza de coração e nobreza de caráter sempre me foram revigorantes: Paulinho, Yanna, Éliana e Vivien, Kerly e Rosicler, Sílvia e Linda, Patrícia, Inara, Ângela e Marcelo, Evelylyn, Jaqueline e Juliane. Agradeço-os pela compreensão e bondade com que fui recebido e tratado.

Aos amigos, que, mesmo apesar da distância, mantiveram-se sempre presentes: Cristiane, Fabíola e Dilmar, Rêicila, Tati Cristina, Mariane, Gislaine e Lívia.

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

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Vias ascendentes da nocicepção – primeira conexão.....	5
FIGURA 2	Vias ascendentes da nocicepção – segunda conexão.....	6
FIGURA 3	Nervo trigêmio e suas ramificações em humanos.....	21
FIGURA 4	Nervo trigêmio e suas ramificações em ratos.....	22
PRANCHA 1	Cirurgia de constrição do nervo infra-orbital.....	32
PRANCHA 2	Teste de hiperalgesia ao frio.....	35
PRANCHA 3	Teste de hiperalgesia ao calor.....	35
FIGURA 5	Indução de nocicepção através da injeção de diferentes doses de glutamato na região orofacial.....	41
FIGURA 6	Hiperalgesia ao estímulo de frio induzida por glutamato.....	43
FIGURA 7	Hiperalgesia ao estímulo de calor induzida por glutamato.....	44
FIGURA 8	Efeito da lamotrigina sobre a nocicepção induzida por glutamato administrado na região orofacial.....	46
FIGURA 9	Efeito da memantina sobre a nocicepção induzida por glutamato administrado na região orofacial.....	47
FIGURA 10	Efeito do MK-801 sobre a nocicepção induzida por glutamato administrado na região orofacial.....	48
FIGURA 11	Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a hiperalgesia ao frio em animais sensibilizados com glutamato.....	51
FIGURA 12	Efeito do tratamento com memantina sobre a hiperalgesia ao frio em animais sensibilizados com glutamato.....	52
FIGURA 13	Efeito do tratamento com MK-801 sobre a hiperalgesia ao frio em animais sensibilizados com glutamato.....	53
FIGURA 14	Efeito da constrição do nervo infraorbital sobre a sensibilidade ao estímulo térmico (frio).....	56
FIGURA 15	Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CCNI.....	57
FIGURA 16	Efeito do tratamento com memantina sobre a hiperalgesia ao	

	frio em animais submetidos à CCNI.....	58
FIGURA 17	Efeito do tratamento com MK-801 sobre a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CCNI.....	59
FIGURA 18	Efeito da constrição do nervo infraorbital sobre a sensibilidade ao estímulo de calor.....	62
FIGURA 19	Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.....	63
FIGURA 20	Efeito do tratamento com memantina sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.....	64
FIGURA 21	Efeito do tratamento com MK-801 sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.....	65
FIGURA 22	Efeito do tratamento com lamotrigina e memantina sobre a coordenação motora.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPA - ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico**

**CCK – colecistocinina**

**CCK<sub>B</sub> – receptor de colecistocinina subtipo B**

**CCNI – constrição crônica do nervo infraorbital**

**GABA - ácido  $\gamma$ -amino-butírico**

**IL - interleucina**

**mGluRs – receptores metabotrópicos para glutamato**

**Na<sub>v</sub> – canal de sódio dependente de voltagem**

**NGF - Fator de Crescimento Neural**

**NK – neurocinina**

**NMDA - N-metil-D-aspartato**

**NO - óxido nítrico**

**PKC - proteína quinase C**

**TNF - fator de necrose tumoral**

**TRP – receptor de potencial transitório**

**TRPA (ou ANKTM1) - receptor de potencial transitório do tipo relacionado à proteína anquirina 1**

**TRPC - receptor de potencial transitório clássico**

**TRPV - receptor de potencial transitório do tipo vanilóide**

**TRPM - receptor de potencial transitório do tipo melastatina**

**TRPML - receptor de potencial transitório do tipo mucolipina**

**TRPP - receptor de potencial transitório do tipo policistina**

**VR1- receptor vanilóide 1**

**VRL-1 – receptor similar ao vanilóide**

## RESUMO

As dores aguda e crônica originadas na região orofacial são percebidas através do sistema sensorial trigeminal, que apresenta características anatômicas e neuroquímicas distintas do gânglio da raiz dorsal. Entretanto, relativamente poucos estudos focam o sistema sensorial trigeminal. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, e conduz informações referentes a estímulos nocivos. Para investigar o envolvimento do glutamato na transdução nociceptiva da dor aguda na região orofacial, foi realizada a injeção de glutamato no lábio superior de ratos e observado o tempo de *grooming* facial induzido e a hiperalgesia a estímulos nocivos de frio e calor. Para avaliar a função do glutamato na dor crônica, foram observados o tempo de *grooming* facial induzido pela constrição crônica do nervo infraorbital em resposta a um estímulo nocivo de frio e o tempo de resposta a um estímulo nocivo de calor. Todos os experimentos foram realizados em ratos machos Wistar pesando entre 180-240 g. Para o teste de dor aguda, após um período de ambientação, os animais receberam glutamato 10,0 mM (50 µL) na região orofacial e a resposta nociceptiva foi avaliada durante 15 minutos. Em seguida, foi verificado se o glutamato induzia hiperalgesia a estímulos de frio e calor, através da aplicação de um spray de tetrafluoroetano e de uma fonte de calor na região orofacial (14 e 45 °C, respectivamente). Os resultados são apresentados na forma de porcentagem de redução: a lamotrigina (anticonvulsivante, bloqueador de canais de sódio) 3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg i.p. reduziu a nocicepção causada pelo glutamato (71,6%, 86,5% e 112,4%) e a sensibilização ao estímulo de frio (78,5%, 96,8% e 133,4%), respectivamente. A memantina (antagonista não competitivo de receptores NMDA) 0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg v.o. inibiu a nocicepção induzida por glutamato (69,5%, 84,2% e 106,6%) e a sensibilização ao frio, respectivamente (55,1%, 64,1% e 100,1%). A aplicação orofacial do MK-801, (antagonista não competitivo de receptores NMDA) 5,0 e 10,0 nM (50 µL) resultou em inibição da nocicepção causada por glutamato (104,9% e 113,2%) e da sensibilização ao frio (50,8% e 64,1%), respectivamente. Não houve sensibilização ao estímulo de calor. Para os testes de dor crônica, os animais passaram pela cirurgia de constrição do nervo infraorbital, que consistiu de duas amarras frouxas realizadas com fio de seda em torno do próprio. Quatro dias após a ligação do nervo, os animais apresentaram hiperalgesia ao estímulo de frio e, seis dias após, hiperalgesia ao estímulo de calor. A hiperalgesia ao frio causada pela constrição do nervo infraorbital, foi atenuada pela lamotrigina 3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg i.p. (34,7%, 42,1% e 92,8%, respectivamente), pela memantina 0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg v.o. (46,4%, 99,8% e 92,9%) e pelo MK-801 5,0 e 10,0 nM (46,1% e 45,1%). A hiperalgesia ao calor foi reduzida em 78,4%; 74,7% e 47,7% pela lamotrigina (30,0 mg/Kg, i.p.), memantina (3,0 mg/Kg, v.o.) e MK-801 (5,0 nM, orofacial), respectivamente. Os resultados sugerem que a nocicepção e a sensibilização causadas pelo glutamato na região orofacial envolvem a ativação de canais de sódio dependentes da voltagem e receptores NMDA centrais e periféricos. A dor neuropática do trigêmeo compartilha dos mesmos eventos, contudo, a lesão do nervo infraorbital foi capaz de produzir mudanças mais drásticas que a aplicação do glutamato, uma vez que foi observada hiperalgesia às duas formas de estimulação térmica na primeira situação e apenas hiperalgesia ao frio na primeira. A reversão da hiperalgesia térmica pela aplicação periférica de MK-801 sugere a existência de receptores NMDA na região orofacial e que a liberação de glutamato pode estar ocorrendo periféricamente. O bloqueio da hiperalgesia térmica por antagonistas de receptores NMDA sugere que pode haver uma comunicação cruzada entre estes e os recém descobertos receptores de potencial transitório (canais TRP), responsáveis pela transdução de estímulos térmicos nocivos.

## ABSTRACT

Acute and chronic pain in the orofacial region is sensed by the trigeminal sensorial system, which shows different anatomic and neurochemical features from the dorsal root ganglia. However, relatively few studies have been conducted concerning the trigeminal sensorial system. Glutamate is the main excitatory neurotransmitter which conveys information concerning noxious stimuli. In order to investigate the involvement of glutamate in the nociceptive signal transduction of pain in the orofacial region, rats received glutamate in the upper lip and the induction of facial grooming was observed, as well as the sensitization to noxious heat and cold stimuli. To assess the role of glutamate in chronic pain, the total time of facial grooming induced by cold and the reaction time to a heat stimulus after chronic constriction of the infraorbital nerve were observed. All experiments were conducted using male Wistar rats whose weight ranged from 180 to 240 g. To test acute pain, after a short period of habituation, rats were applied orofacial glutamate 10 mM (50  $\mu$ L) and the nociceptive answer was measured during 15 minutes. After this, the induction of sensitization to cold and heat stimuli was verified, through the application of a tetrafluoroethane spray or by a radiant heat source on the orofacial region, (14 and 45  $^{\circ}$ C, respectively). The results are expressed as percentage of reduction: lamotrigine (anticonvulsant, voltage-gated sodium channels blocker) 3.0; 10.0 and 30.0 mg/Kg i.p. reduced the nociception induced by glutamate (71.6%, 86.5% and 112.4%, respectively) and cold sensitization (78.5%, 96.8% and 133.4%). Memantine (non-competitive NMDA receptor antagonist) 0.3; 1.0 and 3.0 mg/Kg p.o. inhibited glutamate-induced nociception (69.5%, 84.2% and 106.5%, respectively) and cold sensitization (55.1%, 64.1% and 100.1%). MK-801, given orofacial (non-competitive NMDA receptor antagonist) 5.0 and 10.0 nM (50  $\mu$ L, in the upper lip) also resulted in inhibition of glutamate-induced nociception (104.9% and 113.2%, respectively) and cold sensitization (50.8% e 64.1%). There was no heat sensitization in this test. To test the role of glutamate in chronic pain, the animals went through chronic constriction of the infraorbital nerve, which consisted of two loose silk ligatures around the nerve. Four days after the surgery, the rats showed intense cold, and, six days after, heat hyperalgesia. Cold hyperalgesia induced by chronic constriction of the infraorbital nerve was attenuated by lamotrigine 3.0; 10.0 and 30.0 mg/Kg i.p. (34.7%, 42.1% and 92.8%, respectively), by memantine 0.3; 1.0 and 3.0 mg/Kg p.o. (46.4%, 99.8% and 92.9%) and by MK-801 5.0 and 10.0 nM (in the upper lip) (46.1% and 45.1%). Heat hyperalgesia was blocked in 78.4%; 74.7% and 47.7% by lamotrigine (30.0 mg/Kg, i.p.), memantine (3.0 mg/Kg, p.o.) and MK-801 (5.0 nM, orofacial), respectively. The results suggest that glutamate induced nociception and sensitization in the orofacial region involve the activation of voltage-gated sodium channels and NMDA receptors localized in the central nervous system and in the periphery. Trigeminal neuropathic pain shares some of these mechanisms, but the nerve lesion produced more robust changes than the injection of glutamate, since hyperalgesia to both cold and heat stimuli were observed within this model. The reversion of thermal hyperalgesia by peripheral injection of MK-801 indicates the existence of NMDA receptors in the orofacial region and that glutamate release may be peripheral. Moreover, the blockade of thermal hiperalgesia by NMDA receptor antagonists suggests that there may be a cross-talking between the NMDA receptors and the recently discovered transient receptor potential channels (TRP), responsible by the transduction of noxious thermal stimuli.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	i
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. DOR COMO UM SINAL DA INFLAMAÇÃO.....	1
1.2. NOCICEPÇÃO.....	2
1.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E NOCICEPÇÃO.....	7
1.4. TRANSDUÇÃO DOS SINAIS DE FRIO E CALOR .....	9
1.5. DOR NEUROPÁTICA.....	11
1.5.1. Sensibilização Central e Aumento da Excitabilidade.....	13
1.5.2. Redução da Inibição.....	16
1.5.3. Reestruturação Organizacional e Mudança de Fenótipo.....	18
1.6. ORGANIZAÇÃO DO NERVO TRIGÊMIO.....	20
1.7. DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL.....	22
1.8. GLUTAMATO E NOCICEPÇÃO .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
2.1. OBJETIVO GERAL.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. MATERIAL.....	29
3.1.1. Animais.....	29
3.1.2. Drogas, doses e soluções.....	29
3.2. MÉTODOS.....	30
3.2.1. Teste de nocicepção orofacial induzida por glutamato.....	30
3.2.2. Cirurgia de constrição do nervo infra-orbital (CCNI).....	31
3.2.3. Teste de hiperalgesia ao frio.....	32
3.2.4. Teste de hiperalgesia ao calor.....	33
3.2.5. Teste de desempenho motor.....	34

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.3.1. Estudos agudos: nocicepção e hiperalgisia induzida por glutamato.....	36
3.3.2. Estudos crônicos: hiperalgisia ao frio e calor após constrição do nervo infra-orbital.....	37
3.3.3. Teste de coordenação motora.....	38
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. ESTUDOS AGUDOS.....	40
4.1.1. Nocicepção induzida por glutamato.....	40
4.1.2. Hiperalgisia aos estímulos nociceptivos térmicos induzida por glutamato.....	42
4.1.3. Efeito da lamotrigina, memantina e MK-801 sobre a nocicepção induzida por glutamato.....	45
4.1.4. Efeito da lamotrigina, memantina e MK-801 sobre a hiperalgisia ao frio.....	49
4.2. ESTUDOS CRÔNICOS.....	54
4.2.1. Teste de hiperalgisia ao frio.....	54
4.2.2. Teste de hiperalgisia ao calor.....	60
4.3. TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA.....	66
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
5.1. NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA PERIFÉRICAS INDUZIDAS POR GLUTAMATO.....	68
5.2. PAPEL DO GLUTAMATO NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CCNI EM RESPOSTA À ESTÍMULOS TÉRMICOS.....	79
5.3. MODULAÇÃO DOS RECEPTORES DE CALOR E FRIO E SUA RELAÇÃO COM RECEPTORES NMDA.....	86
5.4. EFEITO DAS DROGAS SOBRE O SISTEMA MOTOR.....	89
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. DOR COMO UM SINAL DA INFLAMAÇÃO

Quando ocorre uma lesão tecidual, o organismo aciona mecanismos cujo propósito é limitar o dano e auxiliar a regeneração. Esses mecanismos fazem parte da resposta inflamatória, que é caracterizada por quatro sinais principais: dor, rubor, calor, tumor e, eventualmente, perda da função (GALLIN *et al.*, 1982).

A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. JULIUS & BASBAUM (2001) descrevem a dor como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo. Vários estudos descrevem o papel fisiológico da dor: um alarme que tem a função de proteger o organismo ativando reações e induzindo comportamentos de precaução, que podem diminuir o que estiver causando a dor e, como resultado, limitar os danos (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004; WOOLF, 2000; MARKENSON, 1996). LE BARS *et al.* (2001) estabelecem mais duas funções para a sensação de dor: avisar o indivíduo da probabilidade de que uma lesão tecidual está para ocorrer, por percepção de que certo estímulo pode causar dano tecidual e alertar um grupo de indivíduos de perigo assim que ele surge para um de seus membros. Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a ameaça de dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada, respostas endócrinas (secreção de corticosterona) e ativação simpática (levando a elevações de pressão sanguínea e batimentos cardíacos), que, juntos com uma antinocicepção transitória, auxiliam o melhoramento do desempenho dos repertórios comportamentais, permitindo o afastamento de situações de risco com mais sucesso (MILLAN, 1999).

ALMEIDA *et al.* (2004) sugerem que as manifestações de dor podem ser entendidas com base nos substratos neurais que medeiam as funções sensorial e afetiva: enquanto o sistema sensorial, perceptor, permite a

localização espaço-temporal, a qualificação física e a intensidade do estímulo nocivo, o componente cognitivo-afetivo atribui emoções à experiência, sendo responsável pelas respostas comportamentais à dor. Assim, a dor tem uma conotação individual e sofre a influência de experiências anteriores.

Logo, a dor age de duas formas: uma é a resposta de aviso que promove a sobrevivência no ambiente hostil e perigoso, enquanto a outra é a expressão de mudanças no sistema nervoso, que podem ser patológicas. A primeira é benéfica e a segunda não, sendo responsável por sofrimento persistente de milhões de pacientes (WOOLF, 2000). Isto é corroborado por JULIUS & BASBAUM (2001), pois a dor persistente perde sua utilidade como sistema de aviso e se torna crônica e debilitante. Esta segunda forma de dor adaptativa se manifesta uma vez que a lesão tecidual ocorreu, onde o intuito é tentar auxiliar a reparação. A dor contribui estabelecendo um estado de hipersensibilidade localizada dentro e ao redor da região lesada. Um estímulo que normalmente acarretaria apenas uma sensação inócua torna-se desconfortável (WOOLF, 2000).

No que tange o tratamento, a dor aguda raramente precisa de atenção médica; e, quando isso acontece, drogas antiinflamatórias não esteroidais, analgésicos (opióides) ou anestésicos locais, podem controlar a dor. Quase todos os analgésicos usados atualmente foram inicialmente desenvolvidos para tratar a dor aguda. Entretanto, a dor crônica difere da aguda não apenas na instalação e duração, mas também nos mecanismos envolvidos. A dor crônica pode não ter lesão ou inflamação identificável e responde pobremente a antiinflamatórios não esteroidais ou opióides (WANG & WANG, 2003).

## **1. 2. NOCICEPÇÃO**

A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação sobre lesões teciduais (BARANAUSKAS, 1998). Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (ALMEIDA *et al.*, 2004). A função de alerta da dor reflete a ativação física de

sensores, denominados nociceptores, por estímulos potencialmente perigosos que excedem a faixa fisiológica (MILLAN, 1999). De fato, estudos eletrofisiológicos (BURGESS *et al.*, 1967) mostraram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos como um leve toque.

Os longos axônios das fibras nociceptivas que se localizam em nervos periféricos estendem-se de seus corpos celulares, que estão contidos numa estrutura denominada gânglio da raiz dorsal. Quando estes neurônios são ativados por estímulo nocivo, enviam sinais através de suas longas fibras para a coluna dorsal e de lá para o cérebro, a partir de onde se tem a sensação de dor (WOOLF, 2000).

COSTIGAN *et al.* (2000) classificaram as fibras aferentes de primeira ordem em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução. As fibras A $\beta$  são mielinizadas, com diâmetro maior que 10  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução de 30-100 m/s. As fibras aferentes A $\delta$  são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0-6,0  $\mu\text{m}$  e têm velocidade de transmissão de 12-30 m/s. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4-1,2  $\mu\text{m}$  e mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s. Neurônios que possuem corpos celulares de maior diâmetro dão origem à fibras sensoriais mielinizadas de rápida condução do tipo A $\beta$  que detectam estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e juntas, não contribuindo, assim, para a nocicepção. Em contraste, corpos celulares de pequeno e médio diâmetro dão origem à maioria dos nociceptores, incluindo fibras C e do tipo A $\delta$ .

Há duas classes principais de nociceptores do tipo A $\delta$ : ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser distinguidas por sua capacidade de responder a estímulos de calor intenso ou como são afetadas pela lesão tecidual. A maioria das fibras C também são polimodais, sendo ativadas por estímulos nocivos mecânicos e térmicos. Algumas são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem ao calor nocivo. Mais importante, a maioria das fibras C também responde a estímulos nocivos de origem química, como ácido ou capsaicina. Entretanto, o estímulo natural de alguns nociceptores é difícil de identificar. Estes são chamados “nociceptores

silenciosos” ou “adormecidos”, que passam a ser ativados apenas quando sensibilizados por lesão tecidual (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A ativação dos nociceptores em resposta a estímulos nocivos leva à despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra (WOOLF & SALTER, 2000). Assim, quando um dano inicial (lesão ou induzido por inflamação) ativa os nociceptores locais, as fibras nervosas A $\delta$  e C ficam sensibilizadas e assumem limiares de ativação mais baixos. Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A $\delta$  (que conduzem a designada dor primária) e a nocicepção difusa e lenta, em queimação, é elicitada por fibras C (dor secundária). A dor visceral é única no sentido de que não existem os componentes primário e secundário; ao contrário, a dor visceral freqüentemente é pouco localizada, profunda e lenta. A lesão tecidual também não é fundamental para que a dor visceral exista; ela pode resultar de uma distensão excessiva (JULIUS & BASBAUM, 2001).

O corno dorsal da medula espinhal funciona como uma estação relé para a transmissão da dor. Os nociceptores chegam de maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras mielinizadas A $\delta$  terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II. A partir destas regiões, são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem na medula espinhal, sendo que alguns são ativados somente por estímulos nocivos (específicos para a nocicepção) e outros respondem a estímulos de alta ou baixa intensidade (limiar dinâmico e amplo). Esta conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (MILLAN, 1999; ver figura 1).

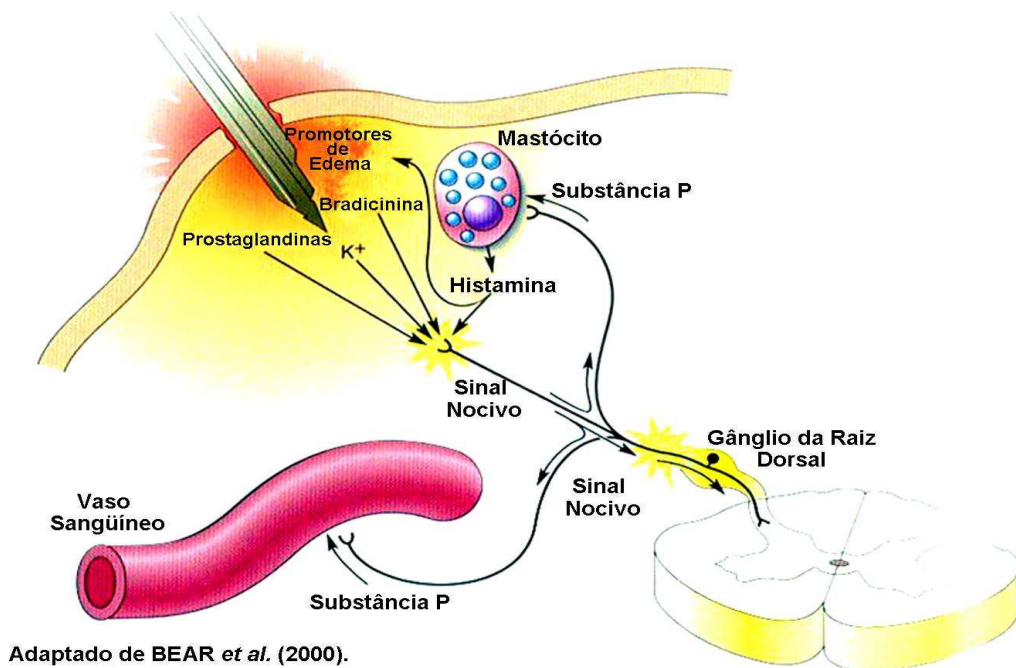


Figura 1. Via ascendente da nocicepção – primeira conexão. Os axônios das fibras aferentes primárias que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas superficiais do corno dorsal.

Após a interação direta ou indireta com neurônios de projeção no corno dorsal, os axônios de neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencefalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedual, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (ALMEIDA *et al.*, 2004, ver figura 2). Entretanto, apesar da complexidade das vias ascendentes da dor, neuroanatomicamente elas podem ser divididas em: vias monossinápticas e polissinápticas. As primeiras projetam diretamente para centros cerebrais superiores e incluem os tratos espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinotalâmico e espinoreticular. As vias polissinápticas possuem uma estação relé de neurônios de segunda ordem antes de projetarem aos centros cerebrais superiores, sendo estas as vias pós-sináptica da coluna dorsal e do trato espinocervical (MILLAN, 1999). O tálamo desempenha um papel fundamental como região responsável pela integração do impulso de dor. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o

córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999). O tálamo está envolvido na recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo. As diferentes projeções para seus núcleos e deles para o córtex definem a circuitaria funcional de processamento da dor. O núcleo ventroposterolateral do tálamo é reconhecido como o principal centro somatossensorial. A convergência de estímulos inócuos e nocivos de origem articular, cutânea e muscular foi demonstrada, bem como as interconexões com o córtex somatossensorial primário, responsável pelos aspectos de localização e intensidade da dor (WENG *et al.*, 2000). A divisão posterior do núcleo ventromedial e o núcleo posterior são partes integrantes do sistema nociceptivo, estabelecendo conexões com os córtices insular e cingulado, responsáveis pelos aspectos cognitivos e afetivos da dor (TREEDE *et al.*, 1999).

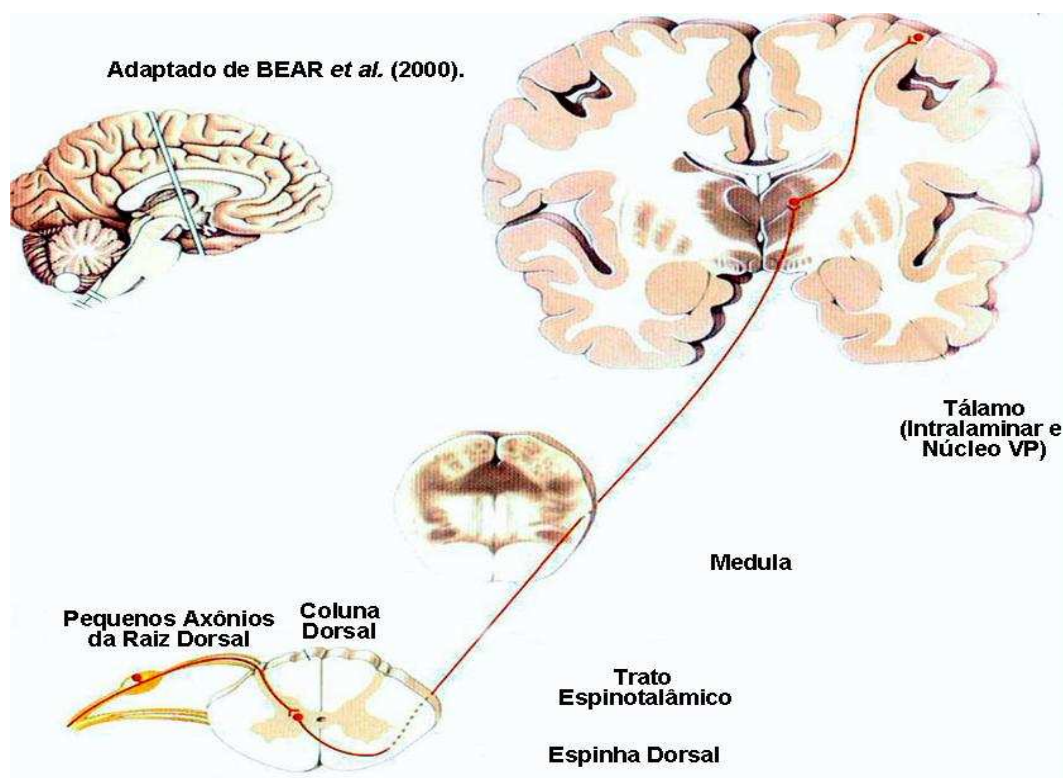


Figura 2. Via ascendente da nociceção – segunda conexão. Tratos aferentes que partem do corno dorsal e conduzem a informação aos centros de processamento cerebrais.



O controle da transmissão da dor também está sujeito à modulação pelas vias descendentes originadas no tronco cerebral. Um circuito modulador endógeno descendente conectando a substância cinzenta periaquedutal, incluindo o núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes da medula rostral ventromedial e o corno dorsal da coluna é responsável pela ativação de conexões que promovem inibição ou facilitação da nocicepção (REN & DUBNER, 2002). Entretanto, o sistema descendente não é simplesmente inibitório ou facilitatório. Cada forma de lesão induz um tipo diferente de plasticidade sobre o sistema. Em geral, há uma mistura de inibição e facilitação descendente, mas o balanço pode ser diferente para os vários pontos na evolução temporal da lesão e para os vários tipos de dano. A principal fonte de influências descendentes, ou, pelo menos, a mais amplamente estudada, é a medula rostral ventromedial. Nessa região, foi demonstrado o envolvimento de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), não NMDA, de óxido nítrico (NO), ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), de colecistocinina (CCK<sub>B</sub>) e de opióides (VANEGAS *et al.*, 2004).

### **1.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E NOCICEPÇÃO**

Em adição às mudanças elétricas desencadeando nocicepção, a lesão tecidual inicia a síntese e liberação de substâncias que induzem a inflamação, a formação de edema, a vasodilatação e a migração de células como parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Entretanto, estes mediadores também ativam e/ou sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal de dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, NO, bradicinina, prostaglandinas, histamina, substância P e fator de crescimento neural (NGF) (WINKELSTEIN, 2004).

Os mediadores inflamatórios, atuando de forma altamente orquestrada, contribuem para mudanças na permeabilidade vascular, resultando em edema e eritema (rubor). Também ocorre sensibilização dos nociceptores periféricos por início de uma cascata de eventos que muda as condutâncias iônicas da terminação das fibras sensoriais periféricas (ITO *et al.*, 2001). A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que

estes disparem com estímulos de menor intensidade (HOLDEN & PIZZI, 2003). Os principais mediadores que participam da nocicepção inflamatória bem como algumas características que devem ser ressaltadas sobre os mesmos estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1. Mediadores inflamatórios e sua participação na nocicepção.

MEDIADOR	EFEITO SOBRE NOCICEPTORES	CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Substância P	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgisia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato.	FÜRST (1999) LOFGREN <i>et al.</i> (1999) TURNBACH & RANDICH (2002) CARLTON <i>et al.</i> (1998) TEOH <i>et al.</i> (1996)
Prostaglandinas	Sensibilização	Hiperalgisia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da cicloxigenase.	MALMBERG & YAKSH (1995) BEICHE <i>et al.</i> (1996) YANG <i>et al.</i> (1996) HAY & DE BELLEROCHÉ (1997) SYRIATOWICZ <i>et al.</i> (1999) TOTANI <i>et al.</i> (1999)
NO	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperalgisia, dependente da concentração.	OKUDA <i>et al.</i> (2001) DOURSOUT <i>et al.</i> (2003) SOUSA & PRADO (2001)
Bradicinina	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgisia mediada por receptores B <sub>2</sub> constitutivos e B <sub>1</sub> induzidos, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1.	DRAY (1997) STERANKA <i>et al.</i> (1988) LOPES <i>et al.</i> (1993; 1995) ANDREEVA & RANG (1993) MARCEAU <i>et al.</i> (1998) NI <i>et al.</i> (1998) DRAY & PERKINS (1993) MATHIS <i>et al.</i> (1996) AUSTIN <i>et al.</i> (1997) FERREIRA <i>et al.</i> (2005)
NGF	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1.	MARCHAND <i>et al.</i> (2005)
Citocinas pró-inflamatórias: interleucina (IL) - 1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgisia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática).	STEIN <i>et al.</i> (1988) CUNHA <i>et al.</i> (1991) FUKUOKA <i>et al.</i> (1994) GEORGE <i>et al.</i> (2005) SCHAFERS <i>et al.</i> (2001) MURPHY <i>et al.</i> , (1999)

## 1.4. TRANSDUÇÃO DOS SINAIS DE FRIO E CALOR

Dentre os estímulos nocivos que podem promover a ativação dos nociceptores para centros de processamento da dor na coluna dorsal e no cérebro, destacam-se os de natureza térmica (CATERINA, 1997). Assim, quando a pele é aquecida ou refrescada para temperaturas fora da zona neutra (31-36° C), sensações de calor ou frio surgem a partir da ativação de receptores de calor ou frio. A habilidade de sentir o frio e o calor reside em neurônios especializados do sistema nervoso periférico que detectam as mudanças na temperatura ambiental em uma faixa bastante ampla. Esse processo é iniciado quando um estímulo de frio ou calor excita as fibras nervosas sensoriais que projetam da raiz dorsal ou gânglio trigeminal, que inervam as regiões do tronco e cabeça, respectivamente. Esses neurônios aferentes convertem estímulos térmicos em sinais eletroquímicos e transferem a informação sensorial para centros integrantes na coluna dorsal e cérebro (McKEMY *et al.*, 2002). Os corpos celulares desses neurônios termossensoriais estão concentrados nos gânglios localizados na coluna vertebral e no crânio, e suas projeções estendem-se a longas distâncias, até os tecidos periféricos como a pele do tronco e cabeça (STORY *et al.*, 2003).

Aumentos ou reduções maiores na temperatura da pele podem ser diferenciadas normalmente como dor devida ao calor ou frio, sendo mediada por ativação de nociceptores (BEISE *et al.*, 1998). O calor nocivo é detectado por neurônios sensoriais que respondem com um limiar moderado de 43° C ou com um limiar alto de 52° C. A compreensão da transdução sensorial em termos de seus mecanismos moleculares está avançando rápido devido à descoberta e caracterização funcional dos canais TRP (*transient receptor potential*). A família de canais TRP é formada por mais de 20 produtos diferentes de genes e estão agrupados em seis famílias: os TRPs clássicos (TRPC), os vanilóides (TRPV), melastatina (TRPM), mucolipinas (TRPML), policistinas (TRPP) e os receptores de potencial transitório do tipo relacionado à proteína anquirina 1 (TRPA ou ANKTM1) (MONTELL *et al.*, 2002; CLAPHAM, 2003). Nos processos de dor, os canais mais estudados e conhecidos são o

TRPV1 ou receptor vanilóide 1 (VR1) e o TRPV2 ou receptor similar ao vanilóide 1 (VRL-1) para o calor e o TRPM8 e TRPA1 para o frio.

A clonagem molecular do TRPV1 representou um marco na biologia molecular da percepção térmica de estímulos nocivos que, subsequentemente, incentivou a descoberta da base molecular das sensações térmicas de frio (MONTIEL *et al.*, 2004). O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo excitatório presente nos neurônios sensoriais, ativado por temperaturas acima de 43°C e pela capsaicina, o composto pungente das pimentas vermelhas. O TRPV1 contribui para a sensibilidade ao calor e é essencial ao desenvolvimento da hipersensibilidade térmica após lesão tecidual. Um canal iônico relacionado, VRL-1, não responde à capsaicina, mas é ativado por temperaturas acima de 50°C (McKEMY *et al.*, 2002).

Embora um limite exato para a dor causada pelo frio ainda não tenha sido encontrado, é considerado que um grupo de neurônios responda a temperaturas na faixa inócua (20-30°C) e na faixa nociva. Parece existir uma outra divisão entre os neurônios ativados pelo frio entre 4-15°C e abaixo de 0°C (SIMONE & KAJANDER, 1997). Os eventos abaixo dessa cascata compreendendo a resposta ao frio são pouco conhecidos. Foi descoberto que células expressando o TRPM8 (cultura de células, estudo *in vitro*) mostram aumento do cálcio intracelular quando submetidas ao frio na faixa de temperatura entre 10-23°C (SUTO & GOTOH, 1999). TRPM8 é um canal catiônico não seletivo de membrana ativado por frio. A permeabilidade iônica do TRPM8 é similar à de outros canais TRP, que são permeáveis a cátions mono e divalentes. A observação de que células expressando o TRPM8 são ativadas pelo mentol reforça a idéia do receptor funcionar como canal sensível ao frio *in vivo*. Além disso, o TRPM8 foi encontrado especificamente em neurônios do gânglio da raiz dorsal, principalmente em células não mielinizadas e de pequeno diâmetro, que correspondem ao perfil de fibras C nociceptoras polimodais (REID & FLONTA, 2001; PEIER *et al.*, 2002).

STORY *et al.* (2003) descreveram recentemente o canal TRPA1 (ou ANKTM1), que é ativado a 17°C e não é ativado pelo mentol. O TRPA1 pertence à terceira subfamília de TRP que mostra ter papel importante na detecção da temperatura. Como outros canais termossensíveis, o TRPA1 é um canal catiônico não seletivo, ativado a 17°C, que se aproxima do limiar de frio

nocivo para humanos (15 °C). O TRPA1 é especificamente expresso em neurônios sensoriais somáticos. Dentro dessa população, TRPA1 não foi encontrado em neurônios que expressam TRPM8 (DAVIS & POPE, 2002).

Análises da expressão revelaram a presença de populações distintas de neurônios que respondem ao frio: neurônios positivos para o TRPM8 e negativos para TRPV1 e neurônios positivos para TRPA1 e que também expressam o TRPV1 (STORY *et al.*, 2003). A primeira população (TRPM8) responde à temperatura mediana e ao mentol, mas não à capsaicina. A segunda (TRPA1 e TRPV1) responde ao frio nocivo e à capsaicina, mas não ao mentol, constituindo nociceptores polimodais que respondem ao frio e calor nocivos. Logo, neurônios que expressam o TRPM8 estariam envolvidos na sensação inócua de refrescância (devido à sua ativação pelo mentol e seu padrão de expressão mutuamente exclusivo com relação a qualquer outro marcador nociceptivo), enquanto neurônios expressando o TRPA1 estariam envolvidos na transmissão de estímulos de frio nocivo. Essa última observação fornece uma explicação molecular plausível para a ativação “paradoxal” de termorreceptores sensíveis a temperaturas mais amenas (25° C) pelo calor e para o fato de que o frio nocivo seja percebido como dor em queimação. Ainda podemos pensar em duas questões interessantes: como distinguimos frio de calor e por que a ativação destes neurônios por um estímulo inócua não provoca dor ou desconforto sempre.

## **1.5. DOR NEUROPÁTICA**

A dor neuropática foi definida em 1994 pela IASP como a “dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso”. Essa dor surge como sintoma de um grupo heterogêneo de condições, incluindo neuropatia diabética, neuralgia trigeminal, neuralgia pós-herpética e lesão da coluna dorsal (CHONG *et al.*, 2003).

FINNERUP & JENSEN (2004) relatam que a dor neuropática e sensações anormais desagradáveis (disestesias) foram observadas em áreas com anormalidades sensoriais. A dor neuropática e as disestesias podem ocorrer espontaneamente ou serem provocadas por estímulos. Assim, quando a área afetada é estimulada podem ocorrer os fenômenos de alodinia

(sensação de dor devido à estimulação não nociva, como um toque leve ou calor ou frio inócuo) e hiperalgesia (resposta aumentada à dor após um estímulo nocivo). Outras características observadas freqüentemente na dor neuropática são a dor do tipo 'wind-up' (somação temporal anormal da dor), pós-sensações (sensação de dor após o estímulo ter cessado) e dor referida (dor sentida em um local diferente da área estimulada) (FINNERUP & JENSEN, 2004). Além dos pacientes com dor neuropática freqüentemente sofrerem de dores espontâneas, alodinia e hiperalgesia, a dor pode ter instalação tardia após a lesão inicial e, assim, estar presente na ausência de uma lesão detectável, dificultando o diagnóstico e o tratamento. Em adição, a dor neuropática pode espalhar-se além dos limites da distribuição cutânea dos nervos lesados e manifestar-se bilateralmente, o que sugere o envolvimento de mecanismos centrais (WANG & WANG, 2003).

Os mecanismos exatos da instalação do quadro de dor neuropática ainda não são inteiramente compreendidos. Em parte, esta dificuldade de compreensão se deve ao fato de que os sintomas e sinais resultam de um mecanismo particular difícil de ser traçado, uma vez que a plasticidade gerada no sistema nervoso implica em uma cadeia imprevisível de eventos (JENSEN & BARON, 2003). No entanto, MACFARLANE *et al.* (1997) sugerem que o desenvolvimento de dor crônica após lesão de nervo deva-se à ocorrência de alguns processos na medula espinhal: excitabilidade aumentada, inibição diminuída, reestruturação organizacional das células e, eventualmente, mudança de fenótipo. Isso está de acordo com o que foi descrito por DICKENSON *et al.* (2002), pois o sistema nervoso central opera em um estado de balanço entre excitação e inibição. Assim, alterações neste equilíbrio podem resultar em atividade neuronal excessiva. WOOLF & JI (2002) acrescentam que esta atividade aumentada modifica os padrões de condução das vias nociceptivas exagerando ou prolongando a resposta aos estímulos nocivos (hiperalgesia) e permitindo que estímulos normalmente inócuos sejam interpretados como nocivos (alodinia). Esses eventos prolongam a ativação dos nociceptores e os impulsos contínuos transmitidos pelos mesmos influenciam os circuitos espinhais, levando à sensibilização central e manutenção do estado de dor crônica. Além dessas mudanças, a perpetuação do próprio processo inflamatório que circunda o local de lesão também resulta em sensibilização

central, que tem papel fundamental na progressão para cronicidade, mesmo após eliminação da causa primária (COUTAUX *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de modelos de estudo da dor neuropática em animais baseados em ligações frouxas do nervo ciático (BENNETH & XIE, 1988) e ligação apertada dos nervos espinhais L5 e L6 (KIM & CHUNG, 1992) permitiram explorar os mecanismos envolvidos na dor neuropática. Nestes testes, respostas aumentadas, definidas por diminuição do limiar de retração da pata ao estímulo mecânico ou diminuição da latência de retração da pata após um estímulo térmico, refletem as condições de alodinia e hiperalgesia (LABUDA *et al.*, 2001). Mais recentemente, a constrição crônica do nervo ciático mostrou também atividade espontânea aumentada nos neurônios aferentes primários, expansão simpática no gânglio da raiz dorsal e redução do número de axônios mielinizados que promovem condução no local da lesão (CHUDLER & ANDERSON, 2002).

Estes modelos animais permitiram um estudo mais aprofundado das mudanças que ocorrem no sistema nervoso central que serão descritas a seguir, e embora ainda insuficiente, para um melhor entendimento da dor neuropática.

#### *1.5.1. Sensibilização Central e Aumento da Excitabilidade*

A sensibilização central representa o estado de sensibilidade aumentada dos neurônios do corno dorsal, de modo que seus limiares de ativação estão reduzidos e as suas respostas aos impulsos sinápticos, aumentada. Essencialmente, o ganho do sistema está aumentado (WOOLF & SALTER, 2000).

LAIRD & BENNETH (1993) estudaram as características eletrofisiológicas de neurônios do corno dorsal da medula de ratos após constrição do nervo ciático e observaram que dez dias após indução da neuropatia muitos neurônios mostraram características anormais, como: resposta à estimulação tátil inócua, ausência de campos receptores na periferia e atividade espontânea muito alta. Em alguns casos, as respostas ao estímulo mecânico duraram muito tempo (10 min).

Há ampla quantidade de evidências sobre a sensibilização de células espinhais do corno dorsal e facilitação de reflexos iniciados por impulsos aferentes nocivos prolongados ou repetitivos causados por neuropatia (CHEN *et al.*, 1999; CHEN & CHEN, 2000; YASHPAL *et al.*, 2001). Em particular, o melhoramento da eficácia sináptica tornou-se evidente pelo fenômeno de 'wind-up' (DAVIES & LODGE, 1987) ou potenciação a longo prazo (LIU & SANDKÜHLER, 1995), após uma seqüência de estimulação de fibras C. Potenciais pós-sinápticos de fibras C do nervo ciático, após alguns segundos de estimulação tetânica, resultaram em potenciais que atingiram 200% em relação ao potencial dos controles antes da estimulação tetânica, sendo que este aumento persistiu por toda a duração do experimento nos animais sob anestesia (8 h) (LIU & SANDKÜHLER, 1995). Os autores demonstraram ainda que receptores de taquicininas e de glutamato estavam envolvidos na indução dessa potenciação, que foi prevenida por administração de antagonistas de receptores NK-1 e NMDA. Além da estimulação elétrica de fibras C, estímulos fisiológicos e patofisiológicos de dor e condições de dor prolongada também resultaram em potenciação a longo prazo, em particular, após lesões de nervo periférico (SANDKÜHLER & LIU, 1998). Outros fenômenos relacionados à dor neuropática parecem também envolver esses neurotransmissores. O glutamato através de receptores NMDA e as taquicininas atuando em receptores NK-1 e NK-2 promovem uma facilitação que culmina em expansão no tamanho dos campos receptores de neurônios do corno dorsal, diminuição do limiar de ativação dos mesmos e aumento na excitabilidade e na resposta aos estímulos (WOOLF & DOUBELL, 1994).

Os fenômenos de hiperalgesia e alodinia surgem em função da sensibilização central (WOOLF, 1996; CHRISTENSEN *et al.*, 1999), que está muito ligada com a ativação de proteínas quinases (PK) e receptores NMDA (CERNE *et al.*, 1992; PENG *et al.*, 1997; HUA *et al.*, 1999; LEWIN & WALTERS, 1999). CHEN *et al.* (2000) observaram, em modelo de injeção de veneno de abelha na pata de ratos, que sensibilização central ocorria ao realizarem este procedimento, uma vez que os animais manifestavam hiperalgesia ao calor bilateralmente. O tratamento intratecal com antagonistas de receptores NMDA e AMPA/cainato foi eficaz em reverter a hiperalgesia instalada.



A substância P e a neurocinina A, também liberadas a partir das terminações das fibras aferentes, pode contribuir para a sensibilização central, pois a ativação de receptores NK-1 e NK-2 de taquicininas pode aumentar as respostas mediadas pelo receptor NMDA (RANDIC *et al.*, 1990; CHEN & HUANG, 1992), através da sua fosforilação pela PKC, considerada um dos principais segundos mensageiros acionados pela ativação de receptores de taquicininas (CHEN & HUANG, 1992; OTSUKA & YOSHIOKA, 1993).

Outro evento que contribui para o aumento da excitabilidade é a mudança na distribuição de canais de sódio dependentes da voltagem, que parecem estar envolvidos com os disparos ectópicos espontâneos, que são um sinal característico de nervos lesados. Vários subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ) são expressos no sistema nervoso periférico (incluindo  $Na_v$  1.6,  $Na_v$  1.7,  $Na_v$  1.8 e  $Na_v$  1.9), diferindo em sua dependência da voltagem, cinética de ativação e inativação e sensibilidade à tetrodotoxina (inibidor não competitivo de canais de sódio) (RUSH *et al.*, 1998). De interesse particular são as propriedades biofísicas do canal  $Na_v$ 1.8, pois essa isoforma é expressa principalmente nas fibras C de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (SANGAMESWARAN *et al.*, 1996; NOVAKOVIC *et al.*, 1998). Estudos em animais transgênicos confirmaram que este canal medeia correntes de sódio de ativação e inativação lentas nas células de pequeno diâmetro do gânglio da raiz dorsal, resistentes à tetrodotoxina (AKOPIAN, 1999). A expressão do  $Na_v$ 1.8 é crucial para a condução de potenciais de ação, uma vez que na ausência desse canal, a habilidade de gerar potenciais de ação foi significativamente comprometida, mas não abolida. Estes canais de sódio contribuem em 80-90% da corrente interna que flui durante a fase de geração do potencial de ação e não são tão sensíveis à inativação por despolarização da membrana como a condutância gerada por canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina. Mais importante, um *knockdown* similar de  $Na_v$ 1.8 de animais submetidos à ligação dos nervos espinhais L5 e L6 apresentou dor neuropática reduzida, com limiares sensoriais a estímulos táteis e térmicos semelhantes aos níveis dos animais controle (LAI *et al.*, 2002; PORRECA *et al.*, 1999). Este último estudo caracteriza uma evidência direta da participação deste subtipo de canal de sódio na dor neuropática.

Um aumento dramático dos canais  $Na_v1.8$  foi observado no nervo ciático, dois dias após lesão (GOLD *et al.*, 2003). Tratamento intratecal com oligonucleotídeos antisense para  $Na_v1.8$  em axônios não lesados criou uma redução da expressão e da imunorreatividade para  $Na_v1.8$ , sendo anti-hiperalgésico e anti-alodínico (GOLD *et al.*, 2003). NOVAKOVIC *et al.* (1998) observaram redistribuição dos canais  $Na_v1.8$  ao longo do nervo ciático lesado. Além disso, COWARD *et al.* (2000) e BUCKNILL *et al.* (2002) demonstraram aumento da imunorreatividade para canais de sódio em nervos periféricos de pacientes com dor neuropática crônica.

XIE *et al.* (2005) conduziram um estudo interessante que avaliou, em dois modelos de dor neuropática, a importância do efeito de bloqueadores da atividade das fibras aferentes durante o desenvolvimento temporal da neuropatia. De fato, foi observado que o tratamento com esses bloqueadores aboliu o surgimento dos fenômenos de hiperalgesia e alodinia, enquanto que o tratamento realizado dez dias após a instalação do quadro neuropático não é eficaz, indicando que a atividade espontânea precoce das fibras aferentes lesadas é um ponto essencial, e que pode ser exigido para que surjam as mudanças posteriores nos neurônios sensoriais.

### 1.5.2. Redução da Inibição

Enquanto os neurotransmissores excitatórios parecem ter papel fundamental na sensibilização central, é importante notar que outros neurotransmissores e receptores inibitórios podem também estar envolvidos. A diminuição dos níveis de GABA, um importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, contribui para o desenvolvimento e manutenção do estado de dor crônica. Em modelos de dor crônica em ratos, há uma perda na imunorreatividade GABAérgica, indicando uma redução do tônus inibitório (IBUKI *et al.*, 1997). O sistema GABAérgico na coluna dorsal regula os neurônios do corno dorsal, uma vez que o bloqueio dos receptores GABAérgicos nessa região produz hipersensibilidade de neurônios do corno dorsal (KONTINEN *et al.*, 2001). Além disso, administração intratecal de agonistas GABAérgicos bloqueiam a hiperalgesia e a alodinia induzidas por ligação de nervo espinhal, enquanto antagonistas de receptores  $GABA_A$  e

GABA<sub>B</sub> produziram alodinia tátil, demonstrando que a perda do tônus inibitório na coluna dorsal é suficiente para causar alodinia por reduzir os limiares de ativação (MALAN *et al.*, 2002). MOORE *et al.* (2002) conduziram um estudo que mostrou que a lesão de nervo também reduz a inibição no corno dorsal superficial com uma perda seletiva de correntes sinápticas GABAérgicas inibitórias devida à indução da apoptose dos mesmos. Isso resulta em uma perda de função que contribui para sensibilidade anormal à dor (WOOLF, 2004).

Outro mecanismo espinal que contribui para diminuição da inibição é a eficácia reduzida dos opióides (ZHANG *et al.*, 1998) e o aumento de sistemas anti-opióides, como colecistocinina (CCK) e dinorfina (VANDERAH *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000). ZAJAC *et al.* (1989) relataram uma redução da ligação em receptores opióides após rizotomia dorsal. Estes achados foram corroborados por estudos funcionais. LOMBARD & BESSON (1989) encontraram que, em ratos artríticos, a atividade espontânea de células do corno dorsal foi suprimida em 46% por morfina. Em contraste, nos animais que sofreram rizotomia dorsal múltipla, as descargas contínuas não foram inibidas pela mesma dose de morfina e uma dose mais alta produziu apenas um pequeno efeito inibitório. MAO *et al.* (1995) observaram que este decréscimo na eficácia dos opióides pode ser dependente do receptor NMDA após lesão de nervo. Antes e após transecção de um nervo ciático, a resposta do sistema opióide espinal foi avaliada através do registro do limiar de retração da pata frente a um estímulo térmico e o efeito da administração de morfina intratecal foi determinado. Quando uma lesão de nervo foi produzida, a curva dose-efeito foi deslocada para doses seis vezes mais altas, indicando que o sistema opióide estava altamente atenuado pela lesão. Esse deslocamento foi prevenido por tratamento com MK-801, um antagonista de receptores NMDA. Os autores sugeriram que o desacoplamento do receptor  $\mu$  e da proteína G ou uma mudança na atividade sobre os canais iônicos controlados pelos opióides, ambos processos que exigem fosforilação em sítios intracelulares, incluindo o receptor NMDA, poderiam explicar seus achados (MAYER *et al.*, 1995).

### 1.5.3. Reestruturação Organizacional e Mudança de Fenótipo

Após a lesão de nervo periférico, há uma mudança drástica nos níveis de transcrição de certas substâncias, várias centenas de genes estão ativados ou inibidos (COSTIGAN *et al.*, 2002; XIAO *et al.*, 2000), incluindo genes associados à regeneração, fatores de sobrevivência e muitos genes que determinam ou não o funcionamento dos neurônios. Como consequência, surgem alterações na excitabilidade dos neurônios, bem como em suas capacidades de transmissão e transdução e também modificações no fenótipo dos neurônios. Por exemplo, neuromoduladores como o fator de crescimento derivado do encéfalo e a substância P são normalmente expressos apenas em fibras C normalmente, mas após a lesão de nervo, começam a ser expressos também em fibras A (NOGUCHI *et al.*, 1995; FUKUOKA *et al.*, 2001).

No que refere aos mecanismos que têm por intuito a regeneração, quando ocorre transecção, compressão ou isquemia severa de um nervo, o organismo inicia uma reação caracterizada por fagocitose e degeneração da mielina em axônios distais à lesão. Esta reação, denominada degeneração Walleriana, prossegue com a lesão axonal resultando em síntese de mediadores inflamatórios e citocinas a partir de células de Schwann ou de células imunes infiltrantes ou residentes. Essas substâncias incluem TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, NO, IL-1 e IL-6, que, conforme mencionado anteriormente, contribuem para o surgimento da dor (HOLDEN & PIZZI, 2003). Além disso, a lesão de nervo periférico interrompe o contato dos corpos celulares dos neurônios do gânglio da raiz dorsal com seus alvos periféricos. Esses alvos são fontes do fator de crescimento neural ou do fator de crescimento derivado da glia. Durante a progressão do quadro da lesão, ocorrem mudanças atróficas nos neurônios lesados, redução no calibre dos axônios e do tamanho do corpo celular e perda do contato que as terminações centrais das fibras aferentes fazem com neurônios da coluna (WOOLF, 2004).

Alguns aspectos da dor neuropática parecem ser relacionados ao controle patológico exercido pelo sistema nervoso autônomo simpático (FROST *et al.*, 1988). Nesse sentido, a sensibilidade térmica anormal, particularmente marcante para estímulos de frio em ratos que passaram por ligação do nervo ciático, pode refletir o envolvimento do sistema nervoso simpático (NEIL *et al.*,

1991; PERROT *et al.*, 1993). Além disso, o tratamento com simpatolíticos, como a guanetidina, seletivamente previne ou suprime a sensibilidade exagerada a estímulos térmicos, principalmente de frio (PERROT, 1993). DESMEULES *et al.* (1995) submetem animais à simpatectomia após constrição do nervo ciático e perceberam uma redução seletiva ou mesmo prevenção de reações anormais ao frio e ao calor, mas sem afetar a reação anormal ao estímulo mecânico, confirmando o papel seletivo do sistema nervoso simpático sobre o desenvolvimento e manutenção deste comportamento anormal em relação a estímulos térmicos em animais com neuropatia.

As alterações do quadro neuropático podem envolver mecanorreceptores de baixo limiar (excitados apenas por estímulos inócuos), resultando em respostas dolorosas ligadas à estimulação tátil (KOLTZENBURG *et al.*, 1994; TOREBJORK *et al.*, 1992). Esse fato correlaciona-se com a expansão de fibras A $\beta$  observada na lâmina II em ratos com constrição de nervo, mas não em animais normais. Assim, a presença de fibras aferentes primárias de grande calibre e de baixo limiar em uma região que normalmente processa impulsos transmitidos por aferentes de alto limiar em um modelo de dor neuropática da suporte à hipótese de que essas fibras expandidas têm um papel no desenvolvimento e/ou manutenção da dor neuropática (LEKAN *et al.*, 1996; SHORTLAND *et al.*, 1993). Essa hipótese pode ser considerada pelo fato de que COGGESHALL *et al.* (1997) observaram, em um modelo de lesão por transecção e em um modelo de compressão do nervo ciático, perda específica de axônios não mielinizados, em uma alta proporção, mas que leva um tempo longo pra ocorrer (quatro a oito meses) e que a reinervação do alvo não previne a perda axonal. Assim, as fibras A $\beta$  poderiam ocupar locais sinápticos vagos nas lâminas superficiais do corno dorsal devido à degeneração de fibras C. Além disso, prevenção da inervação do corno por fibras C por tratamento com capsaicina permite que as fibras A $\beta$  mantenham sua presença nas lâminas superficiais (CAMERON *et al.*, 1997; FITZGERALD *et al.*, 1994; SHORTLAND *et al.*, 1990). Por fim, o fator de crescimento neural pode prevenir a expansão de fibras A $\beta$  para a lâmina II, possivelmente porque age como fator

trófico para fibras C, assim prevenindo a retração das fibras A $\beta$  da lâmina II (BENNET *et al.*, 1996).

## 1.6. ORGANIZAÇÃO DO NERVO TRIGÊMIO

Dentre os diversos nervos do corpo sujeitos à neuropatia, o trigêmeo também constitui um alvo importante. O nervo trigêmio conduz informações através de três ramificações principais: a oftálmica, a maxilar e a mandibular. Em geral, a divisão oftálmica, que é predominantemente sensorial, inerva a superfície das partes superiores da face e partes das mucosas nasal e paranasal. A divisão maxilar, principalmente sensorial também, inerva os dentes e mucosa da maxila, o lábio superior, área lateral do nariz, sino maxilar e nasofaringe. A divisão mandibular inerva os dentes e mucosa da mandíbula, junção temporomandibular, a pele que recobre a mandíbula e os músculos da mastigação. A maioria dos neurônios sensoriais do trigêmeo tem seus corpos celulares no gânglio trigeminal. Em humanos, o gânglio trigeminal está localizado na superfície cerebral do osso temporal (ver figura 3). Entretanto, alguns aferentes têm seus corpos celulares localizados no núcleo trigeminal mesencefálico. As ramificações centrais de neurônios localizados no gânglio trigeminal entram no tronco cerebral ao nível da ponte e projetam-se em redes complexas para o núcleo sensorial principal e núcleo trigeminal espinhal. Através de neurônios de segunda ordem, os impulsos são conduzidos deste ponto para o tálamo e em seguida, para o córtex sensorial (FRIED *et al.*, 2001).

Em ratos, têm-se as mesmas ramificações (figura 4), sendo que o maior feixe derivado da divisão maxilar é o infra-orbital, composto praticamente somente de fibras sensoriais. Este nervo supre o conjunto das vibrissas, que é densamente inervado: cada folículo recebe cerca de 250 fibras nervosas, sendo um terço destas não são mielinizadas (BENOLIEL *et al.*, 2001).

A análise do tamanho das células em gatos e ratos revelou três grupos distintos de neurônios no gânglio trigeminal: células pequenas (20-30 $\mu$ m) relacionadas às ramificações cutâneas, células de tamanho médio (30-50 $\mu$ m) ligadas à aferentes da córnea e células grandes (50-80 $\mu$ m) ligadas aos ramos oral e perioral, incluindo a polpa dental. As células médias e grandes têm

velocidades de condução que permitem classificá-las nas categorias  $A\beta$  e  $A\delta$ , representando a primeira mecanorreceptores de baixo limiar e a segunda mecanorreceptores de alto limiar, termorreceptores e nociceptores. As células pequenas com velocidade de condução correspondendo à categoria C são consideradas nociceptoras no que diz respeito às suas modalidades sensoriais (LAZAROV, 2002).

Os neurônios aferentes primários do trigêmio são quimicamente heterogêneos e parecem utilizar vários neurotransmissores em suas sinapses. Dentre eles, estão as substâncias 'clássicas' (acetilcolina, dopamina, serotonina, histamina) e transmissores peptídicos (glutamato, aspartato, peptídeos opióides), purinérgicos (adenosina trifosfato, ATP, adenosina) e outras moléculas neuroativas (substância P, neuropeptídeo Y) (LAZAROV, 2002).

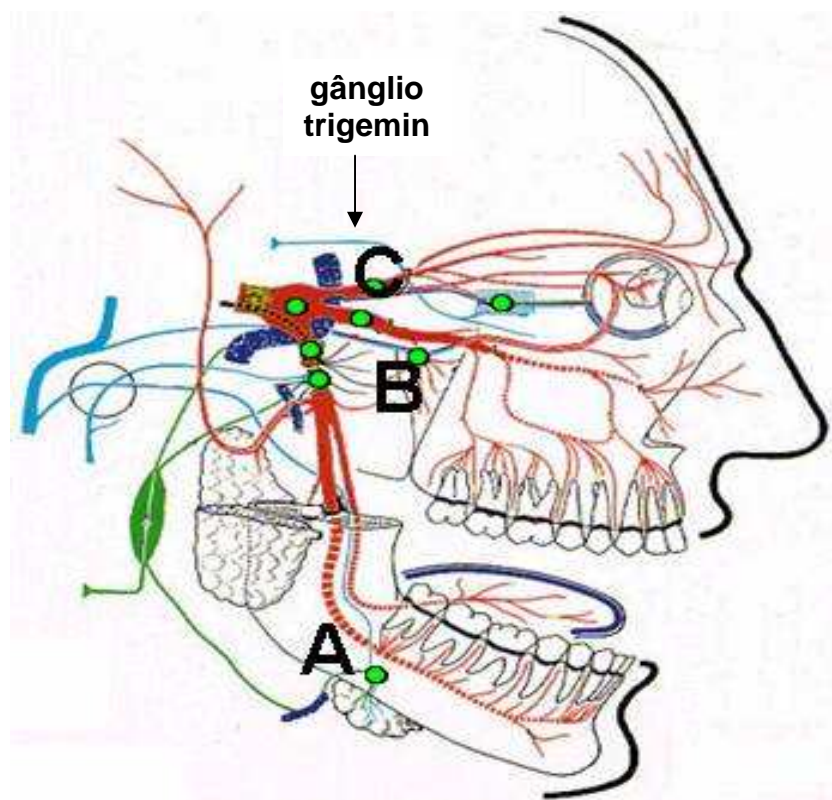


Figura 3. Nervo trigêmio em humanos e suas ramificações (Adaptado de CHICHORRO, 2002). A – ramo mandibular; B – ramo maxilar; C – ramo orbital.

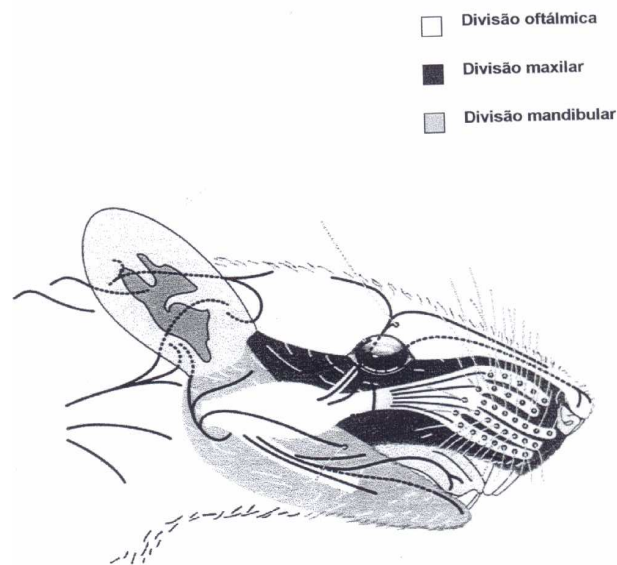


Figura 4. Nervo trigêmio em ratos e suas ramificações (adaptado de CHICHORRO, 2002).

## 1.7. DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

Neuralgia do trigêmio, ou ‘tic douloureux’, é um exemplo de uma forma de dor neuropática intensa na região orofacial. Apresenta-se como paroxismos (ataques) de dor em pontadas ou dores penetrantes na distribuição do nervo trigêmeo. Embora breves e seguidos de intervalos não dolorosos, os episódios são excruciantes em intensidade e freqüentemente são experimentados como sensações de choque elétrico ou manifestações repentinas explosivas, que podem ocorrer espontaneamente ou ser provocadas por estímulos inócuos, como um leve toque (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). Estas sensações anormais são bastante perturbadoras, uma vez que constantemente chamam a atenção durante atividades rotineiras como diálogo e mastigação (FRIED *et al.*, 2001). Outras características sensoriais da neuralgia trigeminal e natureza dos estímulos de ativação foram observadas por DUBNER *et al.* (1987): ativação por estímulos mecânicos inócuos, somatização temporal de estímulos ativadores, pós-descargas, migração da zona de ativação, irradiação espacial e zonas de ativação além do ramo trigeminal afetado.



A etiologia sugerida da maioria dos casos de neuralgia trigeminal é a compressão vascular de axônios centrais do nervo trigêmeo ao nível da ponte, resultando em desmielinização focal, que pode alterar a atividade elétrica dos neurônios trigeminais. No entanto, desmielinização e compressão são inferidas apenas a partir de observações clínicas e não de estudos experimentais (KITZ *et al.*, 2000). A neuralgia do trigêmeo continua sendo um desafio terapêutico, uma vez que ainda não foram desenvolvidos procedimentos cirúrgicos ou tratamentos médicos que podem cessar de modo permanente os ataques de dor em todos os pacientes (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). E, mesmo que a lesão estrutural identifique o processo patológico em progresso, ela não é suficiente para explicar a patofisiologia da neuralgia trigeminal, isto é, os mecanismos que dão margem a este fenômeno clínico (KITZ *et al.*, 2000).

VOS *et al.* (1994) demonstraram que a constrição crônica do nervo infraorbital do rato causa mudanças comportamentais e moleculares, indicadoras de dor persistente, uma vez que estão correlacionadas com aumento dos níveis de c-fos no corno dorsal da medula (VOS & STRASSMAN, 1995), sugerindo atividade neuronal contínua. Imediatamente após a cirurgia, uma alta incidência anormal de atividade de *grooming* facial assimétrica com lavagens faciais dirigidas ao território do nervo infraorbital lesado é percebida. Simultaneamente, ocorre um período de ausência de resposta ao estímulo mecânico, que evolui para um período de resposta aumentada após 7-12 dias, o que é usado como indicador de alodinia/hiperalgesia mecânica (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). Além disso, foi concluído que o *grooming* facial direcionado é uma manifestação comportamental de sensação dolorosa espontânea e aversiva na região do nervo lesado (DESEURE & ADRIAENSEN, 2004). A constrição crônica do nervo infraorbital resulta em um modelo de dor crônica que pode ser aplicado ao estudo da dor neuropática orofacial.

A constrição do nervo infraorbital também passa por influência do componente inflamatório: RAO & ANDERSON (2001) demonstraram mudanças bilaterais nos níveis de IL-6 e NGF após constrição unilateral. Mais recentemente, ANDERSON *et al.* (2003) mostraram que uma intensa hipersensibilidade inflamatória neste modelo foi desenvolvida após estímulo químico, em associação com uma resposta inflamatória perineural progressiva e formação de neuroma, indicando que os mediadores inflamatórios podem ter

um papel importante na indução da hiperalgesia e alodinia observadas após constrição do nervo.

Grande parte do conhecimento sobre o papel dos gânglios sensoriais na dor neuropática provém dos estudos baseados no gânglio da raiz dorsal e muito pouco é focado sobre o gânglio trigeminal, que funciona como estação relé para os impulsos sensoriais da maioria das regiões da cabeça e face para o cérebro. Alguns pesquisadores estudaram as conseqüências comportamentais, fisiológicas e neuroanatômicas de lesões de constrição nervosa aplicadas ao sistema trigeminal (BENOLIEL *et al.*, 2001; CHRISTENSEN *et al.*, 1999; VOS & STRASSMAN, 1995) e verificaram que há diferenças entre os efeitos das lesões aos nervos trigeminal e espinhais, como a ausência de expansão simpática após lesão no trigêmeo (BENOLIEL *et al.*, 2001) e menor atividade ectópica após axotomia comparada aos nervos espinhais (TAL & DEVOR, 1992). Resultados do nosso grupo (CHICHORRO *et al.*, 2006) demonstraram que o quadro de neuropatia é claramente distinto do quadro inflamatório, a partir dos modelos de hiperalgesia ao frio induzida por carragenina e induzida pela constrição do nervo infraorbital, uma vez que a hiperalgesia ao estímulo de frio foi revertida significativamente no modelo da carragenina por antiinflamatórios não esteroidais, enquanto os mesmos não proporcionaram efeito algum sobre a hiperalgesia ao frio no modelo de neuropatia. Em outro estudo, CHICHORRO *et al.* (2006) relataram redução da alodinia mecânica após constrição crônica do nervo infraorbital por antagonistas de receptores de endotelinas. Logo, é essencial que novos estudos sejam conduzidos no sentido de proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no sistema trigeminal.

## **1.8. GLUTAMATO E NOCICEPÇÃO**

Dentre a diversidade de mediadores e neurotransmissores que participam da nocicepção, o glutamato sem dúvida ocupa um papel de destaque.

O glutamato é um aminoácido excitatório encontrado no cérebro (incluindo estruturas ligadas à mediação da nocicepção), na coluna dorsal e na periferia, e é liberado em resposta à estimulação nociceptiva e lesão tecidual

ou de nervo (GRAHAM *et al.*, 1967; JOHNSON, 1978; MILLER *et al.*, 1988; SASAKI *et al.*, 1998; SLUKA & WILLIS, 1998; AL-GHOUL *et al.*, 1993; OMOTE *et al.*, 1998). Uma vez liberado, o glutamato pode atuar através de receptores ionotrópicos (diretamente acoplados a canais iônicos) ou metabotrópicos (acoplados a sistemas de segundos mensageiros via proteína G). Os receptores ionotrópicos incluem aqueles seletivamente sensíveis ao NMDA, ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) e ao cainato (FUNDYTUS, 2001).

Os receptores NMDA consistem de quatro domínios transmembrana similares a outros canais iônicos regulados por ligante, um domínio extracelular N-terminal e um intracelular C-terminal (NAKANISHI, 1992) e estão conectados formando um canal iônico permeável a íons cálcio, sódio e potássio (MACDERMOTT *et al.*, 1986; MAYER *et al.*, 1987). Estes receptores estão sujeitos a um bloqueio dependente de voltagem efetuado por íons magnésio. Receptores NMDA medeiam potenciais pós sinápticos excitatórios após remoção do bloqueio voltagem-dependente exercido pelo magnésio (NOVAK *et al.*, 1984). Logo, é necessário que haja despolarização prévia da membrana para a abertura deste canal. Estes potenciais pós-sinápticos são lentos e a ativação desses receptores culmina na síntese de NO por ativação, via cálcio-calmodulina, da óxido nítrico sintase (MORRIS, 1994).

Assim como o sítio do ligante, o receptor NMDA ainda apresenta vários outros sítios de ligação, que podem modular a atividade do canal: sítio da fenciclidina, localizado dentro do canal, o sítio para ligação da glicina, sítios para ligação de poliaminas (SUCHER, 1996), um sítio de ligação do zinco e um sítio sensível à oxidação ou redução (LEHMANN *et al.*, 1990). Várias subunidades do receptor NMDA foram clonadas. Estas incluem a subunidade NR1 com oito processamentos alternativos e as subunidades NR2A, 2B, 2C e 2D (MORIYOSHI *et al.*, 1991).

Por outro lado, os receptores AMPA/cainato (também denominados não-NMDA) são acoplados a canais iônicos permeáveis a sódio e potássio e, em algumas configurações, ao cálcio, e medeiam potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos (TRUSSEL *et al.*, 1988). Várias subunidades de receptores AMPA/cainato foram clonadas e classificadas de acordo com seletividade ao agonista. As subunidades GluR1 a GluR4 têm maior afinidade por AMPA,

enquanto as subunidades GluR5 a GluR7 são seletivas para cainato (GASIC *et al.*, 1992).

A família de receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs) (PIN *et al.*, 1992) está dividida em três grupos, com base na homologia da seqüência de aminoácidos, nos mecanismos de transdução de sinal e na farmacologia do receptor. Os mGluRs do grupo I, que incluem mGluR1 e mGluR5, são positivamente acoplados à hidrólise do fosfatidilinositol e a ativação destes receptores culmina na ativação da PKC e no aumento nos níveis de cálcio intracelular (CONN *et al.*, 1997). Os grupos II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, 6, 7, 8) de mGluRs compreendem receptores negativamente acoplados à enzima adenilato ciclase, inibindo a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (HAYASHI *et al.*, 1994).

Na medula espinhal, evidências recentes indicam o envolvimento de receptores AMPA/cainato principalmente na transmissão da dor nociceptiva (SHIMIZU *et al.*, 1995; RUSCHEWEYH & SANDKÜHLER, 2002), caracterizada por uma estimulação fásica dos nociceptores. Já estudos eletrofisiológicos (HALEY *et al.*, 1990) e comportamentais (CODERRE & MELZACK, 1992; EISENBERG *et al.*, 1994) apontam para uma função mais pronunciada dos receptores NMDA em ocasiões de ativação tônica ou prolongada dos nociceptores, como injeção intraplantar de formalina, carragenina ou adjuvante completo de Freund, bem como estados de dor crônica, que envolvem indução de sensibilização central (BARANAUSKAS & NISTRÌ, 1998). Assim, embora receptores NMDA e não NMDA sejam ativados por um único estímulo que adentra a raiz dorsal da medula através de uma fibra C, os principais contribuintes para o monopotencial pós-sináptico excitatório são receptores não NMDA. KING & LOPEZ-GARCIA (1993) observaram que receptores não NMDA contribuem substancialmente para a neurotransmissão e o processamento somatossensorial de estímulos cutâneos inócuos e nocivos, enquanto receptores NMDA estão envolvidos em respostas sinápticas relativamente lentas. De fato, BARANAUSKAS *et al.* (1995) observaram que a despolarização cumulativa é fortemente inibida por antagonistas de receptores NMDA, bem como a somação de potenciais de ação (*wind up*) característica de quadros de dor crônica.

Além disso, a redução da expressão do mGluR1 com oligonucleotídeo *antisense* em ratos com lesão de nervo reduziu significativamente a hiperalgesia ao frio e ao calor e a alodinia mecânica (FUNDYTUS *et al.*, 2001). Também o tratamento de animais com agonistas de receptores do grupo II promoveu analgesia. Estes estudos sugerem que os mGluRs também podem modular o processamento nociceptivo (NEUGEBAUER & CARLTON, 2002).

Como se pode perceber, o glutamato, principalmente através de receptores NMDA, parece exercer um papel importante também nos quadros de dor crônica e particularmente de dor neuropática que será descrito em seguida.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Conforme apresentado, os mecanismos envolvidos na dor crônica neuropática permanecem obscuros, o que resulta em diagnósticos equivocados e tratamentos inadequados. Além disso, a literatura indica que tais mecanismos envolvidos na dor neuropática trigeminal e espinal são diferentes.

Embora tenha-se conhecimento de que o glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, foi demonstrada recentemente sua importante participação periférica na nocicepção aguda orofacial induzida por formalina (CHICHORRO, 2002). O objetivo deste estudo é avaliar com maior detalhe o papel do glutamato na nocicepção aguda e crônica orofacial e propôr novas possibilidades terapêuticas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A avaliação do papel do glutamato foi verificada através da utilização de bloqueadores de canais e receptores específicos. Assim, os experimentos foram realizados no sentido de:

- Verificar se a injeção de glutamato exógeno na região orofacial é capaz de induzir nocicepção ou sensibilização a estímulos nocivos de natureza térmica (calor e frio).
- Avaliar o efeito do anticonvulsivante lamotrigina (bloqueador de canais de sódio), da memantina (antagonista de receptores NMDA) e do MK-801 (antagonista de receptores NMDA) sobre a nocicepção e sensibilização induzidas por glutamato.
- Avaliar o efeito da lamotrigina, da memantina e do MK-801 sobre a hiperalgesia ao frio e ao calor após contração crônica do nervo infraorbital.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. ANIMAIS**

Em todos os experimentos foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180-240 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 7:00h) com livre acesso à ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo dois dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de seis animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante o ciclo claro entre 11:00 e 19:00 horas.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para manejo e investigação de dor experimental em animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Universidade Federal do Paraná (processo aprovado registrado sob o protocolo número 100).

#### **3.1.2. DROGAS, DOSES E/OU CONCENTRAÇÕES E SOLUÇÕES**

Lamotrigina (Sigma, Chemicals & Co, EUA) - anticonvulsivante, bloqueador de canais de sódio.

3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg - via intraperitoneal (i.p.).

Memantina (Ebix™, cloridrato de memantina, Lundbeck) - antagonista de receptores NMDA de glutamato.

0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg – via oral (v.o.).

MK-801 (Sigma, Chemicals & Co, EUA) - antagonista de receptores NMDA de glutamato).

2,5; 5,0 e 10,0 nM (50  $\mu$ L) – administração local.

Diazepam (Sigma, Chemicals & Co, EUA) - benzodiazepínico, ativador de canais de cloreto.

5,0 mg/Kg – via subcutânea (s.c.).

Glutamato (Sigma, Chemicals & Co, EUA) - aminoácido excitatório, neurotransmissor.

3,0; 10,0 e 30,0 mM (50  $\mu$ L) – administração local.

Solução salina estéril 0,9%.

Os veículos para a diluição das drogas utilizadas corresponderam à:

Solução de carboximetilcelulose 0,5% (CMC), Tween 80 0,4% e álcool benzílico 0,9% em salina para dissolução da lamotrigina.

Solução de CMC 0,5% em salina para suspensão da memantina.

Água destilada estéril como veículo do MK-801.

Solução salina estéril 0,9% para dissolução do glutamato.

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados à temperatura de 120°C durante 30 minutos ou adquiridos estéreis e as soluções preparadas em condições assépticas.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. TESTE DE NOCICEPÇÃO OROFACIAL INDUZIDA POR GLUTAMATO**

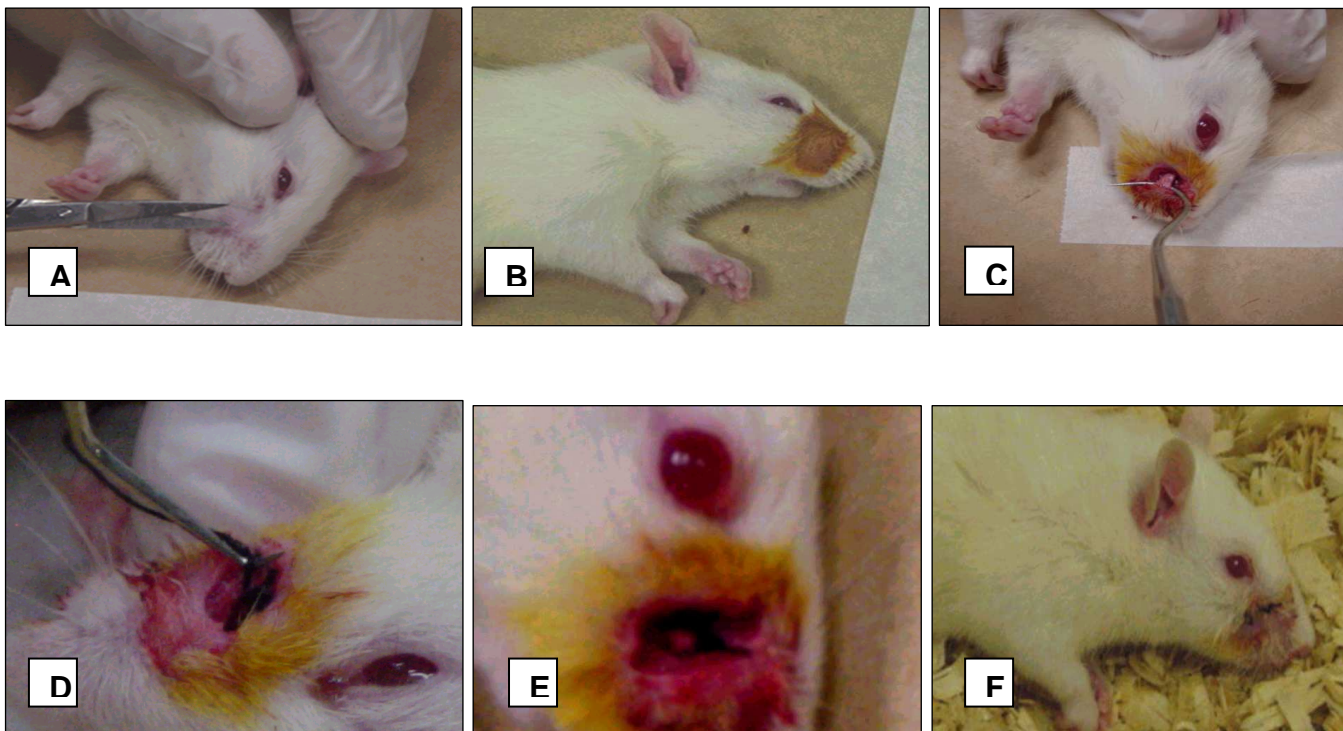
Para este teste utilizou-se a metodologia descrita por CLAVELOU *et al.* (1989) modificada. Os animais foram colocados em caixas de acrílico por dez minutos para ambientação antes de qualquer tratamento. Decorrido este



tempo, foi feita uma injeção de glutamato 10 mM (50 µL) na região orofacial (lábio superior) dos animais. Animais controle receberam o mesmo volume de solução salina na região orofacial. Imediatamente após a injeção, os animais foram novamente colocados na caixa de observação e foi registrado o tempo de *grooming* facial regional efetuado pelos mesmos durante 15 min (divididos em blocos de 3 min de observação) com um cronômetro digital.

### **3.2.2. CIRURGIA DE CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL (CCNI)**

Esta técnica foi utilizada para avaliar os fenômenos de hiperalgesia ao frio e ao calor que se desenvolvem durante o estado de neuropatia na região inervada pelo trigêmeo promovida pela constrição do nervo. A cirurgia foi realizada a partir do modelo desenvolvido por VOS *et al.* (1994), com algumas modificações de acordo com CHICHORRO *et al.* (2006). Os animais foram anestesiados com tiopental (40 mg/Kg, i.p.) e foi feita assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, efetuou-se uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masséter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas separadas aproximadamente 2 mm com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os animais do grupo falso-operado (*sham*) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção da constrição do feixe nervoso. A incisão foi suturada e ao término da cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (Terramicina<sup>®</sup>; 0,20 ml, i.m.) e mantidos em sala aquecida até que se recuperassem da anestesia. O procedimento geral da cirurgia está ilustrado na prancha 1.



Prancha 1. Cirurgia de constrição do nervo infraorbital. A – tricotomia. B – assepsia. C – isolamento do nervo. D – parâmetro de pressão do nó. E – duas amarras intervaladas por 2-3 mm. F – sutura externa e recuperação do animal.

### 3.2.3. TESTE DE HIPERALGESIA AO FRIO

Antes de cada sessão de testes, os animais foram adaptados individualmente às caixas de observação. O animal foi gentilmente imobilizado dentro da caixa de observação e a estimulação ao frio consistiu na aplicação de um spray de tetrafluoroetano (-20°, Aerojet®) por 1 s ipsilateral ao local onde se injetou glutamato ou realizou-se a constrição do nervo, no centro das vibrissas. Imediatamente após a aplicação do spray, o tempo despendido pelos

animais executando o *grooming* facial com ambas as patas dianteiras direcionadas à região onde foi aplicado o spray foi registrado durante dois minutos e foi considerado como um índice de hiperalgesia ao frio. Estudos prévios demonstraram que a temperatura da pele na região das vibrissas diminui de 30 °C para 14 °C em poucos segundos e retorna ao nível basal dentro de 2 min (Chichorro *et al.*, 2006).

Os animais utilizados nestes experimentos foram selecionados imediatamente antes da injeção de glutamato ou da cirurgia de constrição do nervo, utilizando-se o mesmo procedimento e somente animais que apresentaram um tempo de *grooming* facial basal inferior a 20 segundos após a aplicação do spray (média de duas aplicações) foram incluídos nos experimentos.

Nos estudos com glutamato, os animais foram expostos novamente ao estímulo 30 min após a injeção de glutamato e subseqüentemente a cada hora durante 6 horas.

Em estudos prévios em nosso grupo, foi observado que a hiperalgesia ao estímulo de frio é máxima no quarto dia após a cirurgia (CHICHORRO *et al.*, 2006). Assim, nos estudos onde se fez a constrição do nervo infraorbital, quatro dias após a cirurgia os animais foram novamente expostos ao estímulo térmico (frio) ipsilateral à constrição imediatamente antes de qualquer tratamento com drogas (verificação da instalação do quadro de hiperalgesia) e 30 minutos e subseqüentemente a cada hora durante 6 h após os tratamentos.

Para melhor visualização do teste, as etapas são demonstradas na prancha 2.

#### **3.2.4. TESTE DE HIPERALGESIA AO CALOR**

Este teste foi realizado utilizando a extremidade aquecida de um pirógrafo (fonte de calor radiante), que, após a imobilização do animal, foi colocada a uma distancia constante em relação à região inervada pelo nervo infraorbital, no lado ipsilateral à injeção de glutamato ou à constrição nervosa. A esta distância constante, a temperatura induzida pela fonte de calor é de aproximadamente 45 °C. Imediatamente após a aplicação, o tempo necessário para os animais demonstrarem a sensação de desconforto, evidenciada por

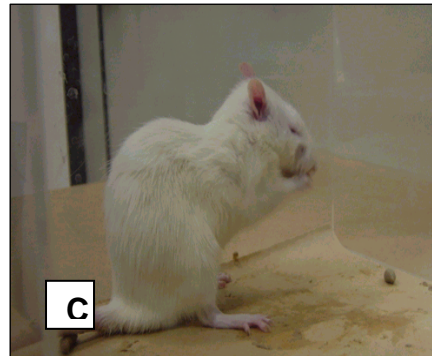
movimento vigoroso das vibrissas, foi registrado e considerado como índice de hiperalgesia ao calor. Anteriormente à aplicação de glutamato ou à cirurgia de constrição do nervo, os animais foram selecionados utilizando o mesmo processo descrito acima e foram incluídos nos experimentos apenas animais com tempo de resposta superior a dez segundos após a exposição à fonte de calor (média de três medidas basais).

Nos estudos com glutamato, os animais foram expostos novamente ao estímulo 30 min após a injeção de glutamato e subseqüentemente a cada hora durante 6 h. Em estudos prévios do nosso grupo, observou-se que a hiperalgesia térmica ao calor é máxima no sexto dia (CHICHORRO *et al.*, 2006). Nos estudos onde se fez a constrição do nervo infraorbital, seis dias após a cirurgia de constrição, os animais foram novamente expostos ao estímulo de calor ipsilateral à constrição imediatamente antes de qualquer tratamento com drogas (verificação da instalação do quadro de hiperalgesia) e 30 minutos e subseqüentemente a cada hora durante 6 h após os tratamentos. As diferentes etapas do teste de hiperalgesia ao calor estão ilustradas na prancha 3.

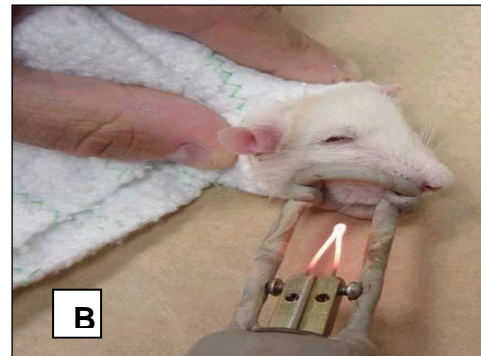
### **3.2.5. TESTE DE DESEMPENHO MOTOR**

Uma vez que os testes acima se baseiam no desempenho motor do animal em realizar o *grooming* na área estimulada ou executar o movimento de afastamento das vibrissas da fonte de calor foi necessário avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre este parâmetro. Este teste foi realizado através do aparelho Rota-Rod, que consiste de um eixo giratório sobre o qual o animal é colocado, a fim de avaliar o efeito das drogas utilizadas sobre o sistema motor.

Neste teste, foi registrado o tempo de permanência do animal durante três minutos sobre o eixo, que gira a uma velocidade constante (16 rotações por min), 30 min após o tratamento com a lamotrigina e o diazepam e 60 min após o tratamento com memantina e os respectivos veículos de cada droga (1,0 mL/Kg).



Prancha 2. Teste de hiperalgesia ao frio. A – habituação. B – Aplicação do estímulo. C – resposta comportamental.



Prancha 3. Teste de hiperalgesia ao calor. A – imobilização do animal. B – aplicação do estímulo.

### 3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. ESTUDOS AGUDOS: NOCICEPÇÃO E SENSIBILIZAÇÃO INDUZIDAS POR GLUTAMATO

Os estudos agudos foram realizados através da injeção de glutamato no lábio superior dos animais. Para padronização da dose ideal de glutamato os animais receberam concentrações diferentes de glutamato (3,0; 10,0 e 30,0 mM, 50  $\mu$ L, orofacial). Animais controle receberam injeção de solução salina no lábio superior. A concentração de 30,0 mM mostrou maior eficiência na indução de *grooming* facial, mas não diferiu significativamente da concentração de 10,0 mM, sendo esta última utilizada para estudos subseqüentes para verificação da ação de drogas sobre a nocicepção induzida pela injeção de glutamato e de sensibilização aos estímulos nocivos de frio e calor .

Uma vez selecionada a dose de glutamato a ser utilizada, avaliou-se a efetividade desta dose em produzir hiperalgesia aos estímulos de frio e calor. Para isto, os animais receberam 10mM de glutamato e após 30 minutos foram submetidos à estimulação por frio ou calor 30 min, subseqüentemente, a cada hora durante 6 h e, novamente, 24 h após a injeção de glutamato.

Estabelecidos os parâmetros de resposta ao glutamato, avaliou-se o efeito das drogas sobre a nocicepção causada pela injeção do glutamato. Os animais receberam, previamente à injeção de glutamato, lamotrigina (3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg, i.p., 30 min antes), memantina (0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg, v.o., 60 min antes) ou MK-801 (2,5; 5,0 e 10,0 nM, local, 30 min antes). Animais controle receberam salina no lábio e o mesmo volume dos respectivos veículos. Após a injeção de glutamato e o tempo de *grooming* facial foi registrado durante 15 min.

Uma vez que esta dose de glutamato não foi capaz de induzir sensibilização ao calor, o efeito das drogas em teste foi avaliado somente sobre a sensibilização ao frio local causada pela injeção do glutamato. Os animais receberam, previamente à injeção de glutamato, lamotrigina (3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg, i.p., 30 min antes), memantina (0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg, v.o., 60 min antes) ou MK-801 (2,5; 5,0 e 10,0 nM, local, 30 min antes). Animais controle receberam salina no lábio e o mesmo volume dos respectivos veículos. O

estímulo de frio foi aplicado 30 min após a injeção de glutamato e, subseqüentemente, a cada 60 min durante seis horas após a injeção de glutamato e o tempo de *grooming* facial foi registrado.

### **3.2. ESTUDOS CRÔNICOS: HIPERALGESIA AO FRIO E CALOR APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL**

Para a padronização do procedimento cirúrgico, foi verificado o efeito da cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital (CCNI) sobre a resposta ao estímulo de frio. Foram determinados os níveis basais de *grooming* facial antes de qualquer intervenção cirúrgica e, quatro dias após a cirurgia, os grupos *naive*, *sham* e constricto foram submetidos à estimulação ao frio e registrou-se o tempo de *grooming* facial de cada grupo.

Uma vez padronizada a técnica, foi avaliado o efeito dos diferentes tratamentos na hiperalgesia induzida pelo frio. Para tanto, previamente à cirurgia e quatro dias após a cirurgia, animais CCNI foram submetidos ao teste de hiperalgesia térmica para determinação dos níveis basais de *grooming* em cada grupo e verificação da instalação do quadro hiperalgésico. Em seguida, os animais foram tratados com lamotrigina (3,0; 10,0 e 30 mg/Kg, i.p.) memantina (0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg, v.o.) ou MK-801 (2,5; 5,0 e 10,0 nM, 50 µL/sítio) ou o mesmo volume dos respectivos veículos e a estimulação térmica foi feita 30 min e a cada 60 min durante 6 horas após o tratamento com as diferentes drogas.

Em seguida, avaliou-se o efeito dos diferentes tratamentos na hiperalgesia induzida pelo calor. Previamente à cirurgia e 6 dias após a cirurgia, animais CCNI foram submetidos ao teste de hiperalgesia térmica para determinação dos níveis basais de *grooming* em cada grupo e verificação da instalação do quadro hiperalgésico ao calor. Em seguida, os animais foram tratados com as maiores doses de lamotrigina (30 mg/Kg, i.p.) memantina (3,0 mg/Kg, v.o.) ou MK-801 (10,0 nM, local, 50 µL/sítio) ou o mesmo volume dos respectivos veículos e a estimulação térmica foi feita 30 min e a cada 60 min durante 6 horas após o tratamento com as diferentes drogas.

### 3.3.3. TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA

Neste teste, foi avaliado o efeito da lamotrigina e da memantina sobre a performance motora dos animais. Os animais foram selecionados 24 h antes do experimento, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho de rota-rod por, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60 s. Os animais selecionados foram tratados com lamotrigina (30,0 mg/Kg, i.p.), memantina (3,0 mg/Kg, v.o.), diazepam (5,0 mg/kg, s.c.) ou os respectivos veículos (1,0 mL/Kg) 60 min antes do teste. A seguir, os animais foram levados ao aparelho e observados por um período de três minutos. O resultado foi dado pela média de tempo de permanência de cada grupo no aparelho em segundos.

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes de nocicepção induzida por glutamato, sensibilização e hiperalgesia ao frio, foi registrado o tempo de *grooming* facial (em segundos) após cada aplicação do estímulo. Para o teste de hiperalgesia ao calor, foi registrado o tempo de resposta ao estímulo, em segundos. E, no teste de desempenho motor, foi registrado o tempo de permanência em segundos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para um n de 6 a 10 para cada grupo experimental. Os dados registrados foram avaliados por análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas entre os grupos seguida por teste *post-hoc* de Tukey para comparação entre os grupos nos experimentos que envolviam medidas de hora em hora. As análises do teste de desempenho motor e da área sob a curva foram feitas por ANOVA de uma via, também seguida pelo teste de Tukey e experimentos que envolveram apenas dois grupos foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student.

Os resultados são apresentados como porcentagem de inibição, calculados da seguinte forma:



Média do grupo salina (estudo agudo) ou sham (estudo crônico) tratado com veículo da droga em teste = x

Média do grupo glutamato (estudo agudo) ou operado (estudo crônico) tratado com veículo da droga em teste = y

$y - x = \%$  máxima de inibição (m)

Média do grupo glutamato (estudo agudo) ou constricto (estudo crônico) tratado com cada droga = d, e, f

d (e ou f) - x = n m \_\_\_\_\_ % máxima de inibição

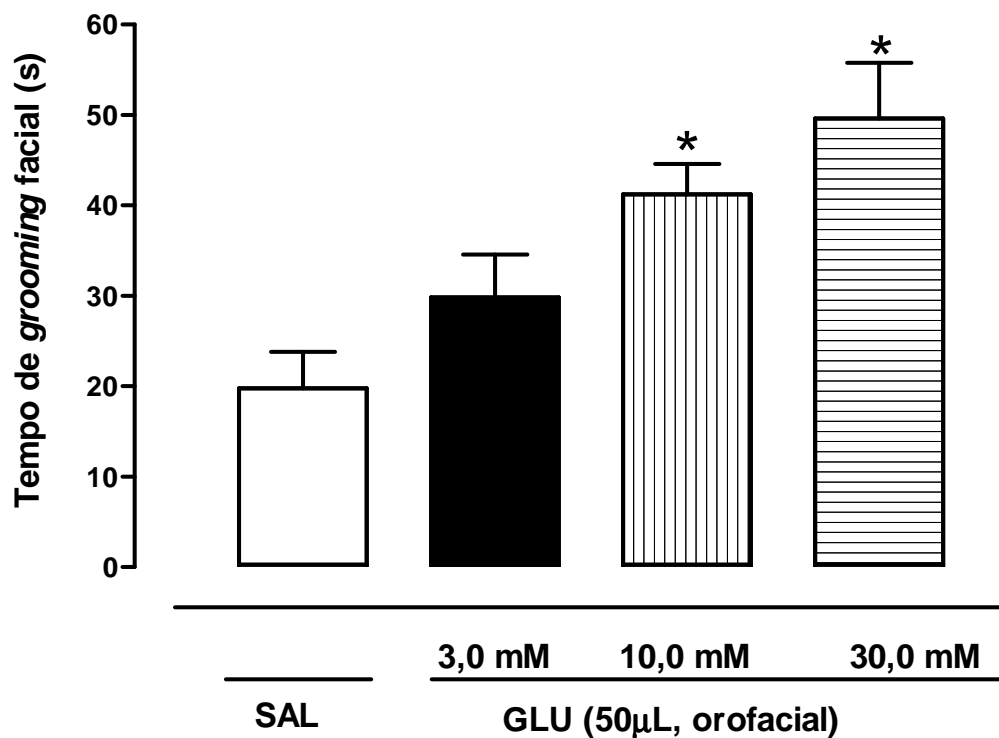
n \_\_\_\_\_ % de inibição induzida por determinada droga

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDOS AGUDOS

#### 4.1.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR GLUTAMATO

Os animais que receberam salina na região orofacial apresentaram *grooming* facial durante  $19,8 \pm 4,1$  s. Após a aplicação de glutamato no lábio superior dos animais, observou-se que os animais exibiram um tempo de *grooming* facial significativamente maior nas doses de 10,0 e 30,0 mM de glutamato ( $41,2 \pm 3,4$  e  $49,6 \pm 6,2$  s respectivamente) do que os animais que receberam apenas salina (figura 5). A dose de 3,0 mM de glutamato não induziu um aumento significativo do *grooming* facial. Como não houve diferença significativa entre as concentrações de 10,0 e 30,0 mM, a concentração de 10,0 mM foi selecionada para os experimentos posteriores, pois foi a menor concentração capaz de induzir *grooming* facial.



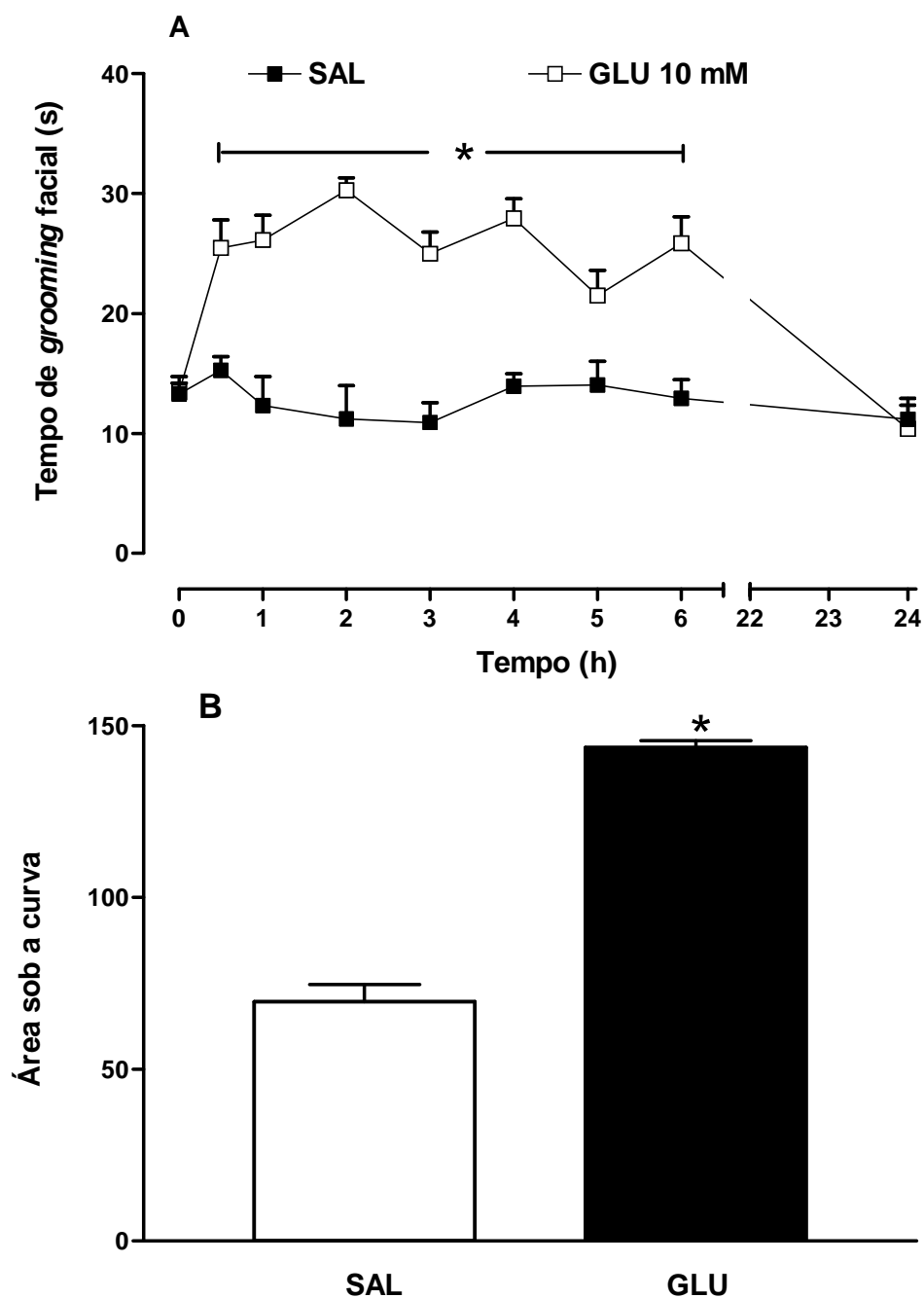
**Figura 5. Indução de nocicepção através da injeção de diferentes doses de glutamato na região orofacial.** Os animais receberam glutamato (GLU) (3,0,; 10,0 e 30,0 mM, 50  $\mu$ L) ou o mesmo volume de salina (SAL). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 8) do tempo de *grooming* facial durante quinze minutos após aplicação do estímulo. Significância estatística em relação ao grupo salina (\*) P < 0,05. Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

#### 4.1.2. HIPERALGESIA AOS ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS TÉRMICOS INDUZIDA POR GLUTAMATO

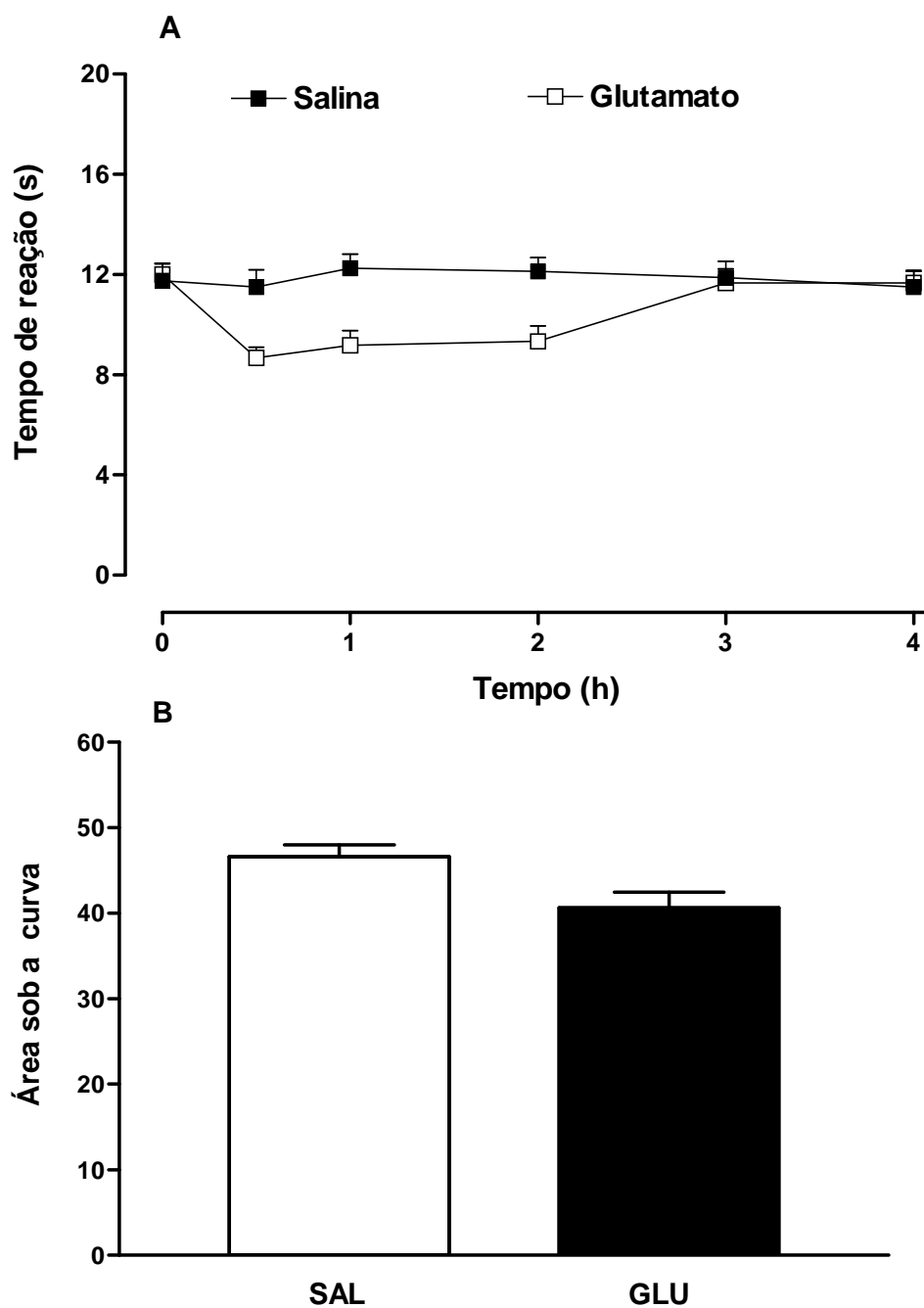
Este teste permitiu avaliar se o glutamato também induz a instalação de um estado de hipersensibilidade ao frio na região orofacial. Os animais que receberam salina, não apresentaram variações significativas de sensibilidade ao frio durante todo o período de teste. Por outro lado, os animais que receberam glutamato apresentaram uma maior sensibilidade ao frio na área injetada em relação aos animais que receberam salina. O tempo médio de *grooming* facial para o grupo salina foi de  $12,7 \pm 1,8$ , enquanto o do grupo que recebeu glutamato orofacial foi de  $26,0 \pm 1,9$  s (figura 6A).

Além disso, observou-se também que essa sensibilização teve início 30 min após a injeção de glutamato e permaneceu significativamente maior do que o grupo que recebeu somente o veículo por um período de pelo menos seis horas. Após 24h os animais que receberam glutamato não apresentaram diferença significativa em relação aos animais controle (figura 6A). A representação da área sob a curva aponta um aumento de 106,3% em relação ao grupo controle (figura 6B).

Em relação ao estímulo de calor, os animais que receberam salina, não apresentaram variações significativas de sensibilidade durante todo o período de teste (figura 7A). Observamos ainda que o glutamato, apesar de induzir uma leve tendência de diminuir o tempo de reação dos animais de, em média, três segundos, não houve relevância estatística nesse parâmetro (figura 7A). Além disso, foi notado que essa redução se estabeleceu apenas nas duas primeiras horas após a injeção de glutamato. A representação da área sob a curva indica uma redução do tempo de reação de 13,9% em relação ao grupo controle (figura 7B).



**Figura 6. Hiperálgia ao estímulo de frio induzida por glutamato.** Os animais receberam glutamato (GLU, 10,0 mM, 50  $\mu$ L, orofacial) ou salina (SAL, 50  $\mu$ L, orofacial) e o estímulo de frio foi aplicado nos intervalos de tempo determinados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após a aplicação do spray da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo salina (\*) P < 0,01. Análise estatística realizada por Teste t de Student.



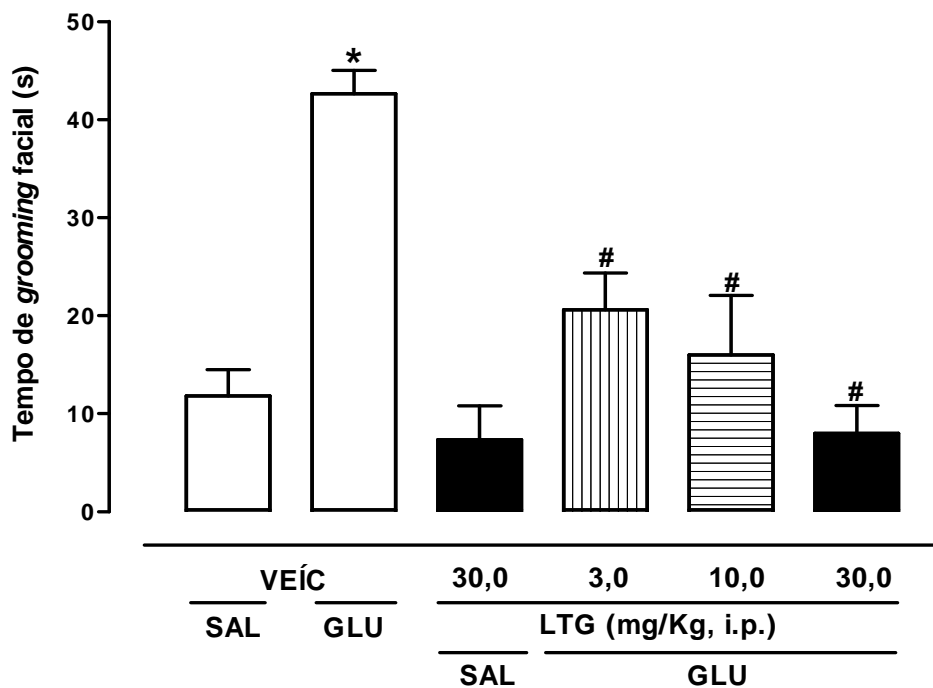
**Figura 7. Sensibilização local ao estímulo de calor induzida por glutamato.** Os animais receberam glutamato (GLU, 10,0 mM, 50  $\mu$ L, orofacial) ou salina (SAL, 50  $\mu$ L, orofacial) e o estímulo de calor foi aplicado em intervalos de tempo determinados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de reação após exposição à fonte de calor (painel A) ou a área sob a curva de cada grupo (painel B). Análise estatística realizada por Teste t de Student. Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### 4.1.3. EFEITO DA LAMOTRIGINA, MEMANTINA E MK-801 SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR GLUTAMATO

Após a padronização do teste e da dose a ser utilizada no estudo da ativação de nociceptores pelo glutamato, avaliou-se o efeito da lamotrigina, um anticonvulsivante bloqueador de canais de sódio, sobre a nocicepção induzida pelo glutamato. A administração de lamotrigina e salina não promoveu qualquer alteração significativa no *grooming* basal apresentado pelos animais (figura 8). A lamotrigina, em todas as doses empregadas (3,0; 10,0 e 30,0 mg/Kg, i.p.) promoveu uma redução significativa do tempo de *grooming* facial dos animais tratados de 71,6%, 86,5% e 112,4% respectivamente (figura 8).

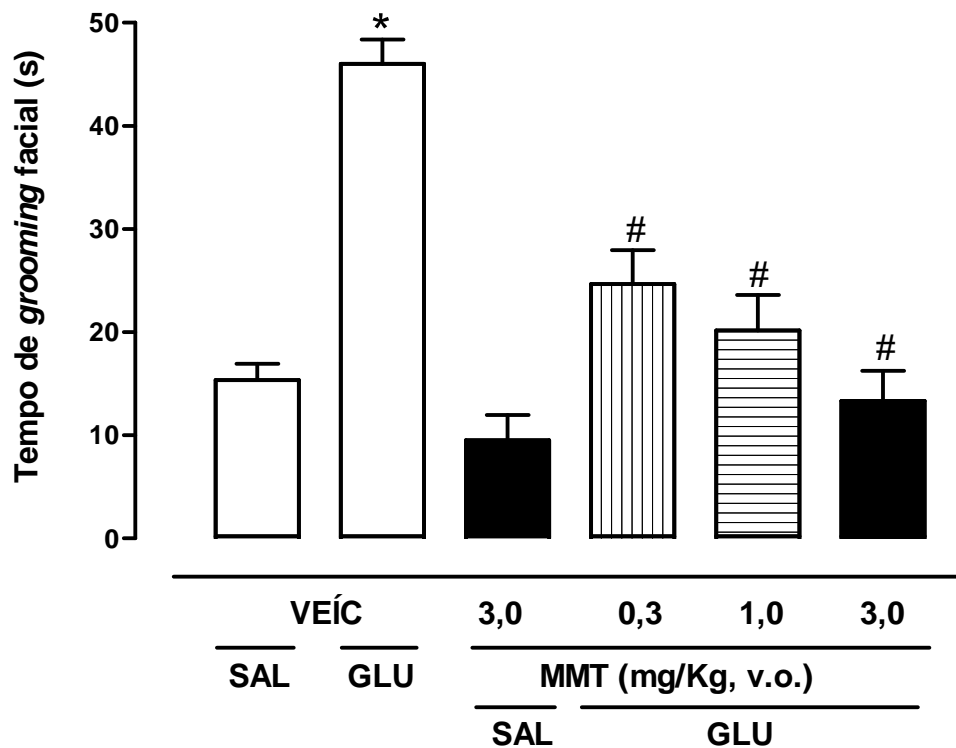
Em seguida, foi verificado o efeito da memantina, um bloqueador não competitivo de receptores NMDA para o glutamato, frente à nocicepção induzida por glutamato orofacial. A administração de memantina e salina não promoveu qualquer alteração significativa no *grooming* basal apresentado pelos animais (figura 9). Além disso, os resultados demonstraram que a memantina também foi eficaz em reverter a nocicepção causada pelo glutamato, de forma dose dependente, em todas as doses testadas, nas proporções de 69,5%, 84,2% e 106,5%, para as doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg (v.o.), respectivamente (figura 9). A dose mais alta testada (3,0 mg/Kg) foi eficaz a ponto de produzir registros de *grooming* facial semelhantes aos do grupo controle que recebeu somente salina orofacial.

Por fim, avaliou-se o efeito antinociceptivo do MK-801 sobre a nocicepção induzida por glutamato através da administração local do mesmo, com o intuito de verificarmos a participação do componente periférico da nocicepção induzida neste modelo. Conforme ilustrado na figura 10, podemos perceber que a aplicação local de MK-801 antes da injeção de glutamato reduziu o tempo de *grooming* facial significativamente, e de maneira dose dependente, nas concentrações de 5,0 e 10,0 nM (104,9% e 113,2%, respectivamente). A concentração mais baixa (2,5nM) causou uma redução de apenas 26,6% e não foi estatisticamente significativa.

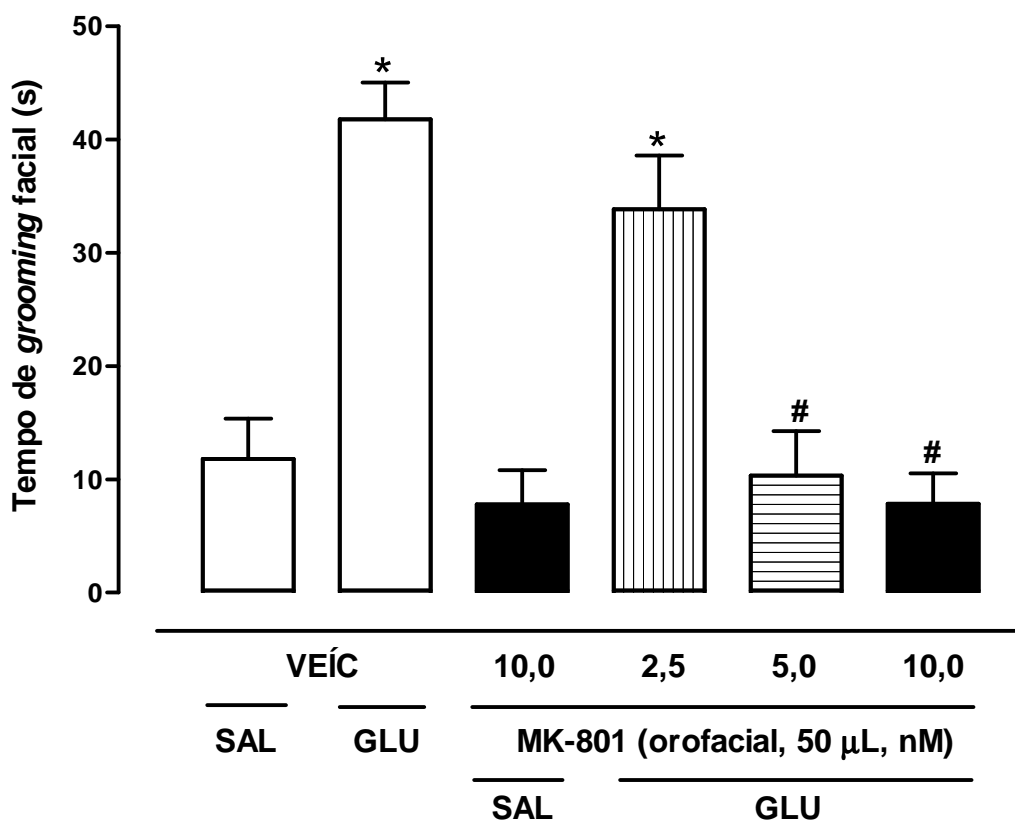


**Figura 8. Efeito da lamotrigina sobre a nociceção induzida por glutamato administrado na região orofacial.** Os animais receberam lamotrigina (LTG) (3,0; 10,0 ou 30,0 mg/Kg, i.p.) ou veículo (VEÍC) (1 mL/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção orofacial de glutamato (GLU) (50  $\mu$ L, 10 mM, orofacial) ou salina (SAL) (50  $\mu$ L, orofacial). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante quinze minutos após a aplicação do estímulo. Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*)  $P < 0,001$ . Em relação ao grupo glutamato veículo: (#)  $P < 0,01$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Tukey.





**Figura 9. Efeito da memantina sobre a nocicepção induzida por glutamato administrado na região orofacial.** Os animais receberam memantina (MMT - 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/Kg, v.o.) ou veículo (VEÍC) (1 mL/Kg, v.o.) 60 minutos antes da injeção orofacial de glutamato (GLU) (50  $\mu$ L, 10 mM, orofacial) ou salina (SAL) (50  $\mu$ L, orofacial). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante quinze minutos após a aplicação do estímulo. Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*) P < 0,001. Em relação ao grupo glutamato veículo: (#) P < 0,01. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 10. Efeito do MK-801 sobre a nociceção induzida por glutamato administrado na região orofacial.** Os animais receberam MK-801 (2,5; 5,0 ou 10,0 nM, 50  $\mu$ L, orofacial) ou veículo (VEÍC - 50  $\mu$ L, orofacial) 30 minutos antes da injeção orofacial de glutamato (GLU) (50  $\mu$ L, 10 mM, orofacial) ou salina (SAL) (50  $\mu$ L, orofacial). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante quinze minutos após a aplicação do estímulo. Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*)  $P < 0,001$ . Em relação ao grupo glutamato veículo: (#)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

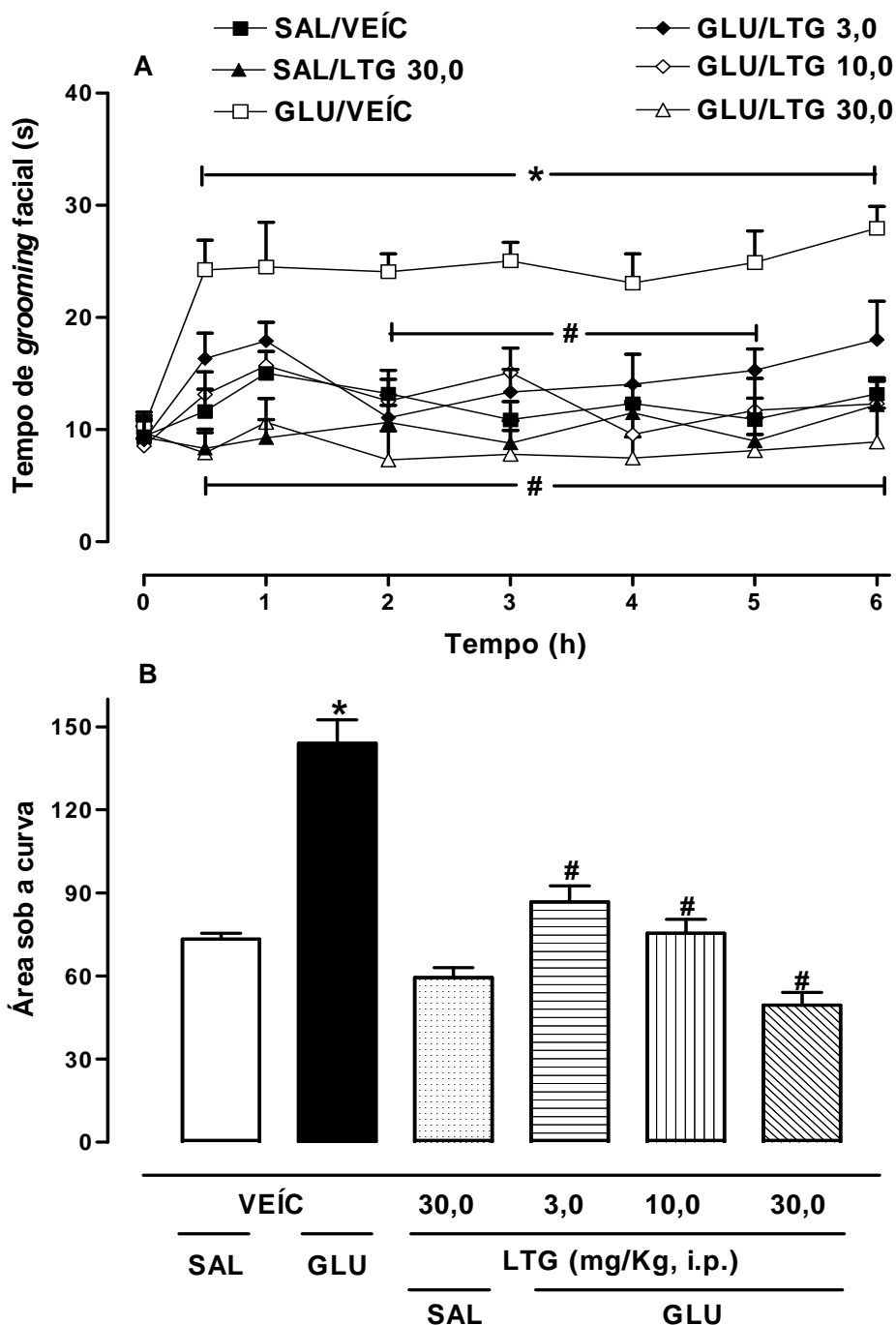
#### 4.1.4. EFEITO DA LAMOTRIGINA, MEMANTINA E MK-801 SOBRE A HIPERALGESIA AO FRIO

Uma vez que a lamotrigina demonstrou ser eficaz na redução da nocicepção induzida por glutamato, esta droga foi testada também no modelo de sensibilização ao estímulo de frio. A injeção de lamotrigina 30,0 mg/Kg (i.p.) e veículo não alterou significativamente o *grooming* basal dos animais. A lamotrigina reduziu significativamente a sensibilização provocada pelo glutamato (78,5% para a dose de 3,0 mg/Kg, 96,8% para a dose de 10,0 mg/Kg e 133,4% para a dose de 30,0 mg/Kg) (figura 11A). A analgesia promovida pela lamotrigina na dose mais alta (30,0 mg/Kg i.p.) perdurou por todo o período de teste (6h) e foi substancial a ponto de produzir uma hipoalgesia, observada em função do tempo de *grooming* facial inferior ao do controle. A dose de 10,0 mg/Kg teve início de ação mais tardio (a partir da segunda hora) e a dose mais baixa (3,0 mg/Kg, i.p.), promoveu analgesia estatisticamente significativa da segunda à quinta hora do teste. A análise da área sob a curva também mostrou uma redução significativa após tratamento com lamotrigina em relação ao controle (figura 11B).

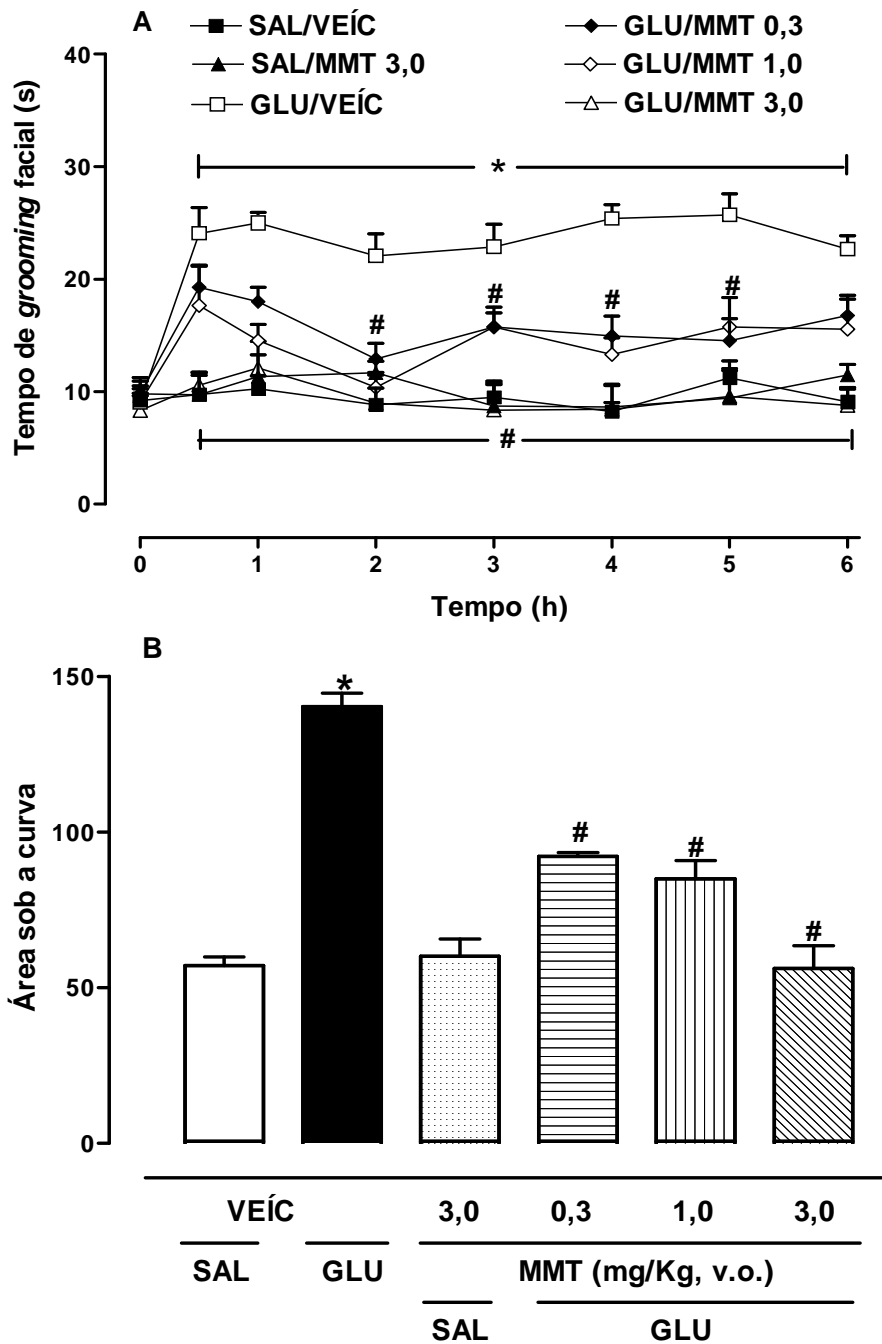
A injeção de memantina e veículo não alterou significativamente o *grooming* basal dos animais. Procedeu-se, então, o teste de sensibilização ao frio em animais tratados com a memantina para verificarmos o envolvimento de receptores NMDA na instalação desta sensibilização. Como demonstrado na figura 12A, observa-se que a memantina por via oral, em todas as doses administradas, reduziu significativamente o tempo de *grooming* facial em 55,1%, 64,1% e 100,1% , para as doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. A dose máxima utilizada (3,0 mg/Kg), foi a que apresentou maior eficácia, revertendo os tempos de *grooming* facial ao nível da medida basal, na qual os animais ainda não apresentavam sensibilização (tempo 0, figura 12A). As doses de 0,3 e 1,0 mg/Kg (v.o.) apresentaram redução estatisticamente significativa da segunda à quinta horas do teste. A análise da área sob a curva também mostrou uma redução significativa após tratamento com memantina em todas as doses em relação ao controle (figura 12B).

Finalmente, procurou-se determinar a participação de receptores NMDA periféricos na indução da sensibilização, através da aplicação orofacial de MK-

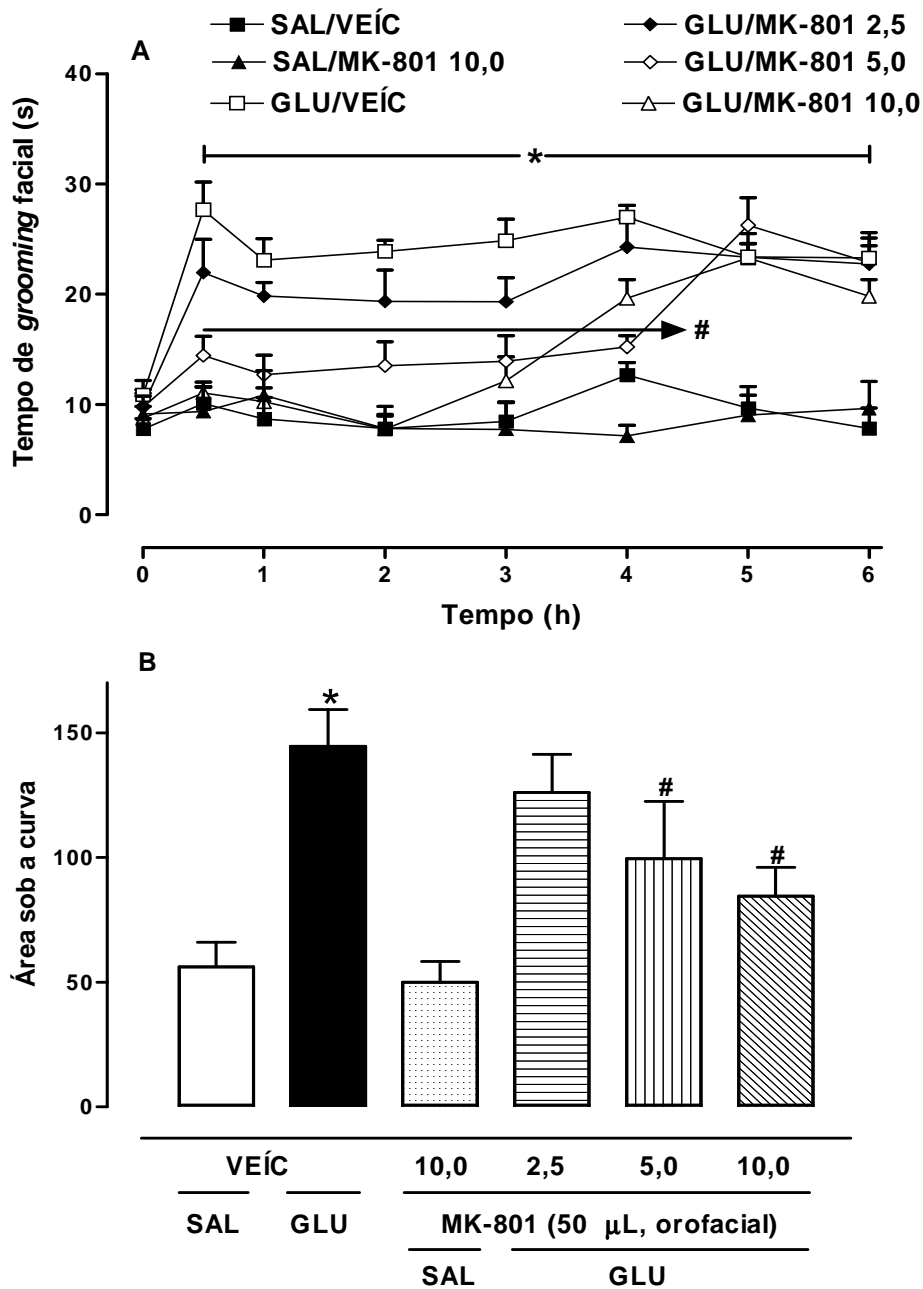
801. O bloqueio de receptores NMDA periféricos promoveu redução da sensibilização induzida pelo glutamato, o que pôde ser observado pela diminuição do tempo de *grooming* facial em resposta ao estímulo de frio (figura 13A). A ação antinociceptiva do MK-801, nas concentrações de 5,0 e 10,0 nM (50 µL, orofacial) promoveu 50,8% e 64,1% de redução do tempo de *grooming* facial, respectivamente (figura 13A). O efeito antinociceptivo iniciou-se aos 30 minutos do teste e permaneceu até a quarta hora (figura 13A). A concentração de MK-801 2,5 nM reduziu de forma parcial e não significativa o tempo de *grooming* facial (20,6%) por todo o período do teste. A análise da área sob a curva também mostrou uma redução significativa após tratamento com MK-801 em relação ao controle para as concentrações de 5,0 e 10,0 nM (figura 13B).



**Figura 11. Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a sensibilização ao frio em animais sensibilizados com glutamato.** A sensibilidade basal dos animais ao estímulo de frio foi avaliada (tempo 0). Em seguida, os animais foram tratados com lamotrigina (LTG, 3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, i.p.) e após 30 min foi administrado glutamato (GLU, 10,0 mM, 50  $\mu$ L, orofacial) ou salina (SAL, 50  $\mu$ L, orofacial) no lábio. A aplicação do estímulo térmico foi realizada subsequentemente nos intervalos de tempo determinados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de grooming facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*) P < 0,01. Significância estatística em relação ao grupo glutamato veículo: (#) P < 0,01. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, seguidas ambas por teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 12. Efeito do tratamento com memantina sobre a sensibilização ao frio em animais sensibilizados com glutamato.** Os animais passaram por uma medida basal para verificar a sensibilidade ao frio (tempo 0). Em seguida, os animais foram tratados com memantina (MMT, 0,3; 1,0 ou 3,0 mg/Kg, v.o.) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, v. o.) e, após 30 minutos, foi administrado glutamato (GLU, 10,0 mM, 50  $\mu$ L, orofacial) ou salina (SAL, 50  $\mu$ L, orofacial) no lábio. A aplicação do estímulo térmico foi realizada subsequentemente nos intervalos de tempo determinados. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*)  $P < 0,01$ . Significância estatística em relação ao grupo glutamato veículo: (#)  $P < 0,01$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, seguidas ambas por teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 13. Efeito do tratamento com MK-801 sobre a sensibilização ao frio em animais sensibilizados com glutamato.** Os animais passaram por uma medida basal para verificar a sensibilidade ao frio (tempo 0). Em seguida, os animais foram tratados com MK-801 (2,5; 5,0 e 10,0 nM, 50µL, orofacial) ou veículo (VEÍC, 50µL, orofacial) e, após 30 minutos, foi administrado glutamato (GLU, 10,0 mM, 50 µL, orofacial) ou salina (SAL, 50 µL, orofacial) no lábio. A aplicação do estímulo térmico foi realizada subsequentemente nos intervalos de tempo determinados. Os dados representam a média ± EPM (n = 6) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo salina veículo (\*) P < 0,01. Significância estatística em relação ao grupo glutamato veículo: (#) P < 0,01. A seta indica o período de tempo durante o qual a redução foi significativa. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, seguidas ambas por teste *post-hoc* de Tukey.

## 4.2. ESTUDOS CRÔNICOS

### 4.2.1. TESTE DE HIPERALGESIA AO FRIO

Este teste permitiu avaliar a indução do estado de hiperalgesia ao frio no quarto dia após a cirurgia de constrição do nervo infra-orbital. Observou-se que os animais que foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo infra-orbital (CCNI) permaneceram por tempo significativamente maior efetuando o *grooming* facial ( $28,9 \pm 2,9$  segundos) após aplicação do estímulo de frio do que os animais falso operados (*sham*,  $8,5 \pm 1,3$  segundos) ou *naive* ( $8,9 \pm 1,1$  segundos) (figura 14).

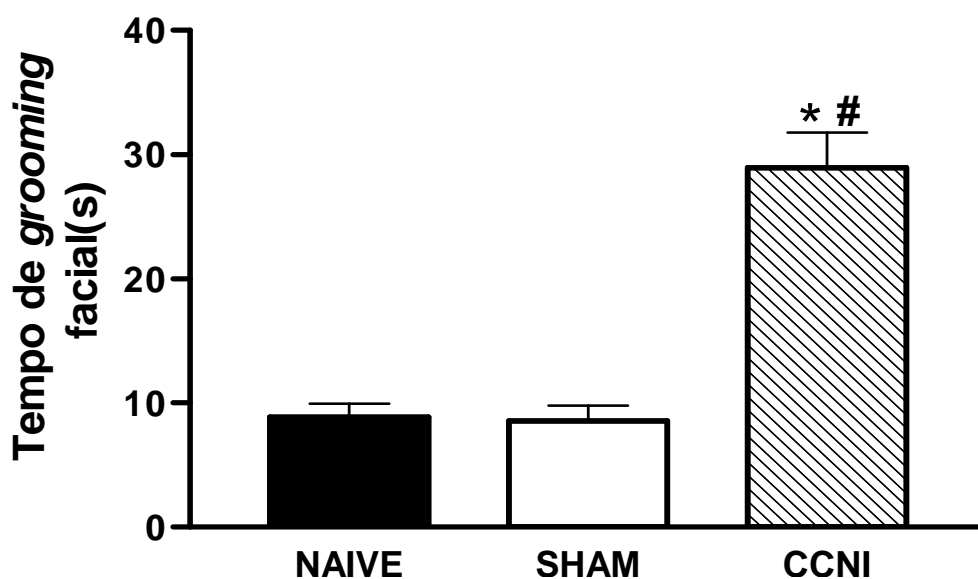
Após ter sido confirmado que a cirurgia de constrição do nervo produz sensibilização dos animais ao frio, avaliou-se o efeito da lamotrigina sobre a sensibilização ao estímulo nociceptivo induzido pelo frio. A lamotrigina, de forma dose-dependente, reverteu a hiperalgesia ao frio causada pela lesão do nervo infra-orbital (figura 15A) na dose mais alta utilizada ( $30,0$  mg/Kg, i.p.), causando inibição de 92,8% durante todo o período de teste. Por outro lado, nas doses de  $3,0$  e  $10,0$  mg/Kg (i.p.), a lamotrigina reduziu em, respectivamente, 34,7% e 42,1% o tempo de *grooming* facial. Nestas doses, o efeito antinociceptivo foi significativo a partir da segunda hora do teste e permaneceu até a quinta hora (figura 15A). A análise da área sob a curva também mostrou uma redução significativa após tratamento com lamotrigina em todas as doses em relação ao controle (figura 15B).

A administração de memantina em diferentes doses também reduziu o estado de hiperalgesia frente ao frio de maneira dose dependente, conforme mostrado na figura 16A. A memantina, na dose mais baixa ( $0,3$  mg/Kg, v.o.) reduziu em 46,4% a sensibilidade ao frio sendo seu efeito significativo apenas na segunda e na quarta hora do teste. A memantina, nas doses de  $1,0$  e  $3,0$  mg/kg (v.o.), aboliu a hiperalgesia (redução de 99,8% e 93,0% do tempo de *grooming* facial, respectivamente), de modo que os animais dos respectivos grupos constritos apresentaram tempos de *grooming* facial estatisticamente iguais aos do grupo *sham* + salina. O efeito da memantina nestas doses mostrou-se significativo a partir da primeira hora e perdurou por todo o tempo do experimento. A análise da área sob a curva também mostrou uma redução

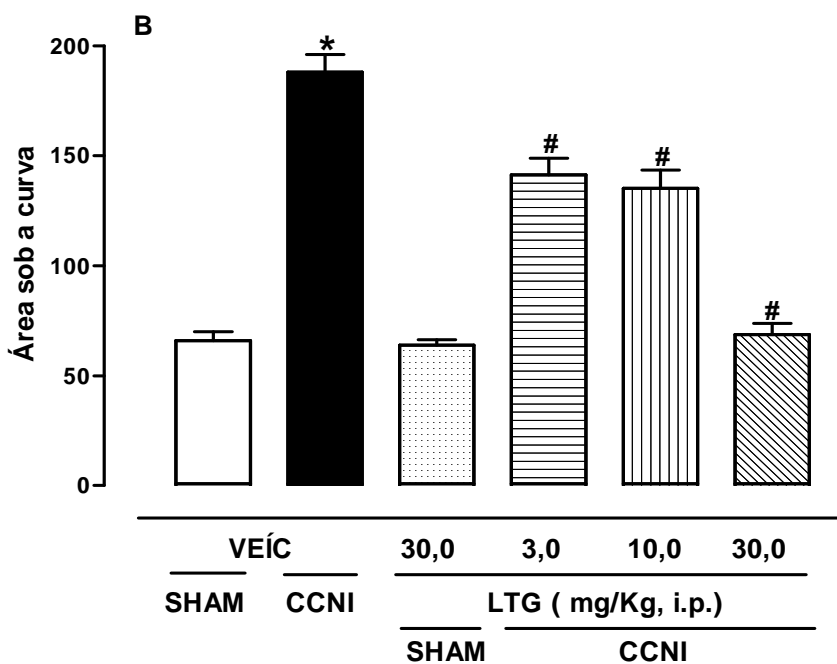
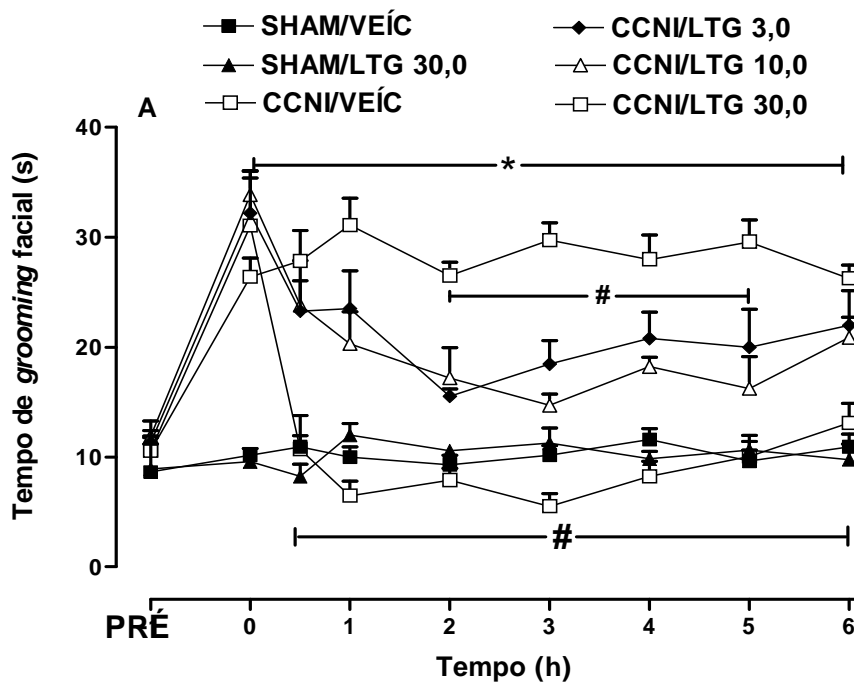


significativa após tratamento com memantina em todas as doses em relação ao controle (figura 16B).

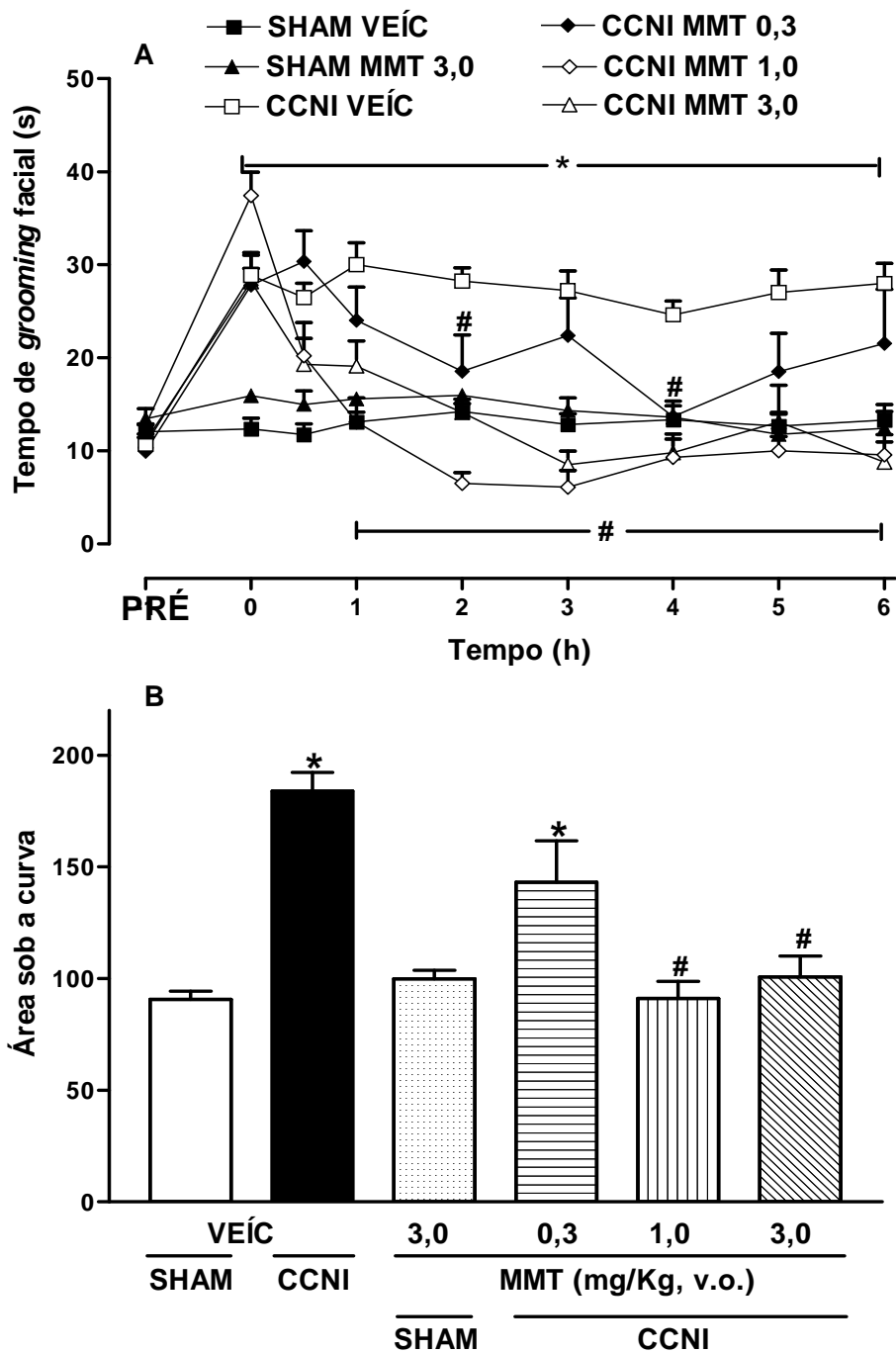
Em seguida, avaliou-se o efeito do antagonista de receptores NMDA MK-801, que também diminuiu a hiperalgesia ao frio causada pela constrição do nervo infra-orbital de maneira dependente da dose (figura 17A). A concentração mais baixa (2,5 nM/sítio) promoveu um decréscimo significativo no tempo de *grooming* facial, mas em menor proporção (38,8%) comparado às demais concentrações. O efeito máximo parece ter sido atingido na concentração de 5,0 nM, pois a redução causada pela concentração de 10,0 nM (orofacial) não diferiu significativamente da concentração de 5,0 nM (46,1% e 45,1%, respectivamente), inclusive no tempo de duração, que foi de quatro horas. A análise da área sob a curva também mostrou uma redução significativa após tratamento com MK-801 nas concentrações de 5,0 e 10,0 nM em relação ao controle (figura 17B).



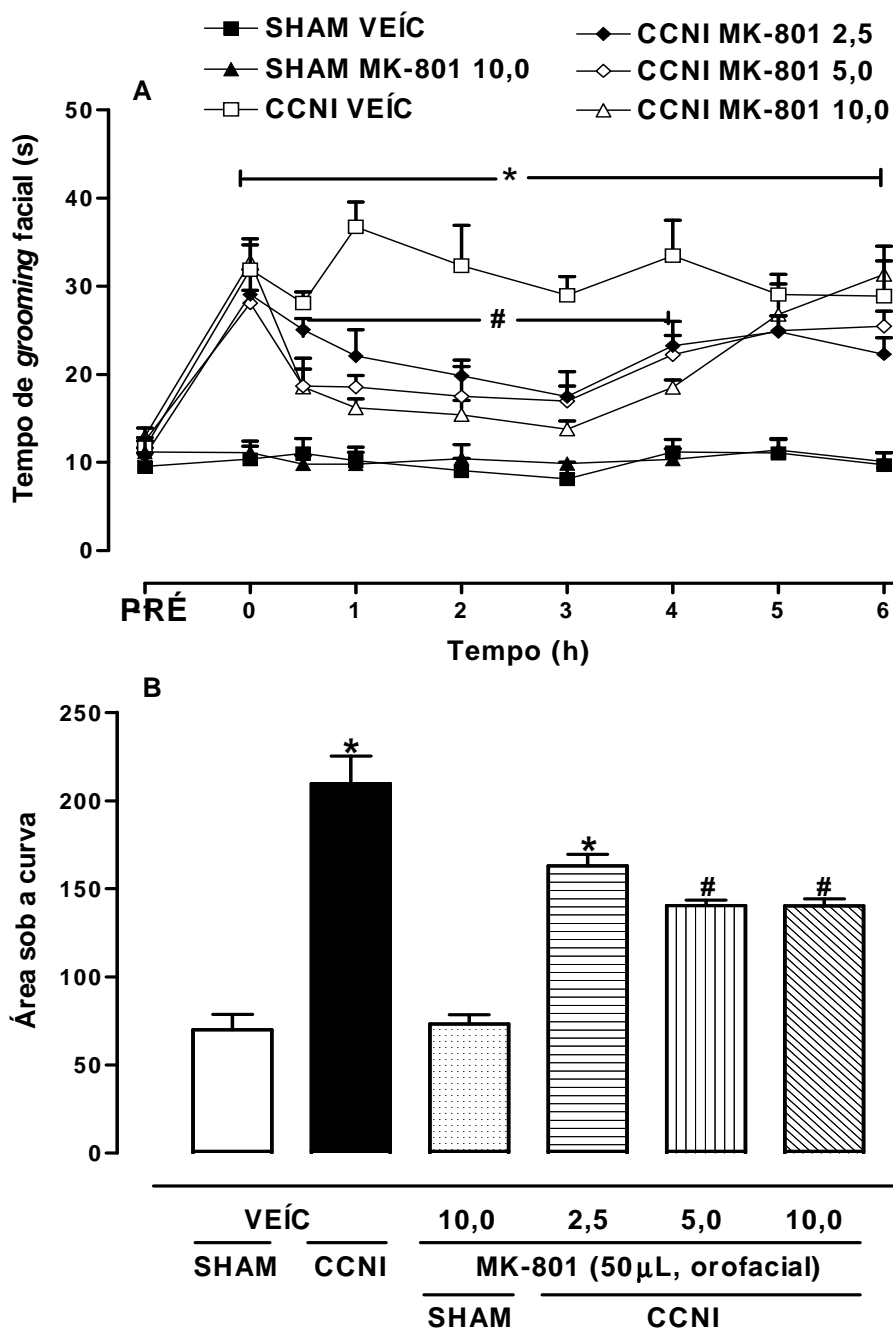
**Figura 14. Efeito da constrição do nervo infra-orbital sobre a sensibilidade ao estímulo térmico de frio.** Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo infra-orbital (CCNI) ou falsa cirurgia (SHAM) ou permaneceram sem intervenções (NAIVE). No quarto dia após a cirurgia, o estímulo térmico foi aplicado duas vezes em um intervalo de tempo de 30 minutos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicação do spray. Significância estatística em relação ao grupo sham (\*)  $P < 0,001$  e em relação ao grupo naive (#)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 15. Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao frio (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No quarto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, lamotrigina (LTG, 3,0; 10,0 ou 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, i.p.). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*)  $P < 0,001$ . Significância estatística em relação ao grupo constricto salina: (#)  $P < 0,01$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via para o painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 16. Efeito do tratamento com memantina sobre a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao frio (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No quarto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, memantina (MMT, 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg, v.o.) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, v.o.). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*)  $P < 0,001$ . Significância estatística em relação ao grupo constrito salina: (#)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via para o painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 17. Efeito do tratamento com MK-801 sobre a hiperalgesia ao frio em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao frio (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No quarto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, MK-801 (50  $\mu$ L - 2,5; 5,0 e 10 nM, orofacial) ou veículo (VEÍC, 50  $\mu$ L, orofacial). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 10) do tempo de *grooming* facial durante dois minutos após aplicações do spray (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*) P < 0,001. Significância estatística em relação ao grupo constrito salina: (#) P < 0,001. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via para o painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.

#### 4.2.2. TESTE DE HIPERALGESIA AO CALOR

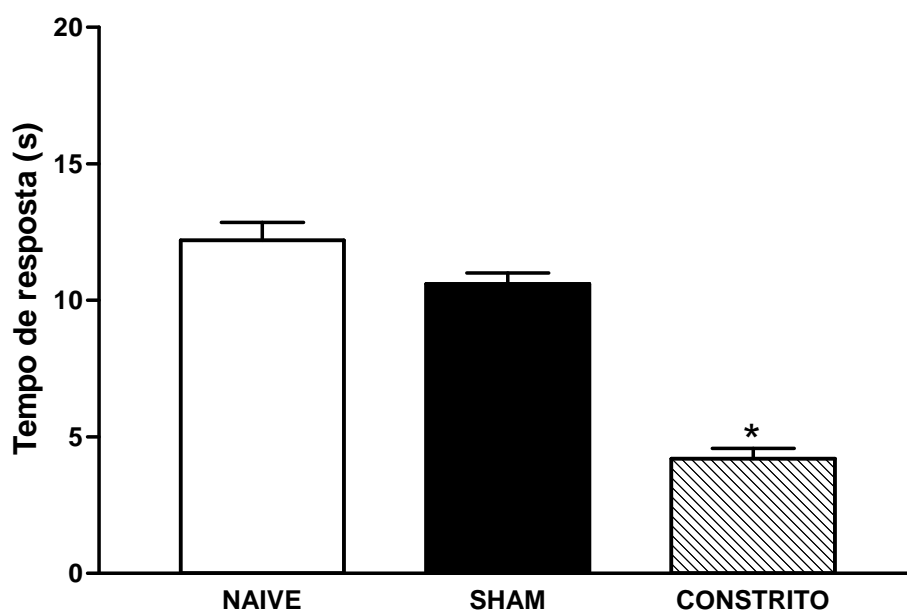
Este teste permitiu avaliar a indução do estado de hiperalgesia ao calor no sexto dia após a cirurgia de constrição do nervo infra-orbital. Observou-se que os animais submetidos à CCNI apresentaram tempo de resposta significativamente menor ao estímulo nociceptivo ( $4,2 \pm 0,4$  segundos) do que animais falso operados (*sham*,  $10,6 \pm 0,4$  segundos) ou *naive* ( $12,2 \pm 0,7$  segundos) (figura 18).

Após ter sido confirmado que a cirurgia de constrição do nervo produz sensibilização dos animais ao calor, avaliou-se o efeito da lamotrigina sobre a sensibilização ao estímulo nociceptivo induzido pelo calor. A lamotrigina, na dose de 30 mg/kg (i.p.), reverteu a hiperalgesia causada pela lesão do nervo infra-orbital, aumentando em 78,4% o tempo de reação (figura 19A). Este efeito perdurou por pelo menos 6 horas após o tratamento dos animais com lamotrigina. A análise da área sob a curva também mostrou um aumento significativo após tratamento com lamotrigina em relação ao controle (figura 19B).

Uma vez que a memantina promoveu redução da hipersensibilidade ao frio, selecionou-se a dose desta droga que promoveu melhor efeito sobre a hiperalgesia ao frio e analisou-se o efeito sobre a hiperalgesia ao calor. A figura 20A mostra que a memantina atuou de maneira análoga ao teste de frio, revertendo a hipersensibilidade ao estímulo, de modo que os animais tratados tiveram o limiar de resposta aumentado em 74,7%, diferindo significativamente do grupo constricto tratado apenas com veículo. Tal ação permaneceu por todo o período de teste. A análise da área sob a curva também mostrou um aumento significativo após tratamento com memantina em relação ao controle (figura 20B).

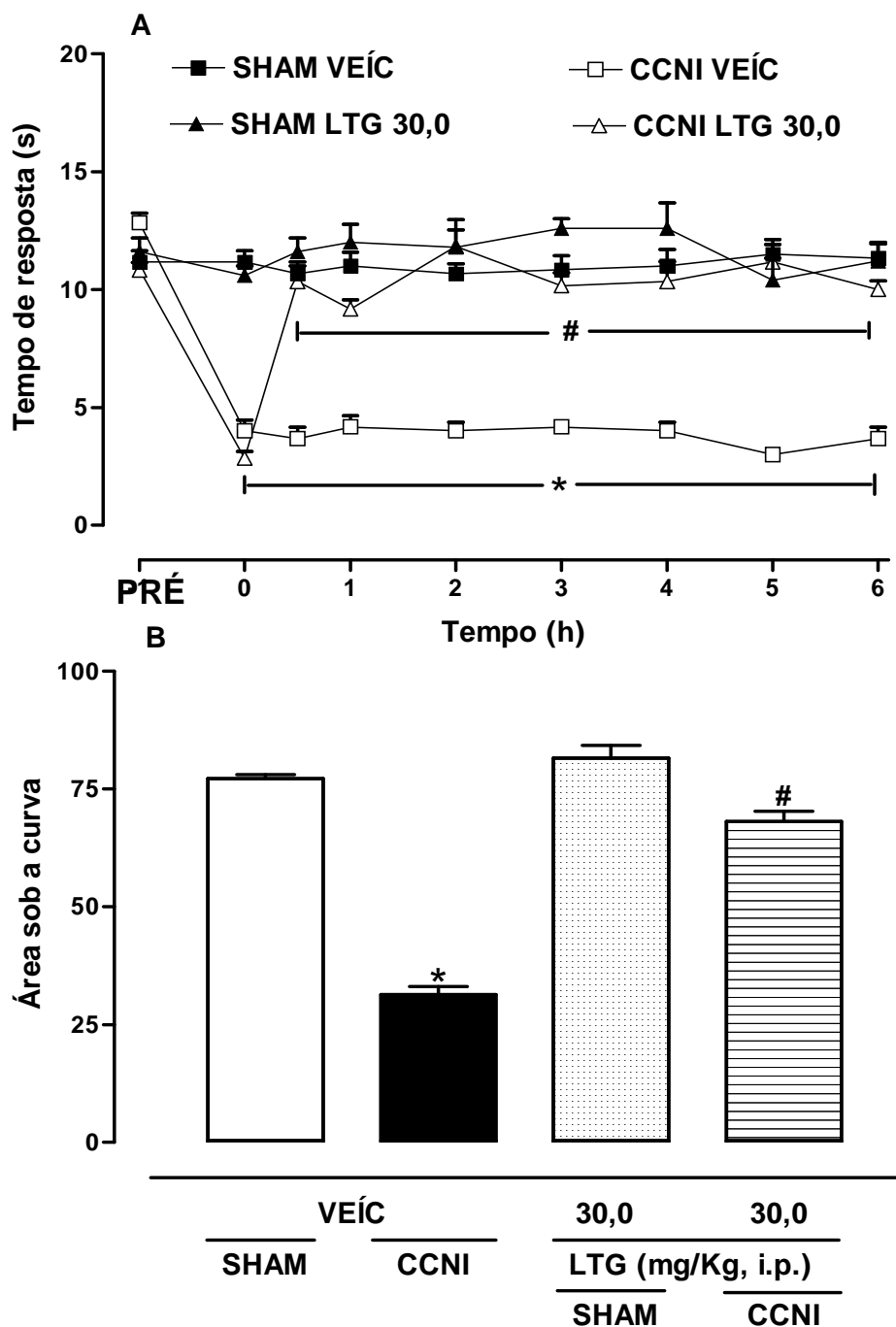
Por fim, seguindo o mesmo protocolo do teste de hiperalgesia ao frio, foi testado o antagonista de receptores NMDA MK-801. Aplicada localmente, na concentração de 5,0 nM, esta droga foi capaz de promover redução significativa da hipersensibilidade ao calor, causando um aumento em 47,7% do tempo de reação. De modo semelhante a esse efeito no modelo de hiperalgesia ao frio, a redução foi menos intensa e também menos duradoura, significativa até a quarta hora do teste (figura 21A). A análise da área sob a

curva também mostrou um aumento significativo após tratamento com MK-801 em relação ao controle (figura 21B).

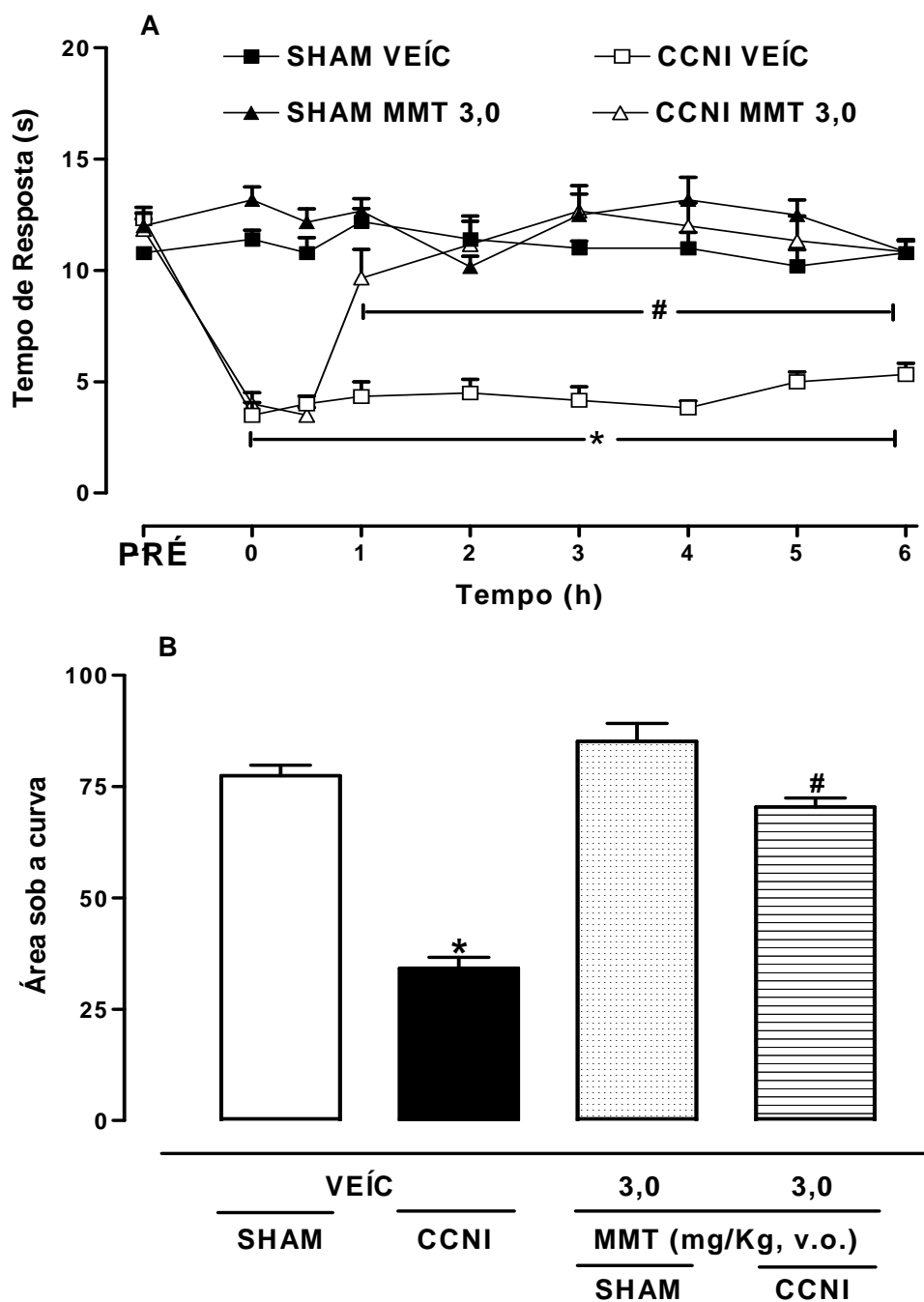


**Figura 18. Efeito da constrição do nervo infra-orbital sobre a sensibilidade ao estímulo de calor.** Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo infra-orbital (constrito) ou falsa cirurgia (sham) ou permaneceram sem intervenções (*naive*). No sexto dia após a cirurgia o estímulo térmico foi aplicado três vezes a cada 30 minutos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ) do tempo de resposta após exposição à fonte de calor. Significância estatística em relação ao grupo sham e ao grupo *naive* (\*)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida por teste *post-hoc* de Tukey.

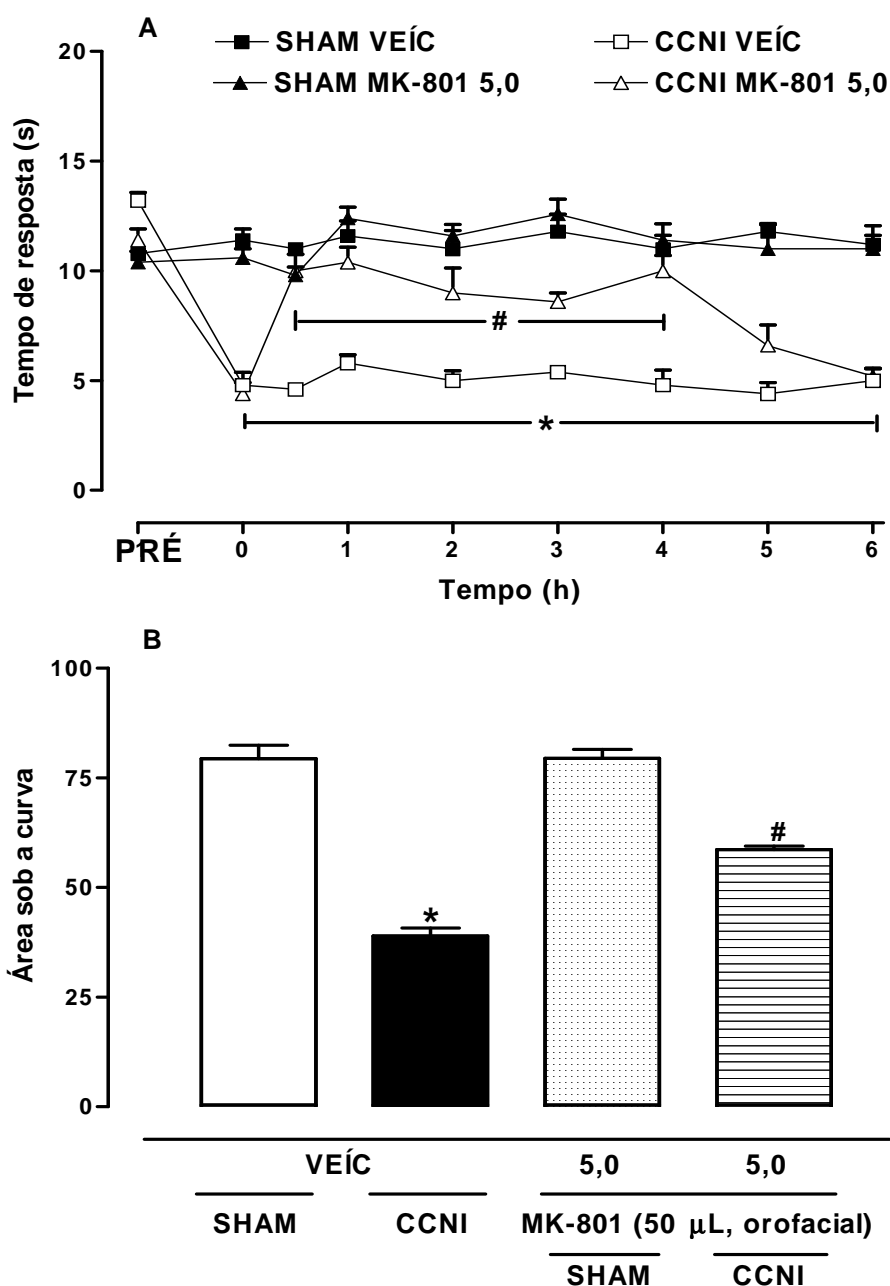




**Figura 19. Efeito do tratamento com lamotrigina sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao calor (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No sexto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, lamotrigina (LTG, 30 mg/kg, i.p.) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, i.p.). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ) do tempo de resposta após exposição à fonte de calor (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*)  $P < 0,001$ . Significância estatística em relação ao grupo constricto salina: (#)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.



**Figura 20. Efeito do tratamento com memantina sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao calor (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No sexto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, memantina (MMT, 3 mg/kg, via oral) ou veículo (VEÍC, 1 mL/Kg, via oral). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ) do tempo de resposta após exposição à fonte de calor (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*)  $P < 0,001$ . Significância estatística em relação ao grupo constrito salina: (#)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.

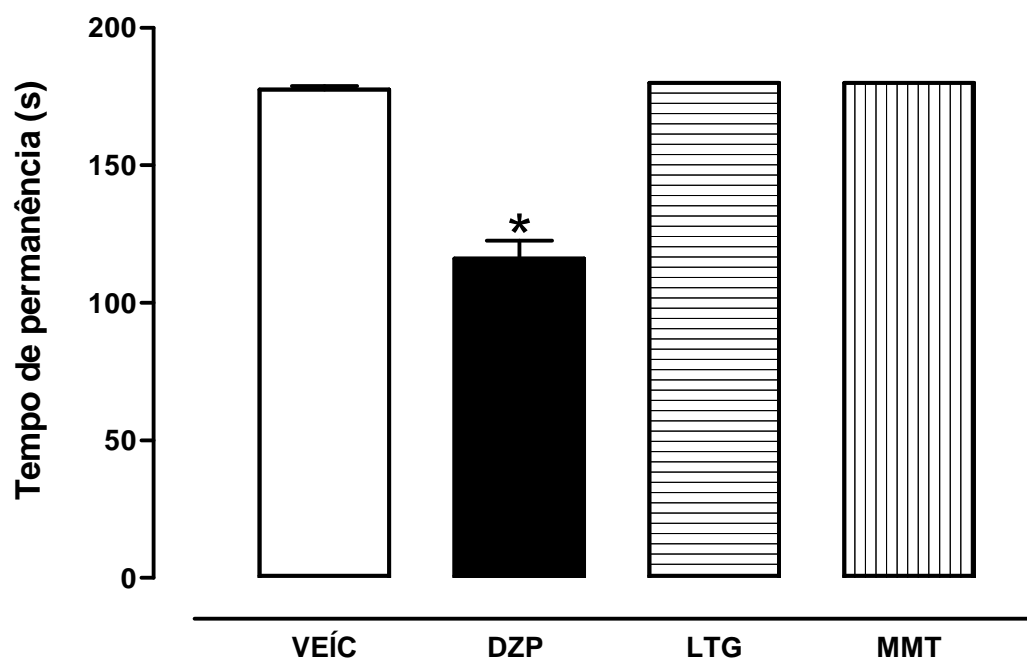


**Figura 21. Efeito do tratamento com MK-801 sobre a hiperalgesia ao calor em animais submetidos à CCNI.** Os animais foram avaliados quanto à sua sensibilidade ao calor (PRÉ) e em seguida submetidos à CCNI ou à falsa cirurgia (SHAM). No sexto dia após a cirurgia, os animais foram novamente avaliados quanto à sensibilidade ao frio (tempo 0) e receberam, imediatamente após esta medida, MK-801 (50 µL, 5,0 nM, orofacial) ou veículo (VEÍC, 50 µL, orofacial). O estímulo térmico foi aplicado novamente 30 min e a cada 60 min durante 6 h após os tratamentos. Os dados representam a média ± EPM (n = 6) do tempo de resposta após exposição à fonte de calor (painel A) ou da área sob a curva de cada grupo (painel B). Significância estatística em relação ao grupo sham salina (\*) P < 0,001. Significância estatística em relação ao grupo constricto salina: (#) P < 0,001. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias no painel A e ANOVA de uma via no painel B, ambas seguidas por teste *post-hoc* de Tukey.

### 4.3. TESTE DE COORDENAÇÃO MOTORA

Este teste permitiu avaliar a influência da lamotrigina e da memantina sobre a resposta motora dos animais. Uma vez que se tratam de fármacos que podem produzir efeitos depressores sobre o Sistema Nervoso Central e que trabalhou-se com testes comportamentais de resposta à dor que envolvem coordenação motora dos animais, a sedação poderia levar a interpretações equivocadas das respostas.

Os dados registrados demonstram que o desempenho motor dos animais não foi alterado pela administração da lamotrigina na dose de 30,0 mg/Kg (i.p.) e tampouco pela memantina na dose de 3,0 mg/Kg (v.o.), uma vez que o tempo de permanência dos animais tratados foi igual ao dos animais tratados com veículo (figura 22). Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com diazepam 5,0 mg/Kg (s.c.). Os animais deste último grupo apresentaram um tempo de permanência significativamente menor em relação a todos os outros grupos.



**Figura 22. Efeito do tratamento com lamotrigina, memantina e diazepam sobre o desempenho motor dos animais.** Os animais receberam lamotrigina (30,0 mg/Kg, i.p. 30 minutos antes), memantina (3,0 mg/Kg, v.o., 1 hora antes), diazepam (5,0 mg/Kg, s.c. 15 minutos antes) ou os respectivos veículos (1,0 mL/Kg, v.o. ou i.p. 30 minutos ou 1 hora antes do teste) e foi registrado o tempo de permanência sobre o eixo giratório durante três minutos. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 6) do tempo de permanência em segundos durante três minutos. Significância estatística em relação ao grupo diazepam (\*)  $P < 0,001$ . Análise estatística realizada por ANOVA de uma via seguida por teste *post-hoc* de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. NOCICEPÇÃO E HIPERALGESIA PERIFÉRICAS INDUZIDAS POR GLUTAMATO

Existe amplo corpo de evidência de que os aminoácidos excitatórios são responsáveis pela transmissão da informação sensorial originada na periferia para o sistema nervoso central. A aplicação iontoforética de N-metil-D-aspartato (agonista do receptor NMDA de glutamato) na coluna dorsal induz respostas aumentadas à estimulação mecânica nociva e inócua (SHER, 1990; AANONSEN, 1990; DOUGHERTY, 1991; CUMBERBATCH, 1994). Além disso, dados comportamentais também sugerem um papel importante para receptores NMDA no processamento nociceptivo: a administração intratecal de NMDA elicit comportamento nociceptivo espontâneo (AANONSEN, 1987, 1989; SUN, 1991; RAIGORODSKY, 1987, 1990), bem como hiperalgesia térmica e mecânica (KOLHEKAR, 1993, 1994; ADVOKAT, 1994; MALMBERG & YAKSH, 1993; BJÖRKMAN, 1994). Em contraste, sabe-se relativamente pouco sobre o papel do glutamato e seus receptores nas terminações sensoriais periféricas e menos ainda, nas terminações trigeminais. Para investigar tal questão, foi testado o efeito da aplicação local de glutamato na região orofacial de ratos.

A injeção de glutamato nas concentrações de 10,0 e 30,0 mM promoveu um aumento significativo do tempo que os animais despenderam executando *grooming* facial em relação aos animais que receberam salina nos primeiros 15 minutos após a aplicação. Neste sentido, e com relação ao sistema sensorial trigeminal de ratos, FIORENTINO *et al.* (1999) mostraram que a injeção de glutamato 250,0 mM na região temporo-mandibular também causou nocicepção. Estes dados sugerem que receptores glutamatérgicos estão presentes nas regiões avaliadas e que o glutamato é capaz de ativá-los e causar nocicepção *per se*.

Esses dados também estão de acordo com outros estudos que avaliam a participação de glutamato liberado periféricamente em outras regiões. BEIRITH *et al.* (2002) demonstraram que a injeção de glutamato na região intraplantar também causou comportamento nociceptivo e, além disso,

formação de edema em camundongos de forma dose-dependente. A resposta máxima foi obtida com uma concentração de 6,0 M e foi evidente nos primeiros 15 minutos, decresceu entre 15 e 30 minutos e foi quase ausente após 30 minutos. Nessa concentração, também houve aumento significativo do volume da pata 40 minutos após a injeção. Em adição, CARLTON *et al.* (1995) demonstraram que receptores AMPA e NMDA estão presentes na pata traseira de ratos, fornecendo uma base anatômica que justifica a ação periférica do glutamato exógeno. Outra evidência morfológica foi fornecida utilizando a expressão de c-fos como parâmetro. WANG *et al.* (1997) observaram aumento dependente da dose da expressão da proteína c-fos após injeção intraplantar do agonista NMDA (50, 100 e 250 mM) nas lâminas superficiais do corno dorsal ipsilateral à injeção. Além disso, a co-injeção de MK-801 (antagonista de receptores NMDA) com formalina na pata suprimiu o aumento da expressão de c-fos no corno dorsal, sugerindo que receptores NMDA estão presentes nas terminações periféricas dos neurônios do gânglio da raiz dorsal que inervam a pata e que eles estão envolvidos na ativação dos nociceptores. Em todos estes estudos, as doses de glutamato necessárias para ativar uma resposta nociceptiva foram bastante superiores às utilizadas neste trabalho, o que sugere que o nervo trigeminal é particularmente sensível ao glutamato e este fato poderia representar uma importante estratégia terapêutica para a nocicepção nesta região.

Em contraste com a nocicepção causada por glutamato, a sensibilização aos estímulos nocivos induzida pelo mesmo parece exigir doses menores para sua instalação. LAWAND *et al.* (1997) examinaram o efeito da administração periférica de glutamato, aspartato e arginina e combinações dos mesmos na articulação do joelho em ratos. Individualmente, nenhum deles, em qualquer uma das concentrações utilizadas (0,001; 0,1 e 1,0 mM) produziu comportamento nociceptivo espontâneo ou mesmo hiperalgesia ao calor ou alodinia mecânica. Entretanto, quando certas combinações de aminoácidos (glu/asp, asp/arg e asp/glu/arg) foram injetadas, houve um decréscimo significativo na latência de retração da pata ao estímulo de calor e no limiar de retração em resposta à estimulação mecânica inócua repetitiva. Mais importante, o tratamento dos animais com antagonistas de receptores NMDA (AP-7) e não NMDA (CNQX) promoveu a redução da latência de retirada da

pata em resposta ao calor ou ao estímulo mecânico por duas horas. Após esse período, os animais voltaram a manifestar hiperalgesia. Este estudo indica que receptores NMDA e AMPA estão ligados à sensibilização induzida pelos aminoácidos excitatórios nesta região. A ausência de comportamento nociceptivo espontâneo pode estar relacionada à dose, pois, conforme discutido anteriormente, para que haja ativação direta dos nociceptores, parece ser necessária uma alta dose dos mesmos.

De maneira similar, JACKSON *et al.* (1995) observaram uma sensibilização ao estímulo de calor após a injeção intraplantar de glutamato na dose de 30 nmol/pata (0,6 mM) em ratos. Além disso, a injeção local de antagonistas de receptores NMDA e AMPA/cainato reverteu a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina. Ainda, CARLTON *et al.* (1998) observaram, após a injeção de glutamato 5,0 mM na cauda de ratos, a instalação de hiperalgesia térmica, reduzindo o limiar de retirada da cauda em resposta à imersão em água a 44 °C, que durou 30 minutos. Mais ainda, este grupo demonstrou que receptores NMDA e AMPA estão presentes nas fibras não mielinizadas na junção dermo-epidérmica do tecido da cauda após marcação com anticorpos direcionados contra a subunidade NR1 do receptor NMDA e GluR1 do receptor AMPA. Uma vez que esta resposta foi atenuada pelos antagonistas MK-801 e CNQX, específicos para receptores NMDA e AMPA, respectivamente, a hiperalgesia e alodinia advindas das injeções de glutamato foram mediadas por tais receptores. Em conjunto, esses resultados apontam para um alvo periférico ativado pelos aminoácidos excitatórios que facilita a resposta comportamental hiperalgésica à estimulação térmica. O número total de movimentos espontâneos de dor da cauda não foi significativamente diferente do controle sugerindo que a injeção de glutamato não resultou em nocicepção, mas apenas em sensibilização aos estímulos.

Em uma preparação cutânea da pata de ratos *in vitro*, DU *et al.* (2001) demonstraram a presença de fibras C e A $\delta$ . Ao perfundirem os campos receptores das fibras A e C sensíveis ao calor e a estímulos mecânicos por dois minutos com glutamato 300 mM, houve uma sensibilização em 90% das fibras A e 92% das fibras C à estimulação por calor nocivo, evidenciada por decréscimo significativo no limiar de ativação térmico e aumento na taxa de disparos neuroniais. Não houve sensibilização à estimulação mecânica neste



caso. Curiosamente, os estudos mencionados anteriormente não fizeram referência à sensibilização induzida por glutamato a estímulos de frio.

No presente trabalho, observou-se que, na região orofacial, o papel do glutamato na sensibilização a estímulos de natureza térmica após a injeção do mesmo, foi bastante evidente a instalação de uma reação exacerbada ao estímulo de frio por pelo menos seis horas após a aplicação, manifestada através do aumento do tempo de *grooming* facial dos animais em relação aos que receberam apenas salina. Em contrapartida, e em contraste com as evidências até agora apresentadas, houve apenas uma leve tendência à sensibilização ao estímulo de calor após injeção de glutamato nas duas primeiras horas, porém a pequena diminuição do tempo de reação ao estímulo não foi suficiente para atingir relevância estatística. É possível que em doses maiores de glutamato, a hiperalgesia ao calor atinja níveis significativos.

A partir dos dados apresentados, sugeriu-se que o glutamato na periferia pode, então, além de ativar os nociceptores e induzir nocicepção *per se*, atuar como um agente sensibilizante ou, ainda, efetuar as duas funções, dependendo da região na qual foi injetado. Contudo, na região orofacial e nas doses testadas, o glutamato ativa os nociceptores e induz a instalação de um quadro de hiperalgesia específica para estímulos térmicos de frio, o que sugere uma possível conexão entre os receptores glutamatérgicos e os canais TRP, responsáveis pela transdução de estímulos de natureza térmica. Mais especificamente, entre os receptores NMDA e o TRPA1 (responsável pela transdução de frio nocivo). Entretanto, até o momento, a literatura não fornece dados que suportem a hipótese de que canais TRP sensíveis ao frio estejam sujeitos a uma modulação glutamatérgica, apenas o estudo de TANIGUCHI *et al.* (2004) relatou que o AP-5, um antagonista de receptores NMDA, suprimiu a fosforilação da tirosina em núcleos hipotalâmicos após exposição ao frio em ratos.

Uma vez determinado o papel do glutamato na região orofacial, foram iniciados os testes com drogas para verificar como as mesmas poderiam atuar sobre a nocicepção e sensibilização induzidas por glutamato.

A lamotrigina é um novo anticonvulsivante, com estrutura química diferente das drogas antiepilépticas convencionais, e tem se mostrado efetiva clinicamente para o tratamento da dor orofacial (CANAVERO *et al.*, 1995;

DEVULDER & DELAAT, 2000). CHEUNG et al. (1992) descreveram o mecanismo de ação da lamotrigina através de estudos eletrofisiológicos e de ligação específica (*binding*), relatando que este anticonvulsivante tem a propriedade de bloquear, de forma dependente da dose, da voltagem e da ativação de canais de sódio, os disparos repetitivos mantidos após a emissão de impulsos despolarizantes. Além disso, este estudo indicou que a lamotrigina exerce um efeito direto sobre canais de sódio dependentes da voltagem no sistema nervoso central de mamíferos.

É sabido que a despolarização dos neurônios, inclusive os nociceptores, é primariamente dependente do influxo de sódio. Além disso, devido à hipótese de que a lamotrigina possa exercer um efeito inibitório indireto sobre a liberação de aminoácidos excitatórios e, desta forma, promover analgesia, o presente estudo avaliou o efeito desta droga na dor orofacial em ratos.

Vários estudos em modelos de dor envolvendo a lamotrigina têm demonstrado analgesia. BLACKBURN-MUNRO et al. (2001) relataram inibição de disparos neuroniais persistentes evocada por óleo de mostarda após aplicação iontoforética de lamotrigina. Este grupo também pesquisou a relação do efeito da lamotrigina com o sistema opioidérgico, e perceberam que as ações do anticonvulsivante em questão independem dos receptores opióides para mediar seu efeito antinociceptivo. Mais recentemente (BLACKBURN-MUNRO et al., 2002; CHICHORRO, 2002) foi observada analgesia na fase inflamatória do teste de formalina após tratamento com lamotrigina (15 e 30 mg/Kg, i.p.), mas não na fase neurogênica. NAKAMURA-CRAIG et al. (1995) descreveram um efeito analgésico para a lamotrigina em um modelo de dor inflamatória. Após tratamento por via oral, antes ou após a injeção de PGE<sub>2</sub>, a hiperalgesia foi suprimida, havendo maior eficácia quando a droga foi injetada antes do mediador inflamatório. Além disso, o efeito parece ser predominantemente central, através da inibição da sensibilização, uma vez que a injeção intraplantar de lamotrigina não reverteu a hiperalgesia instalada. LEE et al. (2002) também observaram reversão da hiperalgesia térmica e mecânica induzida por uma mistura de carragenina e caolin na articulação do joelho em ratos após administração intratecal de lamotrigina por três horas. O tratamento, mais uma vez, foi mais eficaz quando realizado antes do estímulo inflamatório: quatro horas após indução da inflamação, a lamotrigina promoveu apenas

alívio da alodinia mecânica, e não da hiperalgesia térmica. Contudo, BLACKBURN-MUNRO *et al.* (2002) conduziram um teste de retração da pata sob estímulo de calor em que a lamotrigina não apresentou efeito sobre o tempo que os animais levavam para retirar a pata. HUNTER *et al.* (1997) também não observaram mudanças no teste de retirada da cauda após estímulo de calor. O fato de a lamotrigina distinguir entre ativação fásica e tônica dos nociceptores pode ser atribuído ao bloqueio dependente da ativação dos canais de sódio ou propriedades de ligação seletivas aos mesmos. Ou ainda, o efeito irrisório da lamotrigina em testes de dor nociceptiva sugere uma interação seletiva com vias associadas com eventos patofisiológicos e não com a função nociceptiva sensorial normal.

Em nosso estudo, a lamotrigina foi eficaz tanto sobre a nocicepção quanto na sensibilização induzidas pelo glutamato de forma dependente da dose, em uma faixa de tratamento que não causou prejuízo sobre o desempenho motor dos animais. A administração de lamotrigina 10,0 e 30,0 mg/Kg (i.p.) produziu dados semelhantes aos do grupo que recebeu apenas salina, isto é, promoveu abolição da nocicepção mediada pelo glutamato. Da mesma forma, foi observado um efeito antinociceptivo substancial e duradouro (6 horas) no teste de sensibilização ao frio, reduzindo o tempo de *grooming* facial do grupo de animais que recebeu glutamato a valores similares ao grupo controle e aos registros obtidos antes da indução da sensibilização (medida basal). Logo, este resultado demonstra o envolvimento crucial dos canais de sódio na mediação da nocicepção orofacial e da sensibilização ao frio induzidas pelo glutamato.

Estes estudos deixam claro que a lamotrigina possui efeitos analgésicos, embora tais efeitos não sejam possíveis de serem demonstrados em todos os modelos animais. Alguns autores sugerem que esses efeitos podem estar associados, ao menos em parte, à inibição da liberação de glutamato (LEACH *et al.*, 1986; CHEUNG *et al.*, 1992), o que forneceria uma base para a maior eficácia em modelos de dor crônica ou que envolvem alguma alteração acentuada nas vias ascendentes de transmissão da dor, assunto que será discutido mais adiante.

Sendo assim, a etapa seguinte focalizou na idéia de confirmar a participação do glutamato. Para tanto, foi avaliado o efeito sistêmico de um

antagonista de receptores NMDA, a memantina. Conforme mencionado anteriormente, o antagonismo de receptores NMDA pode ter um amplo espectro de ações terapêuticas, inclusive como analgésico. A inibição funcional de receptores NMDA pode ser alcançada através de ações em diferentes sítios de reconhecimento, como: o sítio transmissor primário, o sítio glicina insensível à estricnina, sítio das poliaminas e o sítio da fenciclidina localizado dentro do canal de cátions (PARSONS *et al.*, 1998).

A memantina foi sintetizada pela primeira vez no começo da década de 1960, como um agente antidiabético, no entanto, era ineficaz em reduzir os níveis de glicose do sangue (GERZON *et al.*, 1963). Mais tarde sua atividade no sistema nervoso central foi encontrada e em 1986 iniciaram-se as tentativas clínicas no quadro de demência. Entretanto, o antagonismo de receptores NMDA não tinha sido identificado como o mecanismo de sua ação terapêutica até 1989, o ano em que foi lançada na Alemanha como tratamento para demência (WESEMANN *et al.*, 1983).

A memantina é um antagonista não competitivo de receptores NMDA de afinidade baixa a moderada e, portanto, apresenta menor incidência dos efeitos colaterais no sistema nervoso central associados com outros antagonistas de receptores NMDA. É sugerido que isso ocorra devido à alta dependência da voltagem e rápida cinética de desligamento da memantina, resultando no bloqueio seletivo da ativação patológica, mas não fisiológica, dos receptores NMDA (HEWITT, 2000; SCHMID *et al.*, 1999; GORDON *et al.*, 1999).

No presente estudo, a memantina foi capaz de prevenir a nocicepção causada pelo glutamato na região orofacial de forma dependente da dose, promovendo uma intensa redução no tempo de *grooming* facial. Mais ainda, o tratamento sistêmico com memantina sugere que os receptores NMDA também possuem um papel fundamental na indução da sensibilização, uma vez que houve abolição completa e duradoura (6 horas) da hiperalgesia ao estímulo de frio na maior dose (3,0 mg/Kg, v.o.) sem comprometimento motor dos animais. Também na região orofacial, o efeito sistêmico da memantina foi avaliado no teste de formalina (EISENBERG *et al.*, 1993) e resultou em uma inibição de 52% do tempo de *grooming* facial na primeira fase e de 65-93% na segunda fase.

Posteriormente, EISENBERG *et al.* (1994) demonstraram que a memantina foi profilática sobre o desenvolvimento de hiperalgisia ao calor após aplicação de carragenina na pata de ratos e NEUGEBAUER *et al.* (1993) relataram diminuição da hiperalgisia e alodinia mecânica em modelos de inflamação na articulação do joelho.

Outro estudo que verificou que a administração periférica (local) de antagonistas de receptores NMDA também aliviou a nocicepção induzida por formalina intraplantar (DAVIDSON & CARLTON, 1998), sugerindo um sítio periférico de ação desses antagonistas. Enquanto dextrorfan e quetamina reduziram o comportamento nociceptivo predominantemente na segunda fase, a memantina foi eficaz em ambas, atuando sobre a ativação dos nociceptores e sobre a sensibilização por mediadores inflamatórios. O tratamento periférico indica que o bloqueio de receptores NMDA ocorreu nos axônios não mielinizados da pele. Assim, antagonistas NMDA diminuem a ativação dos nociceptores periféricos induzida pelo glutamato.

É sabido que uma grande porcentagem das fibras aferentes primárias contêm glutamato (BATTAGLIA *et al.*, 1988; CARLTON *et al.*, 1995), que é liberado tanto central como periféricamente após a ativação dessas fibras. A liberação periférica forneceria glutamato endógeno em quantidade crítica que poderia resultar em ativação de receptores NMDA localizados nos axônios sensoriais, que culminaria em liberação de mais glutamato na periferia, que poderia prolongar ou exacerbar essa ativação, criando um círculo vicioso. A adição de antagonistas de receptores NMDA previne a ativação destes receptores periféricos, terminando por diminuir não apenas a transmissão nociceptiva, mas também o desenvolvimento de sensibilização central. Isso fica evidente ao observarmos a redução da nocicepção promovida nas duas fases do teste de formalina, que são desencadeadas, respectivamente, por ativação fásica dos nociceptores e conseqüente sensibilização desenvolvida na forma de resposta inflamatória.

A fim de confirmar e evidenciar melhor esta possível participação de receptores NMDA periféricos do glutamato no sistema trigeminal avaliou-se o efeito da injeção orofacial do antagonista não competitivo de receptores NMDA, o MK-801, que age de maneira dependente da ativação do canal, bloqueando-o apenas no estado aberto. Isto significa que quanto maior a ativação do

receptor, maior será o grau de inibição promovido pelo antagonista. Tal mecanismo de ação implicou no fato de que essas drogas possam ser particularmente úteis quando há ativação excessiva patológica de receptores NMDA, como na epilepsia, isquemia e trauma. Antagonistas não competitivos de receptores NMDA com alta dependência da ativação do canal, como o MK-801, foram considerados, na época de sua descoberta como uma promessa de uma nova classe de agentes terapêuticos contra a patologia mediada por receptores NMDA. Entretanto, experiências clínicas com antagonistas de receptores NMDA seletivos de alta afinidade e grande dependência do uso do canal, como o MK-801, tem sido desencorajadoras por um lado: o surgimento de efeitos colaterais psicotomiméticos, aparentes em doses terapêuticas (LEPPIK *et al.*, 1988; YENARI *et al.*, 1998). Contudo, o uso de métodos eletrofisiológicos mais elaborados indicou que não há igualdade entre diferentes antagonistas não competitivos, uma vez que fatores como a velocidade de bloqueio do receptor (cinética de ligação e desligamento) e a dependência da voltagem podem determinar as características farmacodinâmicas *in vivo*, bem como a janela terapêutica (PARSONS *et al.*, 1993). Paradoxalmente, agentes com baixa, mas não alta afinidade, podem ser eficientes, o que suscitou uma reconsideração do conceito de antagonismo não competitivo de receptores NMDA no desenvolvimento de drogas. Assim, antagonistas como a amantadina e memantina, que preenchem os critérios anteriores, têm sido usados clinicamente há vários anos no tratamento da doença de Parkinson e demência, respectivamente e raramente produzem efeitos colaterais em doses terapêuticas.

A aplicação prévia orofacial de MK-801 nas doses de 5,0 e 10,0 nM inibiu substancialmente a indução de *grooming* facial pelo glutamato em ratos. RO (2003) também observou reversão do comportamento nociceptivo induzido por óleo de mostarda no músculo masséter após administração prévia de MK-801 no mesmo local (0,3 mg/Kg, 50 µL). No teste de sensibilização ao estímulo de frio, foi observada uma reversão parcial, porém significativa pelo MK-801, mas que permaneceu por menos tempo (4 horas) em comparação com os tratamentos sistêmicos (6 horas). Assim, da mesma forma que BEIRITH *et al.* (2002) indicaram a ativação de receptores glutamatérgicos pelo glutamato na região intraplantar e que receptores NMDA e não NMDA são responsáveis por

essa ativação, temos que a região orofacial possui receptores glutamatérgicos que respondem à injeção de glutamato exógeno e que esta região também apresenta receptores NMDA, uma vez que a nocicepção foi revertida pelo antagonista específico aplicado localmente (MK-801).

CHEN *et al.* (1999) constataram que os receptores NMDA periféricos estão envolvidos na indução e na manutenção da ativação persistente dos neurônios do corno dorsal após injeção de um agente álgico (veneno de abelha, via subcutânea) na pata de gatos. Essa ativação foi intensamente inibida pelo AP-5 um antagonista competitivo de receptores NMDA, tanto quando aplicado antes ou após o veneno, mas não pelo CNQX, antagonista de receptores AMPA, que foi eficaz apenas quando administrado antes do veneno. Embora a aplicação tenha sido por via subcutânea, os autores não observaram alterações nos disparo dos neurônios do lado contralateral, sugerindo que o resultado não se tratava de efeito sistêmico. Outro modelo de sensibilização, utilizado por ZANCHET & CURY (2003), que emprega o veneno da aranha armadeira como agente inflamatório, também conta com o envolvimento de receptores NMDA e não NMDA periféricos. Após administração intraplantar do veneno na pata de ratos, uma intensa hiperalgesia no teste de pressão sobre a pata foi percebida. Essa sensibilidade foi revertida por tratamento intraplantar com MK-801 e AP-5. WANG *et al.* (2000) conduziram um estudo eletrofisiológico que demonstrou que a aplicação local de antagonistas de receptores NMDA (AP-5 e MK-801) e não NMDA (DNQX) injetados por via subcutânea na região intraplantar de ratos reduziram as descargas neuronais de fibras C. Além disso, após a sensibilização do local com injeção de carragenina, a inibição das respostas de fibras C foi ainda maior do que no animal normal, sugerindo que receptores NMDA e não NMDA estão envolvidos na mediação da excitação e sensibilização dos nociceptores. Mais tarde, YASHPAL *et al.* (2001) ao testar o MK-801 via intratecal no modelo da formalina, observaram um efeito analgésico na segunda fase do teste, mostrando o envolvimento de receptores NMDA na sensibilização.

LEEM *et al.* (2001) também descreveram sensibilização periférica após injeção local de glutamato na região intraplantar manifestada na forma de hiperalgesia mecânica (3 pmol, 100 µL) significativa por 30 minutos, mas que mostrou tendência de redução do limiar de retirada da pata por até duas horas

em ratos. Em um segundo teste, foi realizada indução de hiperalgesia por aplicação de adjuvante completo de Freund na pata, que sugeriu a participação de receptores periféricos NMDA, mas não AMPA, na indução da hiperalgesia mecânica, devido à reversão leve, mas significativa, causada pela injeção intraplantar de MK-801, mas não de CNQX. Portanto, parece clara a participação de receptores NMDA não só na nocicepção, mas também na indução de hiperalgesia frente a diferentes estímulos na pata.

Deste modo, o bloqueio parcial da sensibilização ao estímulo de frio em nosso modelo fornece mais uma evidência de que não são apenas os receptores NMDA centrais os responsáveis pela indução da sensibilização, conforme foi constatado com a memantina. Embora verificado, através dos resultados obtidos com o MK-801, que o papel destes receptores não é tão fundamental como provavelmente o dos receptores centrais, a inibição produzida foi significativa, sugerindo que, mesmo que a participação dos receptores periféricos não seja primária, não pode ser dada como irrelevante. Em adição nossos dados sugerem ainda uma participação importante do glutamato na nocicepção no sistema trigeminal.

Tem sido demonstrado que condições fisiológicas como isquemia, inflamação, tumores, fraturas e hematomas estão associadas com decréscimo do pH extracelular. Além disso, a redução do pH também foi associada com a dor em voluntários humanos (STEEN *et al.*, 1995) e essa dor cutânea induzida por ácidos parece ser mediada por canais sensíveis a ácidos (JONES *et al.*, 2004; McMAHON & JONES, 2004; UGAWA *et al.*, 2002). No rato, a ativação de fibras C por ácidos também é inibida pela amilorida (YUDIN *et al.*, 2004). Assim, as correntes mediadas por esses canais estão envolvidas na percepção da dor que acompanha a acidose tecidual. Em acordo com essa função, vários subtipos dos canais sensíveis a ácidos são significativamente expressados em nociceptores de pequeno e médio diâmetro (UGAWA *et al.*, 2005; VOILLEY *et al.*, 2001) e também em neurônios de grande diâmetro.

Em certas condições, os baixos valores de pH, atingidos, por exemplo, durante uma reação inflamatória, podem aumentar a sensibilidade dos nociceptores sem diretamente ativá-los. De acordo com esses dados, a inativação do subtipo 3 dos canais sensíveis a ácidos revelou um papel para o mesmo na sensação de dor em camundongos nocaute para esse subtipo do



canal (CHEN *et al.*, 2002; PRICE *et al.*, 2001). Em adição, existem evidências diretas de que esse mesmo canal está claramente envolvido na percepção da acidose no tecido muscular (PRICE *et al.*, 2001) e também na isquemia (SUTHERLAND *et al.*, 2001) e na inflamação (VOILLEY, 2004; YIANGOU *et al.*, 2001; VOILLEY *et al.*, 2001). Desta forma, é possível que os canais sensíveis a ácidos também exerçam um papel importante na nocicepção induzida pelo glutamato na região trigeminal, uma vez que foi injetado ácido glutâmico na região orofacial dos animais.

## 5.2. PAPEL DO GLUTAMATO NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CCNI EM RESPOSTA A ESTÍMULOS TERMICOS.

A percepção dos estímulos nocivos de natureza térmica é realizada através da ativação de membros específicos da família dos canais iônicos TRP dos mamíferos, que respondem a variados limites de temperatura. Os compostos naturais capsaicina e mentol ativam os receptores sensíveis ao calor nocivo TRPV1 e sensíveis ao frio nocivo, o TRPM8, respectivamente. A sensação de queimação da capsaicina e a percepção de refrescância através do mentol demonstra que esses canais iônicos medeiam a termossensação. O limiar de dor provocada pelo calor para os humanos é de aproximadamente 45°C. Em contraste, tanto o limiar como as qualidades da dor induzida pelo frio são mais variáveis. Os limiares para a dor induzida pelo frio variam amplamente entre indivíduos dentro de uma faixa de menos que 0° C a mais de 15° C. Duas subfamílias distintas dos canais TRP estão envolvidas na sensação de frio: TRPM8, ativado a 25° C, enquanto o TRPA1 é ativado a 17° C (BANDELL *et al.*, 2004).

Exposição a um ambiente frio induz dor em pacientes com processos crônicos, e vários destes reclamam que a dor torna-se pior mesmo sob leves decréscimos de temperatura, considerados inócuos. A hiperalgesia ao frio na dor neuropática está atraindo a atenção de vários pesquisadores, que focam seus estudos principalmente na sensibilização central (TAKAHASHI *et al.*, 2003).

THUT *et al.* (2003) sugerem que uma ativação induzida pelo estímulo de frio de um canal catiônico não seletivo resulta em despolarização direta da

membrana neuronal. Esta despolarização envolve um canal de sódio epitelial sensível à amilorida (ENaC) e um membro da superfamília de canais iônicos TRP, o receptor TRPM8. Este é um candidato muito provável, uma vez que está presente em uma subpopulação de neurônios sensoriais e pode ser ativado tanto por diminuição da temperatura como pelo composto refrescante mentol em sistemas de expressão heteróloga.

Com relação à hiperalgesia induzida por calor em animais com neuropatia por ligação de L5, FUKUOKA *et al.* (2002) observaram aumento da expressão do TRPV1 no gânglio da raiz dorsal, sugerindo que este receptor pode estar envolvido na mediação da hiperalgesia ao calor. Posteriormente, foi investigada, por GAUDET *et al.* (2004), a expressão do TRPV2 (um homólogo do TRPV1, ativado a 53°C) após axotomia periférica. Embora a lesão não ter alterado a imunorreatividade ao TRPV2 no gânglio da raiz dorsal, tronco cerebral ou na coluna dorsal, o TRPV2 apresentou-se aumentado em neurônios pós-ganglionares simpáticos após a lesão, sugerindo que o TRPV2 pode ter um papel na dor neuropática mantida pelo simpático. Assim, mudanças na expressão dos canais TRP ligados à sensação de calor localizados no sistema nervoso central podem ser responsáveis pela hipersensibilidade ao calor.

Estudos realizados em camundongos nocaute para o receptor TRPV1 mostraram que este canal é exigido para que ocorra sensibilização inflamatória a estímulos nocivos térmicos (CATERINA *et al.*, 2000; DAVIS *et al.*, 2000) e, inclusive, apresenta expressão aumentada durante condições inflamatórias (AMAYA *et al.*, 2003; TOHDA *et al.*, 2001). Em modelos animais de neuropatia experimental diabética ou por lesão de nervo, o TRPV1 aparece em neurônios que não o expressam normalmente (HUDSON *et al.*, 2001; RASHID *et al.*, 2003). Mais recentemente, ASAI *et al.* (2005) demonstraram que o TRPV1 também é importante na hiperalgesia em um modelo de dor induzido pela inoculação de células tumorais em ratos. AMAYA *et al.* (2003) observaram que uma das espécies celulares que apresentaram aumento da expressão de TRPV1 após indução de inflamação eram fibras A $\delta$  mielinizadas. A plasticidade estrutural das mesmas parece ser um importante mecanismo que causa hiperalgesia após inflamação, pois, em diferentes modelos de neuropatia, a imunorreatividade para receptores TRPV1 estava aumentada no gânglio da raiz

dorsal de neurônios não lesados (HUDSON et al., 2001), particularmente em fibras A, assim, as fibras não lesadas remanescentes podem estar envolvidas na sensibilização.

Em conjunto, esses dados indicam um papel importante para a expressão alterada do TRPV1 (e possivelmente de TRPV2) no desenvolvimento dos estados de dor inflamatória, de origem tumoral e neuropática. Sugerem ainda a participação de fibras A nesta patologia.

Embora o modelo de constrição do nervo infra-orbital utilizado para induzir neuropatia em nosso estudo seja uma adaptação do modelo original desenvolvido por VOS *et al.* (1994), foi possível desenvolver um estado de dor neuropática em ratos através da constrição do nervo infra-orbital de modo consideravelmente menos invasivo do que o original, que envolve a retirada do globo ocular do animal.

Com o intuito de estudar os mecanismos da hiperalgesia ao frio e calor em condições de lesão de nervo e validação do modelo utilizado, foi observado que animais selvagens (*naive*) ou falso-operados (*sham*) exibiram um tempo médio (basal) uniforme de *grooming* facial ou de comportamento nociceptivo em resposta ao frio e ao calor, respectivamente. No entanto, quatro dias após a cirurgia de constrição do nervo infra-orbital, houve hipersensibilidade ao frio, demonstrada pelo aumento significativo do tempo de *grooming* facial dos animais após estímulo de frio e seis dias após a cirurgia houve um aumento da hipersensibilidade ao calor. Não existem dados na literatura com relação ao sistema trigeminal que possam indicar a participação de canais TRP ou de outros canais neste fenômeno, mas é bastante provável que os mesmos canais discutidos anteriormente estejam envolvidos, sabendo-se que grande parte das modificações descobertas a respeito da expressão dos receptores TRPV1 e TRPV2 ocorrem na medula e no gânglio. Porém, os mecanismos envolvidos na sensibilização do TRPV1 ainda são obscuros. MORENILLA-PALAO *et al.* (2004) mostraram que pode haver modulação da translocação do TRPV1 para a superfície neuronal pela PKC ativada por ésteres de forbol ou ativação de mGluR5, implicando que essa excitose possa contribuir para a instalação e manutenção da hiperalgesia inflamatória térmica nas terminações nervosas periféricas. O fato das terminações periféricas que apresentam o TRPV1 utilizarem o glutamato como neurotransmissor e fazer sinapse com neurônios

que expressam receptores AMPA, NMDA e NK-1 (HWANG *et al.*, 2004) também suportam a hipótese da modulação.

Já foi demonstrado que a hiperalgesia ao frio envolve receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA e AMPA) localizados em axônios e terminações distais de nociceptores periféricos (CARLTON, 1995). Este impulso nociceptivo mantido resulta em uma neuroplasticidade central em que os neurônios espinhais nociceptivos mostram excitabilidade aumentada, o que se reflete em respostas comportamentais aos estímulos nocivos também exacerbadas (MELZACK, 2001).

Estabelecida a hiperalgesia induzida pelo modelo, foram iniciados os experimentos envolvendo tratamentos farmacológicos, começando pela avaliação do efeito do anticonvulsivante lamotrigina. A lamotrigina nas doses de 10,0 e 30,0 mg/Kg (i.p.) mostrou-se bastante eficiente ao reverter a hiperalgesia ao frio causada pela constrição do nervo para o nível basal durante as seis horas de experimento, sendo capaz de, inclusive, em alguns momentos, abolir por completo a resposta de *grooming* facial dos animais tratados. HUNTER *et al.* (1997) obtiveram resultados similares com a lamotrigina no modelo de imersão da pata em água gelada (0° C) após constrição dos nervos L5 e L6. Além disso, no presente estudo, a lamotrigina, na maior dose também foi igualmente eficaz em reduzir a hiperalgesia ao calor decorrente da CCNI. Entretanto, um estudo curioso conduzido por CHRISTENSEN *et al.* (2001), utilizando o modelo de constrição do nervo infra-orbital em ratos, verificou que a alodinia mecânica foi refratária ao tratamento com lamotrigina, observando reversão deste quadro apenas com a gabapentina. Assim, a alodinia mecânica trigeminal parece apresentar mecanismos diferentes da hiperalgesia ao frio e ao calor.

Em adição, BLACKBURN-MUNRO *et al.* (2001) observaram, em um estudo eletrofisiológico após indução de neuropatia, redução dos disparos neuroniais após administração iontoforética de lamotrigina. Por outro lado, LYNCH III *et al.* (2004) relataram que não houve reversão da alodinia aos estímulos térmicos por lamotrigina no modelo de neuropatia induzida por vincristina, mas, neste caso, houve atenuação da alodinia mecânica. No entanto, não se pode assumir que os mecanismos envolvidos na hiperalgesia térmica são os mesmo da mecânica. Na verdade, com relação aos efeitos da

lamotrigina na alodinia/hiperalgesia mecânica e tátil os dados parecem contraditórios. Corroborando com esse trabalho, a lamotrigina reduziu a hiperalgesia mecânica no modelo de neuropatia diabética (NAKAMURA-CRAIG *et al.*, 1995). No entanto, HUNTER *et al.*, (1997) demonstraram que no teste de alodinia tátil a lamotrigina não foi efetiva em um modelo de ligação de nervo espinhal. Resultados similares foram observados na região do trigêmio por CHRISTENSEN *et al.* (2001). Assim, comparando os modelos de hiperalgesia mecânica, ERICHSEN *et al.* (2003) verificaram que a lamotrigina inibiu a hiperalgesia no modelo de ligação das ramificações tibial e peroneal do ciático mas não sobre a alodinia e hiperalgesia produzidas por lesão fotoquímica. Estes dados parecem indicar que o efeito da lamotrigina depende não somente do parâmetro analisado (hiperalgesia/alodinia mecânica, tátil, hiperalgesia térmica) mas também do tipo e da região onde a lesão ocorreu. Infelizmente, em nosso modelo de neuropatia trigeminal ainda não foi possível avaliar o efeito deste anticonvulsivante sobre a estimulação mecânica. FOX *et al.* (2003) também destacam que diferenças entre as espécies podem existir. Clinicamente, foi demonstrado que a lamotrigina é eficaz em quadros de dor com origem neural (ZAKRZEWSKA *et al.*, 1997; DEVULDER & DELAAT, 2000) e lesão traumática da coluna (FINNERUP *et al.*, 2002).

A lamotrigina difere de outros anticonvulsivantes, como fenitoína e carbamazepina, por exibir sensibilidade diferente para as várias subunidades  $\alpha$  do canal de sódio (COULTER, 1997) e tem sido sugerido que a lamotrigina possa atuar seletivamente em canais de sódio em neurônios que sintetizam glutamato e aspartato (LEACH *et al.*, 1986). Uma vez que as evidências (CARLTON, 2001; EIDE *et al.*, 1995) apontam para o envolvimento do receptor NMDA na sensibilização dos nociceptores, avaliou-se também a ação da memantina em nosso modelo de dor neuropática trigeminal. Sendo assim, a memantina aboliu completamente a hipersensibilidade ao frio e ao calor promovida pela lesão no nervo infra-orbital durante as 6 h em que foi avaliada. Este resultado parece indicar que há participação do glutamato na instalação do quadro de hiperalgesia térmica ao frio e ao calor induzido pela cirurgia de constrição do nervo infra-orbital. Resultados similares também foram obtidos em outros modelos de neuropatia onde a memantina atenuou a hiperalgesia e alodinia mecânica em animais que sofreram ligação dos nervos espinhais da

quinta e sexta vértebra lombar (CARLTON & HARGETT, 1995), a hiperalgesia térmica após ligação do nervo ciático (EISENBERG *et al.*, 1995), a alodinia mecânica induzida por ligação do sétimo nervo espinhal (CARLTON *et al.*, 1994) e a hiperalgesia aos estímulos mecânicos e térmicos (frio e calor) no modelo de neuropatia induzida por ligação dos nervos L5 e L6 em ratos (SUZUKI *et al.*, 2001). Em adição, a memantina suprimiu a resposta de neurônios espinhais à estimulação térmica tanto em animais normais quanto artríticos (NEUGEBAUER *et al.*, 1993), bem como também promoveu redução da nocicepção e da hiperalgesia em modelos animais de inflamação (EISENBERG *et al.*, 1993; 1994).

Embora tanto receptores NMDA e não NMDA sejam ativados por um potencial de ação originado de uma fibra C, os principais contribuintes para o potencial pós-sináptico excitatório rápido são os receptores não NMDA (JIANG *et al.*, 1990). KING & GARCIA (1993) observaram que receptores não NMDA contribuem substancialmente para a neurotransmissão no corno dorsal e processamento somatossensorial de estímulos cutâneos nocivos e inócuos, enquanto receptores NMDA estão relacionados com respostas mais lentas. Assim, não é surpreendente que a despolarização cumulativa seja reduzida também por antagonismo de receptores NMDA (BARANAUSKAS *et al.*, 1995).

CHAPLAN *et al.* (1997) demonstraram ainda que a memantina é mais eficaz que a quetamina e o dextrometorfan (antagonistas mais antigos dos receptores NMDA). Nesse sentido, a memantina torna-se o candidato ideal para o tratamento da dor crônica, devido ao seu antagonismo não competitivo de relativa baixa afinidade e dependente da voltagem, além de produzir menos efeitos colaterais em comparação aos outros antagonistas de receptores NMDA (KORNHUBER *et al.*, 1997).

Para compreendermos melhor a participação do glutamato e o efeito da memantina na hiperalgesia térmica no modelo de CCNI avaliamos o efeito do antagonista não competitivo de receptores NMDA MK-801. YASHPAL *et al.* (2000) demonstraram que o MK-801 promoveu aumento dos limiares de resposta ao estímulo mecânico e redução da hiperalgesia ao estímulo de frio no modelo de dor crônica induzida por constrição do nervo ciático. Em contraste, ERICHSEN & BLACKBURN-MUNRO (2002) descreveram ausência de reversão sobre a hiperalgesia ao frio e alodinia mecânica no modelo de

constricção do nervo ciático ao administrar MK-801 ou o antagonista de receptores AMPA, o NS 1209. As razões para esta discrepância são desconhecidas.

Outros estudos, como o de MAO *et al.* (1992) observaram que, após a cirurgia de constricção do nervo ciático houve uma redução do limiar de retirada da pata ipsilateral em resposta ao estímulo de calor que foi revertida pela administração de MK-801 e HA966 (outro antagonista de receptores NMDA) antes e após a lesão do nervo, enquanto o antagonista de receptores AMPA (CNQX) foi eficaz apenas quando administrado antes da cirurgia. Isto sugere que a ativação de receptores NMDA e não-NMDA pode ter papéis distintos na indução e manutenção da hiperalgesia térmica ao calor após a cirurgia de constricção do nervo e que os mecanismos envolvidos na dor neuropática estão relacionados com anormalidades centrais mediadas por aminoácidos excitatórios.

Nossos resultados corroboram com os estudos de YASHPAL *et al.* (2000) e MAO *et al.* (1992) e estendem para a região orofacial a participação do glutamato na instalação do quadro hiperalgésico ao frio e ao calor. Em contraste com os tratamentos sistêmicos anteriores com lamotrigina e memantina, a duração de ação do MK-801 foi observada apenas durante as primeiras quatro horas de teste. Além disso, uma vez que o MK-801 foi administrado localmente sugerimos que esteja havendo liberação de glutamato na região orofacial (local). Estes receptores periféricos parecem também contribuir para a instalação da alodinia mecânica na pata após a constricção do nervo ciático (JANG *et al.*, 2004).

O gene *Homer1* foi identificado recentemente e parece ter um papel crítico na expressão da plasticidade sináptica em várias regiões cerebrais (BRAKEMAN *et al.*, 1997). MIYABE *et al.* (2006) investigaram as conseqüências imediatas da lesão de constricção do nervo ciático sobre a expressão deste gene no corno dorsal. Aumento significativo dos níveis do RNA mensageiro para *Homer1* foi encontrado no corno dorsal ipsilateral à lesão 4 h após a cirurgia e foi mantido até 8 h antes de retornar aos valores basais 24 h após a cirurgia. A indução do gene foi dependente de ativação de receptores NMDA e da via das quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2, uma vez que o MK-801 é um inibidor específico das vias das MAP quinases 1 e

2 (U1026) significativamente atenuaram o aumento nos níveis do RNA mensageiro do Homer1 induzido pela lesão em comparação a animais controle. Esses dados fornecem a importante evidência de que uma regulação transitória de genes após lesão de nervo pode ser fundamental na remodelação do fenótipo das fibras sensoriais e contribuir para o aumento duradouro da eficácia sináptica que dá margem ao desenvolvimento da dor neuropática e que os receptores NMDA podem ter um papel importante nesta regulação de genes. Logo, no que refere à hiperalgesia térmica na região trigeminal, verificou-se que tanto a memantina como o MK-801 são efetivos.

### 5.3. MODULAÇÃO DOS RECEPTORES DE CALOR E FRIO E SUA RELAÇÃO COM RECEPTORES NMDA

Análises de co-expressão mostraram que o RNA mensageiro para o receptor TRPA1 é encontrado, em sua maioria, em neurônios que também são positivos para TRPV1. Em contraste, poucos neurônios positivos para TRPV1 contém o RNA mensageiro para o receptor TRPM8 (PEIER *et al.*, 2002; STORY *et al.*, 2003). Uma vez que o TRPA1 marca neurônios que respondem a estímulos de frio e calor, o conhecimento da qualidade sensorial que ativa especificamente o receptor TRPA1 é crucial para a compreensão da codificação de temperaturas nocivas. BANDELL *et al.* (2004) confirmaram que tanto o receptor TRPA1 de camundongos quanto o de humanos em cultura são ativados por temperaturas frias nocivas e por substâncias que excitam predominantemente neurônios do gânglio da raiz dorsal sensíveis ao frio (por exemplo, o cinamaldeído). A injeção de cinamaldeído na pata de camundongos induziu comportamento nociceptivo, como lambadura e chacoalhar da pata que cessa após cinco minutos. Em seguida, foi verificado que os animais apresentavam hiperalgesia a um estímulo de calor 30 minutos após a aplicação de cinamaldeído. Apesar do marcante comportamento nociceptivo agudo em resposta ao cinamaldeído em animais nocaute para o TRPV1, esses não apresentaram hiperalgesia ao estímulo de calor, indicando que a resposta nociceptiva aguda é independente do TRPV1, enquanto a hiperalgesia é mediada pelo último.



A ativação de muitos canais TRP está ligada à sinalização mediada por receptores acoplados à proteína G (CLAPHAM *et al.*, 2003). BANDELL *et al.* (2004) demonstraram que o receptor TRPA1 pode ser ativado pela bradicinina e que a ativação do TRPA1 e do TRPM8 pode ser severamente atenuada por um inibidor específico da fosfolipase C. Uma das conseqüências da ativação dessa enzima é a quebra de bisfosfato de fosfatidilinositol em trifosfato de inositol e diacilglicerol. O primeiro mobiliza as reservas intracelulares de cálcio e o segundo ativa a PKC. Como o cinamaldeído, o mentol e um estímulo de frio não causam liberação de cálcio em células que não possuem os receptores TRPA1 e TRPM8, então não são capazes de ativar diretamente a fosfolipase C.

Um modo importante de ativação do receptor TRPV1 é por fosforilação do canal iônico pela PKC. A habilidade de regular a atividade do TRPV1 sugere conexões com cascatas de resposta a ativação de receptores da superfície celular, como ocorre com o receptor do fator de crescimento neural (TrkA, BONNINGTON *et al.*, 2003), com o receptor B<sub>2</sub> da bradicinina (SUGIURA *et al.*, 2002) e com o receptor do ATP (P2Y<sub>1</sub>; TOMINAGA *et al.*, 2001). Mais ainda, a fosforilação do TRPV1 pela PKC induzida por PMA diminui o limiar de resposta ao calor de 42 °C para cerca de 32 °C (NUMAZAKI *et al.*, 2002). HU *et al.* (2002) demonstraram que a PGE<sub>2</sub> também pode induzir fosforilação do TRPV1 por intermédio da PKA. A fosforilação e defosforilação do TRPV1 modula a atividade do canal. As proteínas quinases A e C atuam sensibilizando-o à estimulação por agonista, bem como diminuindo sua dessensibilização (PREMKUMAR & AHERN, 2000; DE PETROCELLIS *et al.*, 2001).

Por sua vez, a fosforilação de proteínas tem sido considerada um mecanismo principal pelo qual ocorre a modulação da função de receptores de glutamato (RAYMOND *et al.*, 1994; HATT, 1999). A fosforilação de receptores NMDA parece ser regulada por um número de proteínas quinases e fosfatases. A subunidade NR1 é fosforilada pela PKA ou C em resíduos de serina (TINGLEY *et al.*, 1997; HATT, 1999) e, assim, o receptor passa a gerar respostas exacerbadas devido à uma probabilidade aumentada de abertura do canal e redução do bloqueio voltagem dependente exercido pelo íon magnésio em receptores NMDA (CHEN & HUANG, 1992). LIN *et al.* (2002) observaram que, ao induzir a ativação da PKA com forskolina, as respostas das células do

trato espinotalâmico estavam exacerbadas para estímulos nocivos mecânicos, mas não em relação a estímulos inócuos. Seguindo esta linha de estudo, ZOU *et al.* (2002) forneceram evidências morfológicas de que houve aumento no número de células trato espinotalâmico que continham receptores NMDA fosforilados após injeção de capsaicina por via intradérmica. Ainda, esta fosforilação foi prevenida com o uso de um inibidor da PKA. Ou seja, após a indução de uma inflamação periférica aguda, houve ativação de receptores NMDA, mediada, em parte, pela PKA. Experimentos recentes deste grupo (LIN *et al.*, 2002) indicaram que a ativação da PKA por administração de forskolin no corno dorsal aumenta a resposta de células do trato espinotalâmico à estímulos mecânicos nocivos, mas não ao leve esfregar da pele. Em contraste, a administração de ésteres de forbol (indutores da atividade da PKC) no corno dorsal aumentou a resposta dessas células ao leve toque da pele, mas não ao estímulo mecânico nocivo (LIN *et al.*, 1996), o que sugere a interessante possibilidade de que a PKA esteja mais relacionada com a hiperalgesia mecânica, e a PKC, com a alodinia. Finalmente, em uma condição de dor crônica, produzida por ligação do nervo espinhal da quinta vértebra lombar (L5) GAO *et al.* (2005) demonstraram o aumento da fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA no corno dorsal de animais neuropáticos. Assim, a modulação da função do receptor NMDA parece estar envolvida com o desenvolvimento de sensibilização central em situações de estimulação prolongada advindas de estímulo inflamatório ou lesão de nervo.

Logo, é possível que a modulação do funcionamento dos receptores NMDA possa influenciar o desempenho dos canais TRP relacionados à transdução dos estímulos nocivos de frio e calor em quadros de dor neuropática. Mais especificamente, no sistema trigeminal, a indução de neuropatia, uma condição que prevê mudanças drásticas no sistema sensorial, foi observada hiperalgesia térmica aos estímulos de frio e calor que pode ser, em alguns casos, completamente revertida por antagonistas de receptores NMDA, indicando fortemente uma conexão entre esses receptores. Considerando-se que o receptor NMDA permite influxo de cálcio e que, as vias discutidas anteriormente culminam em ativação de quinases ou liberação dos estoques de cálcio intracelular, este pode ser um mecanismo em potencial para essa suposta conversa cruzada.

A relação entre receptores NMDA em um quadro de sensibilização induzida por um agente álgico parece ser mais tênue, de modo que foi observada apenas sensibilização ao estímulo de frio, e não de calor após a injeção de glutamato. Contudo, não se deve excluir a possibilidade da sensibilização ocorrer com doses diferentes de glutamato. Além disso, o fato da aplicação ter sido realizada apenas uma vez pode não ter sido suficiente para induzir uma sensibilização que acusasse relevância estatística. Logo, aplicações múltiplas podem fornecer um resultado diferente. Entretanto, deve-se trazer à mente que a lesão do nervo constitui um quadro bastante distinto, que gera respostas acentuadas no que refere à reorganização que se estabelece após a lesão crônica. O fato da sensibilização ao frio ter exigido uma dose menor de glutamato também pode refletir a expressão de maior quantidade de receptores TRPA1 na região orofacial e/ou uma suscetibilidade naturalmente maior desta região a estímulos de frio. Além disso, não deve ser descartada a possibilidade de que outros mediadores estejam envolvidos na indução de sensibilização, como neurocininas, endotelinas, bradicinina, entre outros.

### 5.3. EFEITO DAS DROGAS SOBRE O DESEMPENHO MOTOR (ROTA-ROD)

A avaliação do desempenho do motor dos animais é fundamental para observação de efeitos sobre o sistema nervoso central. Neste estudo, tem importância chave para que pudesse ser realizada uma análise fiel dos dados registrados nos testes de nocicepção, os quais dependiam da observação de um parâmetro que diretamente relacionado à coordenação motora dos animais (*grooming* facial). Animais cujo desempenho motor estivesse comprometido poderiam levar à conclusão precipitada de que a droga estaria elicitando analgesia, quando, na verdade, estaríamos analisando uma atividade sedativa do agente terapêutico em questão.

A fim de evitar esse interferente, foram testadas várias doses no modelo de hiperalgesia ao frio, cuja dependência da coordenação motora era extrema. A dose que promoveu maior analgesia (30 mg/Kg para a lamotrigina e 3,0 mg/Kg para a memantina) foi testada no rota-rod e não foi observado prejuízo motor algum nos animais.

Um estudo com a lamotrigina relatou que a dose de 100,0 mg/Kg causou prejuízo motor em ratos (HUNTER *et al.*, 1997) e, embora estudos que utilizaram memantina a 10,0 e 20,0 mg/Kg (SUZUKI *et al.*, 2001; CARLTON & HARGETT, 1995) não tenham relatado disfunções motoras, a dose de 10,0 mg/Kg claramente induziu mudanças de comportamento significativas nos animais de nosso estudo. Assim, estabelecemos a dose máxima de 3,0 mg/Kg, que apresentou maior eficácia como analgésica. A diferença pode advir do fato de ter sido utilizada uma linhagem de animais diferente em nosso estudo (ratos Wistar), enquanto ratos Sprague-Dawley foram empregados pelos outros autores.

## 6. CONCLUSÕES

Através de modelos de dor aguda e crônica na região orofacial podemos sugerir que:

- O glutamato é capaz de promover ativação dos nociceptores periféricos na região orofacial, uma vez que a sua injeção causou comportamento nociceptivo.
- A nocicepção induzida pelo glutamato orofacial envolve a ativação de canais de sódio dependentes da voltagem, pois o tratamento sistêmico com o anticonvulsivante lamotrigina, bloqueador de canais de sódio, foi capaz de bloquear essa nocicepção.
- O comportamento nociceptivo induzido pela injeção orofacial de glutamato também depende da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA, pois tal comportamento foi inibido pela administração sistêmica do antagonista memantina. Estes receptores não estão localizados somente no sistema nervoso central mas também periféricamente uma vez que a injeção local de MK-801 reverteu a nocicepção causada por glutamato.
- A aplicação orofacial de glutamato é capaz de induzir, além da nocicepção, sensibilização a estímulos nocivos de frio nessa região. Essa sensibilização também depende da ativação de canais de sódio, pois foi revertida em grande proporção pelo tratamento sistêmico com lamotrigina, e da ativação de receptores NMDA centrais e periféricos, o que é justificado pela ação inibitória sistêmica da memantina e local do MK-801, respectivamente.
- A constrição crônica do nervo infra-orbital produz um quadro de intensa hiperalgesia a estímulos de natureza térmica, constituindo um modelo confiável de estudo de neuropatia trigeminal.
- A hiperalgesia ao frio e ao calor após a constrição do nervo infra-orbital é mediada, em grande parte, por canais de sódio regulados pela voltagem, devido à reversão substancial da hiperalgesia após administração de lamotrigina e por receptores NMDA centrais e

periféricos, que também atuam no desenvolvimento dessa resposta exacerbada, conforme demonstra o bloqueio da hiperalgesia após tratamento sistêmico e local com os antagonistas de receptores NMDA memantina e MK-801, respectivamente.

- A redução da hiperalgesia ao frio e calor pelos antagonistas de receptores NMDA e as possíveis modificações que este canal sofre após constrição do nervo infra-orbital sugerem que possa existir um mecanismo intracelular capaz de modular a atividade dos canais TRP responsáveis pela percepção de frio e calor nocivos no quadro de dor crônica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L. M.; WILCOX, G. L. Nociceptive action of excitatory aminoacids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and  $\sigma$ -agonists. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, p. 9-19, 1987.

AANONSEN, L. M.; WILCOX, G. L. Muscimol,  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors and excitatory aminoacids in the mouse spinal cord. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, p. 1034-1038, 1989.

AANONSEN, L. M.; LEI, S.; WILCOX, G. L. Excitatory aminoacid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, v. 41, p. 309-321, 1990.

ADVOKAT, C.; GHORPADE, A. WOLFE E. Intrathecal excitatory aminoacid (EAA) agonists increase tail flick latencies (TFL) of spinal rats. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 48, p. 693-698, 1994.

AKOPIAN, A. N.; SOUSLOVA, V.; ENGLAND, S.; OKUSE, K.; OGATA, N.; URE, J.; SMITH, A.; KERR, B. J.; MCMAHON, S. B.; BOYCE, S. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 541-548, 1999.

ALBERS, G. W.; SAENZ, R. E.; MOSES, J. A. JR.; CHOI, D. W. Safety and tolerance of oral dextromethorphan in patients at risk for brain ischemia. **Stroke**, v. 22, p. 1075-1077, 1992.

AL-GHOUL, W. M.; LI VOLSI, G.; WEINBERG, R. J.; RUSTIONI, A. Glutamate immunocytochemistry in the dorsal horn after injury or stimulation of the sciatic nerve in rats. **Brain Research Bulletins**, v. 30, p. 453-459, 1998.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.

AMAYA, F.; OH-HASHI, K.; NARUSE, Y.; IJIMA, N.; UEDA, M.; SHIMOSATO, G.; TOMINAGA, M.; TANAKA, Y.; TANAKA, M. Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. **Brain Research**, v. 963, p. 190-196, 2003.

ANDERSON, L. C.; RAO, R. D. Interleukin-6 and nerve growth factor levels in peripheral nerve and brainstem after trigeminal nerve injury in the rat. **Archives of Oral Biology**, v. 46, p. 633-640, 2001.

ANDERSON, L. C.; VAKOULA, A.; VEINOTE, R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 161-169, 2003.

ANDREEVA, L.; RANG, H.P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, p. 185-190, 1993.

ASAI, H.; OZAKI, N.; SHINODA, M.; NAGAMINE, K.; TOHNAI, I.; UEDA, M.; SUGIURA, Y. Heat and mechanical hyperalgesia in mice model of cancer pain. **Pain**, v. 117, p. 19-29, 2005.

AUSTIN, C.E.; FAUSSNER, A.; ROBINSON, H.E.; CHAKRAVARTY, S.; KYLE, D.J.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Stable expression of the human kinin B<sub>1</sub> receptor in chinese hamster ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 11420–11425, 1997.

BACKONJA, M.; ARNDT, G.; GOMBAR, K. A.; CHECK, B.; ZIMMERMAN, M. Response of chronic pain syndromes to ketamine: a preliminary study. **Pain**, v. 56, p. 51-57, 1994.

BANDELL, M.; STORY, G. M.; HWANG, S. W.; VISWANATH, V.; EID, S. R.; PETRUS, M. J.; EARLEY, T. J.; PATAPOUTIAN, A. noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p.849–857, 2004.

BARANAUSKAS, G.; NISTRİ, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 349-365, 1998.

BARANAUSKAS, G.; NISTRİ, A. Effects of RP 67580 on substance P-elicited responses and postsynaptic potentials of motoneurons of the rat isolated spinal cord. **Peptides**, v. 16, p. 357-359, 1995.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 277, p. 302-312, 1988.

BEICHE, F.; SCHEUERER, S.; BRUNE, K.; GEISSLINGER, G.; GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 390, p. 165-169, 1996.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BEISE, R. D.; CARTENS, E. K. Psychophysical study of stinging pain evoked by brief freezing of superficial skin and ensuing short-lasting changes in sensations of cool and cold pain. **Pain**, v. 74, p. 275-286, 1998.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, 87-107, 1988.



BENNET, D. L.; FRENCH, J. S.; PRIESTLEY, J. V.; McMAHON, S. B. NGF but not NT-3 or BDNF prevents the A $\beta$ -fiber sprouting into lamina II of the spinal cord that occurs following axotomy. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 211-220, 1996.

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, p. 111-121, 2001.

BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; TAL, M. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal nerve ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 297, p. 151-154, 2001.

BJÖRKMAN, R.; HALLMAN, K. M.; HEDNER, J. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. **Pain**, v. 57, p. 259-264.

BLACK, J. A.; CUMMINS, T. R.; PLUMPTON, C.; CHEN, Y. H.; HORMUZDIAR, W.; CLARE, J. J.; WAXMAN, S. G. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, p. 2776-2785, 1999.

BLACKBURN-MUNRO, G.; DICKINSON, T.; FLEETWOOD-WALKER, S. M. Non-opioid actions of lamotrigine within the rat dorsal horn after inflammation and neuropathic nerve damage. **Neuroscience Research**, v. 39, p. 385-390, 2001.

BLACKBURN-MUNRO, G.; IBSEN, N.; ERICHSEN, H. K. A comparison of the anti-nociceptive effects of voltage-activated Na<sup>+</sup> channel blockers in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, p. 231-238, 2002.

BOYCE, S.; WYATT, A.; WEBB, J. K.; O'DONNELL, R.; MASON, G.; RIGBY, M.; SIRINATHSINGHI, D.; HILL, R. G.; RUPNIAK, N. M. J. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localization of NR2B subunit in dorsal horn. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 611-623, 1999.

BRAKEMAN, R.; LANAHAN, A. A.; O'BRIEN, R.; ROCHE, K.; BARNES, C. A.; HUGANIR, R. L.; WORLEY, P. F. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. **Nature**, v. 386, p. 284-288, 1997.

BROADLEY, K. E.; KUROWSKA, A.; TOOKAMAN, A. Ketamine injection used orally. **Journal of Palliative Medicine**, v. 10, p. 247-250, 1996.

BUCKNILL, A. T.; COWARD, K.; PLUMPTON, C.; TATE, S.; BOUNTRA, C.; BIRCH, R.; SANDISON, A.; HUGHES, S. P. F.; ANAND, P. Nerve fibers in lumbar spine structures and injured spinal roots express the sensory neuron-specific sodium channels SNS/PN3 and NaN/SNS2. **Spine**, v. 27, p. 135-140, 2002.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferents fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, v. 190, p. 541-562, 1967.

BURGESS, G.M.; MULLANEY, I.; McNEIL, M.; DUNN, P.M., RANG, H.P. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurones in culture. **Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 3314–3325, 1989.

BURTON, A. W.; LEE, D. H.; SAAB, C.; CHUNG, J. M. Preemptive intrathecal ketamine injection produces a long-lasting decrease in neuropathic pain behaviors in a rat model. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 24, p.208-213, 1999.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A., FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1–5, 2000.

CAMERON, A. A.; CLIER, K. D.; DOUGHERTY, P. M.; GARRISON, C. J.; WILLIS, W. D.; CARLTON, S. M. Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy. **The Journal of Comparative Neurology**, v.379, 428-442, 1997.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E.P., CALIXTO, J.B., 1999. In vivo B<sub>1</sub> kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kB pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1851–1859.

CANAVERO, S.; BONICALZI, V.; FERROLI, P; ZEME, S.; MONTALENTI, E.; BENNA P. Lamotrigine control of idiopathic trigeminal neuralgia. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 59, p. 646, 1995.

CARLTON, S. M.; REES, H.; GONDESEN, K.; TSURUOKA, M.; WILLIS, W. D. Behavioral and electrophysiological effects of memantine in a primate model of peripheral neuropathy. **Society for Neuroscience Abstracts**, v. 20, p. 18, 1994.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L. Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. **Neuroscience Letters**, v. 198, p. 115-118, 1995.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neuroscience Letters**, v. 197, p. 25-28, 1995.

CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Research**, v. 790, p. 160-169, 1998.

CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n<sup>o</sup> 1, p. 52-56, 2001.

CATERALL, W. A. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. **Physiological Reviews**, v. 72, suppl. 4, p. S15-S48, 1992.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

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

CERNE, R.; RUSIN, K. I.; RANDIC, M. Enhancement of the N-methyl-D-aspartate response in spinal dorsal horn neurons by cAMP-dependent protein kinase. **Neuroscience Letters**, v. 161, p. 124-128, 1993.

CHAPLAN, S. R.; MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 829-838, 1997.

CHEN, C. C.; ZIMMER, A.; SUN, W. H.; HALL, J.; BROWNSTEIN, M. J. A role for ASIC3 in the modulation of high intensity pain stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 8992-8997, 2002.

CHEN, H. S. V.; PELLEGRINI, J. W.; AGGARWAL, S. K.; LEI, S. Z.; WARACH, S.; JENSEN, F. E.; LIPTON, S. A. Open-channel block of  $\alpha$ -methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 4427-4436, 1992.

CHEN, H. S.; CHEN, J. Secondary heat, but not mechanical, hyperalgesia induced by subcutaneous injection of bee venom in the conscious rat: effect of systemic MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. **European Journal of Pain**, v. 4, p. 389-401, 2000.

CHEN, J.; LI, H. L.; LUO, C.; LI, Z.; ZHENG, J. H. Involvement of peripheral NMDA and non-NMDA receptors in development of persistent firing of spinal wide-dynamic-range neurons induced by subcutaneous bee venom injection in the cat. **Brain Research**, v. 844, p. 98-105, 1999.

CHEN, L.; HUANG, L.Y. Protein kinase C reduces  $Mg^{+2}$  block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. **Nature**, v. 356, p. 521-523, 1992.

CHEUNG, H.; KAMP, D.; HARRIS, E. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. **Epilepsy Research**, v. 13, p. 107-112, 1992.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Society for Experimental Biology and Medicine**. 2006 *In Press*.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E. P.; RAE, G. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, 2006, *In Press*.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, Sup. 1, p. S4-S11, 2003.

CHRISTENSEN, D.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G.; KAISER, V. Combined systemic administration of the glycine NMDA receptor antagonist (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Pain**, v. 83, p. 833-840, 1999.

CHRISTENSEN, D.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. Effect of gabapentin and lamotrigine on mechanical allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Pain**, v. 93, p. 147-153, 2001.

CHUDLER, E. H.; ANDERSON, L. C. Behavioral and electrophysiological consequences of deafferentation following chronic constriction of the infraorbital nerve in adult rats. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 165-172, 2002.

CHUDLER, E. H.; DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. **Pain**, v. 60, p. 3-38, 1995.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, p. 617-624, 2003.

CLAPHAM, D. E.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G.; JULIUS, D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 591-596, 2003.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory aminoacids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 3665-3670, 1992.

COGGESHALL, R. E.; LEKAN, H. A.; DOUBELL, T. P.; ALLCHORNE, A.; WOOLF, C. J. Central changes in primary afferent fibers following peripheral nerve lesions. **Neuroscience**, v. 77, p. 1115-1122, 1997.

CONG-YING, WANG; YING-WEI, WANG; ZHI-QI, ZHAO. Peripheral NMDA and non-NMDA receptors contribute to nociception: an electrophysiological study. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p.31-34, 2000.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. **Annual Reviews Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 205-237, 1997.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **The Journal of Pain**, v. 1, N° 3, Sup. 1, p. 35-44, 2000.

COSTIGAN, M.; BEFORT, K.; KARCHEWSKI, L.; GRIFFIN, R. S.; D'URSO, D.; ALLCHORNE, A.; SITARSKI, J.; MANNION, J. W.; PRATT, R. E.; WOOLF, C. J. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. **BioMed Central Neuroscience**, v. 3, p. 16, 2002.

COULTER, D. A. Antiepileptic drug cellular mechanisms of action: where does lamotrigine fit in? **Journal of Child Neurology**, v. 12, suppl. 1, p. S2-S9, 1997.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; CHELLY, J. E. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359-371, 2005.

COWARD, K.; PLUMPTON, C.; FACER, P.; BRICH, R.; CARLSTEDT, T.; TATE, S.; BOUNTRA, C.; ANAND, P. Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. **Pain**, v. 85, p. 41-50, 2003.

CUMBERBATCH, M. J.; HERRERO, J. F.; HEADLEY, P. M. Exposure of rat spinal neurons to NMDA, AMPA and kainate produces only short-term enhancements of responses to noxious and non-noxious stimuli. **Neuroscience Letters**, v. 181, p. 98-102, 1994.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 765-767, 1991.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G.; QUACK, G. NMDA channel blockers: memantine and amino-aklylcyclohexanes--in vivo characterization. **Amino Acids**, v. 19, p. 167-172, 2000.

DAVIDSON, E. M.; CARLTON, S. M. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. **Brain Research**, v. 785, p. 136-142, 1998.

DAVIES, S. N.; LODGE, D. Evidence for an involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in "wind-up" of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Research**, v. 424, p. 402-406, 1987.

DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M. J.; HATCHER, J. P.; DAVEY, P. T.; OVEREND, P.; HARRIES, M. H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; HUGHES, S. A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A. J.; PUGH, P. L.; ROGERS, D. C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183-187, 2000.

DAVIS, K. D.; POPE, G. E. Noxious cold evokes multiple multiple sensations with distinct time courses. **Pain**, v. 98, p. 179-185, 2002.

DE PETROCELLIS, L.; BISOGNO, T.; MACCARRONE, M.; DAVIS, J. B.; FINAZZI-AGRO, A.; DI MARZO, V. The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 12856-12863, 2001.

DECOSTERD, I.; JI, R. R.; ABDI, S.; TATE, S.; WOOLF, C. J. The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. **Pain**, v. 96, p. 269-277, 2002.

DESEURE, K.; ADRIAENSEN, H. Nonevoked facial pain in rats following infraorbital nerve injury: a parametric analysis. **Physiology & Behaviour**, v. 81, p. 595-604, 2004.

DESMEULES, J. A.; KAYSER, V.; WEIL-FUGAZZA, J.; BERTRAND, A.; GUILBAUD, G. Influence of the sympathetic nervous system in the development of abnormal pain-related behaviours in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 67, p. 941-951, 1995.

DEVULDER, J.; DE LAAT, M. Lamotrigine in the treatment of chronic refractory neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, p. 398-403, 2000.

DIB-HAJJ, S. D.; FJELL, J.; CUMMINS, T. R.; ZHENG, Z.; FRIED, K.; LAMOTTE, R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Pain**, v. 83, 591-600, 1999.

DICKENSON, A. H.; MATTHEWS, E. A.; SUZUKI, R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. **European Journal of Pain**, v.6, Suplemento A, p. 51-60, 2002.

DITZLER, K. Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome. **Arzneim. Forsch. Drug Research**, v. 41, p. 773-780, 1991.

DOUGHERTY, P. M.; WILLIS, W. D. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined microiontophoretic application of N-methyl-D-aspartate and substance P. **Pain**, v. 47, p. 85-93, 1991

DOURSOUT, M.; LIANG, Y.; CHELLY, J.E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 50, 909-916, 2003.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Canadian Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 75, p. 704–712, 1997.

DRAY, A.; PATEL, I.A.; PERKINS, M.N.; RUEFF, A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 1129–1134, 1992.

DRAY, A., PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences**, v.16, p. 99–104, 1993.

DRAY, A.; PERKINS, M.N. Kinins and pain. Em: Farmer, S.: **The Kinin System**. Academic Press, San Diego, p. 157–172, 1997.

DU, J.; KOLTZENBURG, M.; CARLTON, S. M. Glutamate-induced excitation and sensitization of nociceptors in rat glabrous skin. **Pain**, v. 89, p. 187-198, 2001.

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

EIDE, P. K.; JORUM, E.; STUBHAUG, A.; BREMNES, J.; BREIVIK, H. Relief of post-herpetic neuralgia with the *N*-methyl-d-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. **Pain**, v. 58, p. 347-354, 1994.

EIDE, P. K.; STUBHAUG, A.; STENEHJEM, A. Central dysesthesia pain after traumatic spinal cord injury is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation. **Neurosurgery**, v. 64, p. 283-291, 1995.

EIDE, K.; STUBHAUG, A. Relief of glossopharyngeal neuralgia by ketamine-induced *N*-methyl-D-aspartate receptor blockade. **Neurosurgery**, v. 41, p. 505-508, 1997.

EISENBERG, E.; VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M. The NMDA antagonist Memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. **Pain**, v. 54, p. 301-307, 1993.

EISENBERG, E.; LACROSS, S.; STRASSMAN, A. M. The effects of the clinically tested NMDA receptor antagonist memantine on carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 255, p. 123-129, 1994.

EISENBERG, E.; LACROSS, S.; STRASSMAN, A.M. The clinically tested N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine blocks and reverses thermal hyperalgesia in a rat model of painful mononeuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 187, p. 17-20, 1995.

EISENBERG, E.; KLEISER, A.; DORTORT, A.; HAIM, T.; YARNITSKY, D. The NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor antagonist memantine in the treatment of postherpetic neuralgia: a double-blind, placebo-controlled study. **European Journal of Pain**, v. 2, p. 321-327, 1998.

EISENBERG, E.; LURIE, Y.; BRAKER, C.; DAOUD, D.; ISHAY, A. Lamotrigine reduces painful diabetic neuropathy: a randomized, controlled study. **Neurology**, v. 57, p. 505-509, 2001.

ERICHSEN, H. K.; BLACKBURN-MUNRO, G. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain**, v. 98, p. 151-161, 2002.

ERICHSEN, H. K.; HAO, J.; XU, X.; BLACKBURN-MUNRO, G. A comparison of the antinociceptive effects of voltage-activated Na<sup>+</sup> channel blockers in two rat models of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, p. 275-282, 2003.

FANG, X.; DJOUHRI, L.; BLACK, J. A.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G.; LAWSON, S. N. The presence and role of the tetrodotoxina-resistant sodium channel Na<sub>v</sub>1.9 (NaN) in nociceptive primary sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 7425-7433, 2002.

FAUSSNER, A.; BATHON, J.M.; PROUD, D. Comparison of the responses of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors to agonist stimulation. **Immunopharmacology**, v. 45, p. 13-20, 1999.

FELSBY, S.; NIELSEN, J.; ARENDT-NIELSEN, L., JENSEN, T. S. NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. **Pain**, v. 64, p. 283-291, 1995.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FINE, P. G. Low-dose ketamine in the management of opioid nonresponsive terminal cancer pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 17, p. 296-300, 1999.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; BACH, F. W.; JOHANNESSEN, I. L.; JENSEN, T. S. Lamotrigine in spinal cord injury pain: a randomized controlled trial. **Pain**, v. 96, p. 375-383, 2002.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; BACH, F. W.; JOHANNESSEN, I. L.; JENSEN, T. S. Lamotrigine in spinal cord injury pain: a randomized controlled trial. **Pain**, v. 96, p. 375-383, 2002.

FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Spinal cord injury: mechanisms and treatment. **European Journal of Neurology**, v. 11, p. 73-82, 2004.



FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E. HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Archives of Oral Biology**, v. 44, p. 27-32, 1999.

FISHER, K.; CODERRE, T. J.; HAGEN, N. A. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management: preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, p. 358-373, 2000.

FITZGERALD, M.; BUTCHER, T.; SHORTLAND, P. Developmental changes in the laminar termination of A $\beta$  fibre cutaneous sensory afferents in the rat spinal cord dorsal horn. **Journal of Comparative Neurology**, v. 348, p. 225-2133, 1994.

FOX, A.; GENTRY, C.; PATEL, S.; KESINGLAND, A.; BEVAN, S. Comparative activity of the anti-convulsants oxcarbazepine, carbamazepine, lamotrigine and gabapentin in a model of neuropathic pain in the rat and guinea-pig. **Pain**, v. 105, p. 355-362, 2003.

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

FROST, S. A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N.; KHAN, R. A. Does hyperalgesia to cooling stimuli characterize patients with sympathetically-maintained pain (reflex sympathetic dystrophy)? Em: **Proceedings of the Vth World Congress on Pain**, p. 151-156, 1988.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMISTU, T.; TAKESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 $\beta$  in the rat. **Brain Research**, v. 657, p. 133-140, 1994.

FUKUOKA, T.; KONDO, E.; DAI, Y.; HASHIMOTO, N.; NOGUCHI, K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal ligation nerve model. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 4891-4900, 2001

FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; TACHIBANA, T.; DAI, Y.; YAMANAKA, H.; NOGUCHI, K. VR1, but not P2X<sub>3</sub>, increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. **Pain**, v. 99, p. 111-120, 2002.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception. **CNS Drugs**, v. 15, p. 29-58, 2001.

FUNDYTUS, M. E.; YASHPAL, K.; CHABOT, G. J.; OSBORNE, M. G.; LEFEBVRE, C. D.; DRAY, A.; HENRY, J. L.; CODERRE, T. J. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, p. 354-367, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p.129-141, 1999.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2. ed. **New York: Raven Press**, 1992.

GAO, X.; KIM, H. K.; CHUNG, J.M.; CHUNG, K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. **Pain**, v. 116, p. 62-72, 2005.

GASIC, G. P.; HOLLEMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annual Reviews Physiology**, v. 54, p. 507-536, 1992.

GAUDET, A. D.; WILLIAMS, S. J.; HWI, L. P.; RAMER, M. S. Regulation of TRPV2 by axotomy in sympathetic, but not sensory neurons. **Brain Research**, v. 1017, p. 155-162, 2004.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Experimental Neurology**, v. 192, p. 163–166, 2005.

GEPPETTI, P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. **Regulatory Peptides**, v. 47, p. 1–23, 1993.

GOLD, M. S.; WEINREICH, D.; KIM, C. S.; WANG, R.; TREANOR, J. PORRECA, F.; LAI, J. Redistributon of Na<sub>v</sub>1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 158-166, 2003.

GORDON, S.M.; DUBNER, R.; DIONNE, R. A. Antihyperalgesic effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan in the oral surgery model. **Journal Clinical of Pharmacology**. v. 39, p. 139–146, 1999.

GRAHAM, L. T.; SHANK, P. R.; WERMAN, R.; APRISON, M. H. Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord. **Journal of Neurochemistry**, v. 14, p. 465-472, 1967.

GROSSMAN, W.; SCHUTZ, W. Memantine and neurogenic bladder dysfunction in spastic conditions. **Arzneim-Forsch Drug Research**, v. 32, p. 1273-1276, 1982.

HALL, J. M.; MORTON, I. K. M. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. Em: **The kinin system** (FARMER, S. D.). New York : Academic Press, p. 9-43, 1997.

HATT, H. Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 177-186, 1999.

HAY, C. H.; DE BELLEROCHE, J. S. Carragenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in spinal cord. **Neuroreport**, v. 8, p. 1249-1251, 1997.

HAY, C. H.; DEBELLEROCHE, J. S. Dexamethasone prevents the induction of COX-2 mRNA and prostaglandins in the lumbar spinal cord following intraplantar CFA in parallel with inhibition of oedema. **Neuroscience**, v. 78, p. 843-850, 1998.

HAY, C. H.; TREVETHICK, M. A.; WHEELDON, A.; BOWERS, J. S.; DE BELLEROCHE, J. S. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. **Neuroscience**, v. 78, p. 843-850, 1997.

HALEY, J. E.; SULLIVAN, A. F.; DICKENSON, A. H. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate involvement in prolonged chemical nociception in the rat. **Brain research**, v. 518, p. 218-226, 1990.

HATT, H. Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. **Naturwissenschaften**, v. 86, p.177-186, 2002.

HAYASHI, Y.; SEKIYAMA, N.; NAKANISHI, S.; JANE, D.E.; SUNTER, D.C.; BIRSE, E. F.; UDVARHELYI P.M.; WATKINS, J. C. Analysis of agonist and antagonist activities of phenylglycine derivatives for different cloned metabotropic glutamate receptor subtypes. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 3370-3377, 1994.

HERZOG, R. I.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Persistent TTX-resistant Na<sup>+</sup> current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, p. 1251-1364, 2001.

HEWITT, D. J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. *The Clinical Journal of Pain*. v. 16, p. S73–S79, 2000.

HOFFMAN, V.; COPPEJANS, H.; VERCAUTEREN, M.; ADRIAENSEN, H. Successful treatment of postherpetic neuralgia with oral ketamine. **The Clinical Journal of Pain**, v. 10, p. 240-242, 1994.

HOLDEN, J. E.; PIZZI, J. A. The challenge of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 935-948, 2003.

HOLLEMAN, M.; HEINEMAN, S. Cloned glutamate receptors. **Annual Reviews Neuroscience**, v. 17, p. 31-108, 1994.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **General Pharmacology**, v. 30, p. 5-11, 1998.

HU, H. J.; BHAVE, G.; GEREAU, R. W. 4TH. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 7444-7452, 2002.

HUA, X. Y.; CHEN, P.; YAKSH, T. J. Inhibition of spinal protein kinase C reduces nerve injury-induced tactile allodynia in neuropathic rats. **Neuroscience Letters**, v. 276, p. 99-102, 1999.

HUDSON, L. J.; BEVAN, S.; WOTHERSPOON, G.; GENTRY, C.; FOX, A.; WINTER, J. VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. **The European Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 2105-2114, 2001.

HUGHES, S. R.; WILLIAMS, T. J.; BRAIN, S. D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. **European Journal of Pharmacology**, v. 191, p. 481-484, 1990.

HUNTER, J. C.; GOGAS, K. R.; HEDLEY, L. R.; JACOBSON, L. O.; KASSOTAKIS, L.; THOMPSON, J.; FONTANA, D. J. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 324, p. 153-160, 1997.

HWANG, S. J.; BURETTE, A.; RUSTIONI, A. Vanilloid receptor VR-1 positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors. **Journal of Neurocytology**, v. 33, p. 321-329, 2004.

IANARO, A.; O'DONELL, C. A.; DIROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carragenan-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, p. 370-375, 1994.

IBUKI, T.; HAMA, A.; WANG, X. T.; PAPAPAS, G. D.; SAGEN, J. Loss of GABA immunoreactivity in the spinal dorsal horn of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts. **Neuroscience**, v. 76, p. 845-848, 1997.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J. J.; GUILBAUD, G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. **Pain**, v. 79, p. 281-290, 1999.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, v. 42, p. 299-332, 2001.

JACKSON, D. L.; GRAFF, C. B.; RICHARDSON, J. D.; HARGREAVES, K. M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 284, p. 321-325, 1995.

JANG, J. H.; KIM, D. W.; SANG NAM, T.; SE PAIK, K.; LEEM, J. W. Peripheral glutamate receptors contribute to mechanical hyperalgesia in a neuropathic pain model of the rat. **Neuroscience**, v. 128, p. 169-76, 2004.

JENSEN, T. S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. **European Journal of Pain**, v. 6, p. 61-68, 2002.

JENSEN, T. S.; BARON, R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. **Pain**, v. 102, p. 1-8, 2003.

JIANG, Z.G.; SHEN, E.; DUN, N. J. Excitatory and inhibitory transmission from dorsal root afferents to neonate rat motoneurons. **Brain Research**, v. 535, p. 110-118, 1990.

JOHNSON, J. L. The excitant aminoacids glutamate and aspartic acid as transmitter candidates in the vertebrate central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 10, p. 155-202, 1978.

JONES, N. G.; SLATER, R.; CADIOU, H.; McNAUGHTON, P.; McMAHON, S. B. Acid-induced pain and its modulation in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 10974-10979, 2004.

JUAN, H.; LEMBECK, F. Action of peptides and other algescic agents on paravascular pain receptors of the isolated perfused rabbit ear. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 283, p. 151-164, 1974.

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

KEMP J. A.; FOSTER, A. C.; WONG, E. H. F. Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 294-298, 1987.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. Na experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, p. 355-363, 1992.

KIM, C. H.; OH, Y.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. **Molecular Brain research**, v. 95, p. 153-161, 2001.

KING, A. E.; LOPEZ-GARCIA, J. A. Excitatory aminoacid receptor-mediated neurotransmission from cutaneous afferents in rat dorsal horn *in vitro*. **Journal of Physiology**, v. 472, p. 433-457, 1993.

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

KOLHEKAR, R.; MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Characterization of the role of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in thermal nociception in the rat. **Neuroscience**, v. 57, p. 385-395, 1993.

KOLHEKAR, R.; MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated changes in thermal nociception: allosteric modulation at glycine and polyamine recognition sites. **Neuroscience**, v. 63, p. 925-936, 1994.

KOLTZENBURG, M.; TOREBJORK, H. E.; WAHREN, L. K. Nociceptor modulated central plasticity causes mechanical hyperalgesia in chronic neuropathic and acute chemogenic pain. **Brain**, v. 117, p. 579-591, 1994.

KONDO, E.; IWATA, K.; OGAWA, A.; TASHIRO, A.; TSUBOI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; MORIMOTO, T.; NOGUCHI, K. Involvement of glutamate receptors on hyperexcitability of wide dynamic range neurons in the gracile nucleus of the rats with experimental mononeuropathy. **Pain**, v. 95, p. 153-163, 2002.

KONTINEN, V. K.; STANFA, L. C.; BASU, A.; DICKENSON, A. H. Electrophysiological evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. **Anesthesiology**, v. 94, p. 333-339, 2001.

KORNHUBER, J.; BORMANN, J.; HUBERS, M.; RUSCHE, K.; RIEDERER, P. Effects: of the l-amino-adamantanes at the ( + )-MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel-a human postmortem brain study. **European Journal of Pharmacology**, v. 206, p. 297-300, 1991.

KORNHUBER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. **Biological Psychiatry**, v. 41, p.135-144, 1997.

KOSAI, K.; TATEYAMA, S.; IKEDA, T.; UNO, T.; NISHIMORI, T.; TAKASAKI, M. MK-801 reduces non-noxious stimulus-evoked Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of rats with chronic constriction nerve injury. **Brain Research**, v. 910, p. 12-18, 2001.

LABUDA, C. J.; DONAHUE, R.; FUCHS, P. N. Enhanced formalin nociceptive responses following L5 nerve ligation in the rat reveals neuropathy-induced inflammatory hyperalgesia. **Pain**, v. 91, p. 59-63, 2001.

LAI, J.; HUNTER, C. J.; PORRECA, F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, p. 291-297, 2003.

LAI, J.; GOLD, M. S.; KIM, C. S.; BIAN, D.; OSSIPOV, M. H.; HUNTER, J. C.; PORRECA, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin resistant sodium channel, Na<sub>v</sub>1.8. **Pain**, v. 95, p. 143-152, 2002.

LAIRD, J. M.; BENNET, G. J. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. **Journal of Neurophysiology**, v. 69, p. 2072-2085, 1993.

LARRIVÉE, J.F.; BACHYAROV, D.R.; HOULE, F.; LANDRY, J.; HUOT, J.; MARCEAU, F. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B<sub>1</sub> receptors induced by tissue injury. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 1419–1426, 1998.

LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Excitatory aminoacid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 324, p. 169-177, 1997.

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

LEACH, M. J.; MARDEN, C. M.; MILLER, A. A. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. **Epilepsia**, v. 27, p. 490-497, 1986.

*LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53(4), p. 597-652, 2001.*

LEE, T. H.; WANG, C. J.; WU, P. C.; BUERKLE, H.; LIN, S. H.; YANG, L. C. The thermal and mechanical anti-hyperalgesic effects of pre- versus post-intrathecal treatment with lamotrigine in a rat model of inflammatory pain. **Life Sciences**, v. 70, p. 3039-3047, 2002.

LEEM, J. W.; HWANG, J. H.; HWANG, S. J.; PARK, H.; KIM, M. K.; CHOI, Y. The role of peripheral N-methyl-D-aspartate receptors in Freund's complete adjuvant induced mechanical hyperalgesia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 297, p. 155-118, 2001.

LEKAN, H. A.; CARLTON, S. M.; COGGESHALL, R. E. Sprouting of B-HRP fixed fibers of the L5 spinal nerve following L5 and L6 spinal ligation in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 208, p. 147-150, 1996.

LEPPIK, I. E.; MARIENAU, K.; GRAVES, N. M.; RASK, C. A. MK-801 for epilepsy: a pilot study. **Neurology**, v. 38, p. 405, Sup. 1, 1988.

LEVINE, J.D., FIELDS, H.L., BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **Journal of Neuroscience**, v. 13, 2273–2286, 1993.

LEWIN, M. R.; WALTERS, B. T. Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 18-23, 1999.

LIN, Q., PENG, Y.B., WILLIS, W.D. Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 3026-3034, 1996.

LIN, Q.; PENG, Y.B.; WU, J.; WILLIS, W.D. Effects of Protein Kinase A activation on the responses of primate spinothalamic tract neurons to mechanical stimuli. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, p. 214-221, 2002.

LIU, X. G.; SANDKÜHLER, J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. **Neuroscience Letters**, v. 191, p. 43-46, 1995.

LOFGREN, O.; QI, Y.; LUNDBERG, T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally-induced inflammatory reactions in rat mode. **Burns**, v. 25, p. 125-129, 1999.

LoGRASSO, P.; McKELVY, J. Advances in pain therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 452-456, 2003.

LOMBARD, M. -C.; BESSON, J. -M. Attempts to gauge the relative importance of pre- and postsynaptic effects of morphine on the transmission of noxious messages in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Pain**, v. 37, p. 335-345, 1989.

LOPES, P.; KAR, S.; TOUSIGNANT, C., REGOLI, D., QUIRION, R., COUTURE, R., Autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. **Synapse**, v. 15, p. 48-57, 1993.

LOPES, P.; KAR, S.; CHRE'TIEN, L.; REGOLI, D.; QUIRION, R.; COUTURE, R. Quantitative autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>8</sup>]-bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 68, p. 867-881, 1995.

LYNCH III, J. J.; WADE, C. L.; ZHONG, C. M.; MIKUSA, J. P.; HONORE, P. Attenuation of mechanical allodynia by clinically utilized drugs in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. **Pain**, v. 110, p. 54-63, 2004.

MACDERMOTT, A. B.; MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; SMITH, S. J.; BARKER, J. L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. **Nature**, v. 321, p. 519-522, 1986.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, p. 1-19, 1997.

MACLEAN, D.B.; WHEELER, F.; HAYES, L. Basal and stimulated release of substance P from dissociated cultures of vagal sensory neurons. **Brain Research**, v. 519, p. 308-314, 1990.

MALAN, T. P. J.; MATA, H. P.; PORRECA, F. Spinal GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesiology**, v. 96, 1161-1167, 2002.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, 291-300, 1993.



MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> and aminoacids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 2768-2776, 1995.

MAO, J.; PRICE, D. D.; HAYES, R. L.; LU, J.; MAYER, D. J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Research**, v. 598, p. 271-278, 1992.

MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R. L.; LU, J.; MAYER, D. J.; FRENK, H. Intrathecal treatment with dextrorphan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy. **Brain Research**, v. 605, p. 164-168, 1993.

MAO, J.; PRICE, D. D.; PHILLIPS, L. L.; LU, J.; MAYER, D. J. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 198, p. 75-78, 1995.

MAO, J.; PRICE, C. D.; MAYER, D. J. Experimental neuropathy reduces the antinociceptive effect of morphine: implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. **Pain**, v. 61, p. 353-364, 1995.

MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHYAROV, D.R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacology Reviews**, v. 50, p. 357-386, 1998.

MARCEAU, F.; ADAM, A.; HOULE, S. BOUTHILIER, J.; BACHYAROVA, M.; BACHYAROV, D.R. Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 382, p. 131-133, 2001.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews**, v. 6, p. 521-532, 2005.

MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. **The American Journal of Medicine** v. 101, Sup. 1, p. S6-S18, 1996.

MATHIS, S.A.; CRISCIMAGNA, N.L.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>+2</sup> signalling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p. 128-139, 1996.

MAX, M. B.; BYAS-SMITH, M. G.; GRACELY, R. H.; BENNETT, G. J. Intravenous infusion of the NMDA antagonist, ketamine, in chronic posttraumatic pain with allodynia: a double-blind comparison to alfentanil and placebo. **Clinical Neuropharmacology**, v. 18, p. 360-368, 1995.  
MAYER, M. L.; MACDERMOTT, A. B.; WESTBROOK, G. L.; SMITH, S. J.; BARKER, J. L. Agonist and voltage-gated calcium entry in cultured mouse

spinal cord neurons under voltage clamp measured using Arsenazo III. **Journal of Neuroscience**, v. 7, p. 3230-3244, 1987.

MAYER, D. J.; MAO, J.; PRICE, D. D. The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. **Pain**, v. 61, p. 365-374, 1995.

McKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v. 416, p. 52-58, 2002.

McMAHON, S.B.; JONES, N.G. Plasticity of pain signaling: role of neurotrophic factors exemplified by acid-induced pain. **Journal of Neurobiology**, v. 61, p. 72-87, 2004.

MELZACK, R., CODERRE, T.J., KATZ, J., VACCARINO, A.L. Central neuroplasticity and pathological pain. **Annals NY Academy Sciences** 933, 157-174, 2001.

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

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

MILLER, K. E.; CLEMENTS, J. R. ; LARSON, A. A.; BEITZ, A. J. Organization of glutamate like-immunoreactivity in the rat superficial dorsal horn: light and electron microscopic observations. **Journal of Comparative Neurology**, v. 277, p. 28-36, 1988.

MIYABE, T.; MILETIC, G.; MILETIC, V. Loose ligation of the sciatic nerve in rats elicits transient up-regulation of Homer1a gene expression in the spinal dorsal horn. **Neuroscience Letters**, *In Press*, 2006.

MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L.; FLOCKERZI, V.; BINDELS, R. J.; BRUFORD, E. A.; CATERINA, M. J.; CLAPHAM, D. E.; HARTENECK, C.; HELLER, S.; JULIUS, D.; KOJIMA, I.; MORI, Y.; PENNER, R.; PRAWITT, D.; SCHARENBERG, A. M.; SCHULTZ, G.; NOBUYOSHI, S.; ZHU, M. X. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. **Molecular Cell**, v. 9, p. 229-231, 2002.

MONTIEL, A. F.; MARTÍNEZ, C. G.; PALAO, C. M.; SANZ, N.G.; CARVAJAL, A. F.; BALLESTER, G. F.; CASES, R. P. Molecular architecture of the vanilloid receptor. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 1820-1826, 2004.

MOORE, K. A.; KOHNO, T.; KARCHEWSKI, L. A.; SCHOLZ, J.; BABA, H.; WOOLF, C. J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 6724-6731, 2002.

MORENILLA-PALAO, C.; PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; FERRER-MONTIEL, A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25665-25672.

MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T, SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; NAKANISHI, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature**, v. 354, p. 31-37, 1991.

MORRIS, R.; SOUTHAM, E.; GITTINS, S. R.; DE VENTE, J.; GARTHWAITE, J. The NO-cGMP pathway in neonatal dorsal horn. **European Journal of Neuroscience**, v. 6, p. 876-879, 1994.

MUNOZ, C.M.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Receptor-mediated internalization of bradykinin DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 303–309, 1992.

MUNOZ, C.M.; COTECCHIA, S.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. B<sub>2</sub> kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, p. 336–344, 1993.

MURPHY, P. G.; RAMER, M. S.; BORTHWICK, L.; GAULDIE, J.; RICHARDSON, P. M.; BISBY, M. A. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2243–2253, 1999.

NAKAMURA-CRAIG, M.; FOLLENFANT, R. L. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE<sub>2</sub> and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Pain**, v. 63, p. 33-37, 1995.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. **Science**, v. 258, p. 597-603, 1992.

NEIL, A.; ATTAL, N.; GUILBAUD, G. Effects of guanetidine on sensitization to natural stimuli and self-mutilating behaviour in rats with a peripheral neuropathy. **Brain Research**, v. 565, p. 237-246, 1991.

NEUGEBAUER, V.; LUCKE, T.; SCHAIBLE, H. G. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. **Journal of Neurophysiology**, v. 70, p. 1365-1377, 1993.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**, v. 98, p. 1-8, 2002.

NEUGEBAUER, V.; CARLTON, S. M. Peripheral metabotropic glutamate receptors as drug targets for pain relief. **Expert Opinion**, v. 6, p. 1-13, 2002.

NI, A.; CHAO, L.; CHAO, J. Transcription factor nuclear factor NF- $\kappa$ B regulates the inducible expression of the human B<sub>1</sub> receptor gene in inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 2784–2791, 1998.

NIKOLAJSEN, L.; HANSEN, C.L.; NIELSEN, J. KELLER, J.; ARENDT-NIELSEN, L.; JENSEN, T. S. The effect of ketamine on phantom pain: a central neuropathic disorder maintained by peripheral input. **Pain**, v. 67, p. 69-77, 1996.

NOGUCHI, K.; KAWAI, Y.; FUKUOKA, T.; SENBA, E.; MIKI, K. Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 7633-7643, 1995.

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

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, T.; TOYOOKA, H.; TOMINAGA, M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 3375-3378, 2002.

OBREJA, O.; RATHEE, P. K.; LIPS, K. S.; DISTLER, C.; KRESS, M. IL-1 $\beta$  potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 16, p. 1497–1503, 2002.

OKUDA, K.; SAKURADA, C.; TAKAHASHI, M.; YAMADA, T.; SAKURADA, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, v. 92, p. 107-115, 2001.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory aminoacids in the skin of rat hindpaw. **Brain Research**, v. 787, p. 161-164, 1998.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiology Reviews**, v. 73, p. 229-308, 1993.

PANTEV, M.; RITTER, R.; GÖRTELMAYER, R. Clinical and behavioural evaluation in long-term care patients with mild to moderate dementia under

memantine treatment. **Zeitschrift für Gerontopsychologie und Psychiatrie**, v. 6, p. 103-117, 1993.

PARRIS, W. C.; JANICKI, P.K.; JOHNSON, B. JR; HORN, J. L. Intrathecal ketorolac tromethamine produces analgesia after chronic constriction injury of sciatic nerve in rat. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 43, p. 867-870, 1996.

PARSONS, C. G.; GRUNER, R.; ROZENTAL, J.; MILLAR, J.; LODGE, D. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). **Neuropharmacology**, v. 32, p. 1337-1350, 1993.

PARSONS, C. G.; QUACK, G.; BRESINK, I. ; BARAN, L. ; PRZEGALINSKI, E. ; KOSTOWSKI, W. ; KRZASCIK, P.; HARTMANN, S.; DANYSZ, W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity *in vivo*. **Neuropharmacology**, v. 34, p. 1239-1258, 1995.

PARSONS, C.G.; DANYSZ, W.; QUACK, G. Glutamate in CNS Disorders as a target for drug development. An update. **Drug News Perspectives**. v. 11, p.523–569, 1998.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; REEVE, A. J.; ANDERSSON, D. A.; STORY, G.M.; EARLEY, T. J.; DRAGNI, I.; McINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, p. 705-715, 2002.

PENG, Y. B.; LIN, Q.; WILLIS, W. D. Involvement of protein kinase C in responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli and periaqueductal gray descending inhibition. **Experimental Brain Research**, v. 114, p. 561-570, 1997.

PERROT, S.; ATTAL, N.; ARDID, A.; GUILBAUD, G. Are mechanical and cold allodynia in mononeuropathic and arthritic rats relieved by systemic treatment with calcitonina and guanethidine? **Pain**, v. 52, p. 41-47, 1993.

PERSSON, J.; AXELSSON, G.; HALLIN, R.G.; GUSTAFSSON, L. L. Beneficial effect of ketamine in a chronic pain state with allodynia, possibly due to central sensitization. **Pain**, v. 60, p. 217-222, 1995.

PETERSEN, K. L.; MALONEY, A.; HOKE, F.; DAHL, J. B.; ROWBOTHAM, M. C. A randomized study of the effect of oral lamotrigine and hydromorphone on pain and hyperalgesia following heat/capsaicin sensitization. **The Journal of Pain**, v. 4, p. 400-406, 2003.

PHAGOO, S.B.; POOLE, S.; LEEB-LUNDBERG, L.M.F. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 $\beta$  shift the

repertoire of receptor subtypes from B<sub>2</sub> to B<sub>1</sub> in human lung fibroblasts. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p. 325–333, 1999.

PICARD, P.; BOUCHER, S.; REGOLI, D.; GITTER, B. D.; HOWBERT, J. J.; COUTURE, R. Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat **European Journal of Pharmacology**, v. 232, p. 255-261, 1993.

PIN, J.; WAEBER, C.; PREZEAU, L.; BOCKAERT, J.; HEINEMANN, S. F. *Alternative Splicing Generates Metabotropic Glutamate Receptors Inducing Different Patterns of Calcium Release in Xenopus oocytes.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 10331-10335, 1992.

PORRECA, F.; LAI, J.; BIAN, D.; WEGERT, S.; OSSIPOV, M. H.; EGLIN, R. M.; KASSOTAKIS, L.; NOVAKOVIC, S.; RABERT, D. K.; SANGAMESWARAN, L.; HUNTER, J. C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, p. 7640-7644, 1999.

PREMKUMAR, L. S.; AHERN, G. P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, v. 408, p. 985-990, 2000.

PRICE, M.P.; McILWRATH, S. L.; XIE, J.; CHENG, C.; OIAO, J.; TARR, D. E. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. **Neuron**, v. 32, p. 1071-1083, 2001.

RAIGORODSKY, G.; URCA, G. Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. **Brain Research**, v. 422, p. 158-162, 1987.

RAIGORODSKY, G.; URCA, G. Spinal antinociceptive effects of excitatory aminoacid antagonists: quisqualate modulates the activation of N-methyl-D-aspartate. **European Journal of Pharmacology**, v. 182, p. 37-47, 1990.

RANDIC, M.; HECIMOVIC, H.; RYU, P. Substance P modulates glutamate-induced currents in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. **Neuroscience Letters**, v. 117, p. 74-80, 1990.

RASHID, M. H.; INOUE, M.; BAKOSHI, S.; UEDA, H. Increased expression of vanilloid receptor 1 on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effect of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 709-717, 2003.

RAYMOND, L. A.; TINGLEY, W. G.; BLACKSTONE, C. D.; ROCHE, K. W.; HUGANIR, R. L. Glutamate receptor modulation by protein fosforilation. **Journal of Physiology**, v. 88, p. 181-192, 1994.

REGOLI, D.; BARABÉ, J.; Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacology Reviews**, v. 32, p. 1-46, 1980.

REID, G.; FLONTA, M. L. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**, v. 413, p. 480, 2001.

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

RENAUNEN, M.; DAM, M.; YUEN, A. W. C. A randomised open multi-center comparative trial of lamotrigine and carbamazepine as monotherapy in patients with newly diagnosed or recurrent epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 23, p. 149-155, 1996.

RENGANATHAN, M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Contribution of  $Na_v1.8$  sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, p. 629-640, 2001.

RO, J. Y. Contribution of peripheral NMDA receptors in craniofacial muscle nociception and edema formation. **Brain Research**, v. 979, p. 78-84, 2003.

RUSCHEWEYH, R.; SANDKÜHLER, J. Role of kainate receptors in nociception. **Brain Research Reviews**, v. 40, p. 215-222, 2002.

RUSH, A. M.; BRAU, M. E.; ELLIOTT, A. A.; ELLIOTT, J. R. Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. **Journal of Physiology**, v. 511, p. 771-789, 1998.

RUSIN, K. I.; JIANG, M. C.; CERNE, R.; RANDIC, M. Interactions between excitatory amino acids and tachykinins in the rat spinal dorsal horn. **Brain Research Bulletin**, v. 30, p. 329-33, 1993.

SANDKÜHLER, J.; LIU, X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 2476-2480, 1998.

SANGAMESWARAN, L.; DELGADO, S. G.; FISH, L. M.; KOCH, B. D.; JAKEMAN, L. B.; STEWART, G. R.; SZE, P.; HUNTER, C. J.; EGLIN, R. M.; HERMAN, R. C. Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 5953-5956, 1996.

SARDI, S.P.; DARAY, F.M.; ERRASTI, A.E.; PELOROSSO, F.G.; PUJOL-LEREIS, V.A.; REY-ARES, V.; ROGINES-VELO, M.P. ROTHLIN, R.P. Further pharmacological characterization of bradykinin  $B_1$  receptor up-regulation in human umbilical vein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, p. 1019-1025, 1999.

SANG, C. N. NMDA-receptor antagonists in neuropathic pain: experimental methods to clinical trials. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, Sup. 1, p. S21-S25, 2000.

SASAKI, M.; TOHDA, C.; KURAISHI, Y. Region-specific increase in glutamate release from dorsal horn of rats with adjuvant inflammation. **Neuroreport**, v. 9, p. 3219-3222, 1998.

SCHAFERS, M.; BRINKHOFF, J.; NEUKIRCHEN, S.; MARZINIAK, M.; SOMMER, C. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 310, p. 113–116, 2001.

SCHAFERS, M.; SVENSSON, C. I.; SOMMER, C.; SORKIN, L. S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2517–2521, 2003.

SCHANSTRA, J.P. ; BATTAILÉ, E.; MARIN CASTAÑO, M.E.; BARASCUD, Y.; HIRTZ, C.; PESQUERO, J.B.; PECHER, C.; GAUTHIER, F.; GIROLAMI, J.P.; BASCANDS, J.L. The B1-agonist [des-Arg<sup>10</sup>]-kallidin activates transcriptionfactor NF- $\kappa$ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 2080–2091, 1998.

SCHMID, R.L.; SANDLER, A. N.; KATZ, J. Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes. **Pain**. v. 82, p. 111–125, 1999.

SCHNEIDER, E.; FISCHER, P. A.; CLEMENS, R.; BALZEREIT, F.; FUNFGELD, E. W.; HAASE, H. J. Effects of oral memantine administration on Parkinson symptoms. Results of a placebo-controlled multicenter study. **Deutsch Med Wochenschr**, v. 109, p. 987-990, 1984.

SHER, G. D.; MITCHELL, D. Intrathecal N-methyl-D-aspartate induces hyperexcitability in rat dorsal horn convergent neurons. **Neuroscience Letters**, v. 119, p. 199-202, 1990.

SHIMIZU, T.; YOSHIMURA, M.; BABA, H.; SHIMOJI, K.; HIGASHI, H. Role of A $\delta$  afferent fibers in modulation of primary afferent input to the adult rat spinal cord. **Brain Research**, v. 691, p. 92-98, 1995.

SHORTLAND, P.; MOLANDER, M.; FITZGERALD, M.; WOOLF, C. J. Neonatal capsaicin treatment induces invasion of the substantia gelatinosa by the arborizations of HFA's in the rat dorsal horn. **Journal of Comparative Neurology**, v. 296, p. 23-31, 1990.



SIEBECK, M.; SCHORR, M.; SPANNAGL, E.; LEHNER, M.; FRITZ, H.; CHERONIS, J.C.; WHALLEY, E.T. B<sub>1</sub> kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. **Immunopharmacology**, v. 40, p. 49–55, 1998.

SIMONE, D. A.; KAJANDER, K. C. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, p. 2049-2060, 1997.

SIMPSON, D. M.; OLNEY, R.; MCARTHUR, J. C.; KHAN, A.; GODBOLD, J.; EBEL-FROMMER, K. A placebo-controlled trial of lamotrigine for painful HIV-associated neuropathy. **Neurology**, v. 54, p. 2115-2119, 2000.

SINDRUP, S.H.; GRAM, L.F.; ETROSEN, K.; ESHOJ, O.; MOGENSEN, E.F. The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine is effective in the treatment of diabetic neuropathy symptoms, **Pain**, v. 42, p. 135-144, 1990.

SLEEPER, A. A.; CUMMINS, T. R.; DIB-HAJJ, S. D.; HORMUZOLIAR, W.; TYRREL, L.; WAXMAN, S. G.; BLACK, J. A. Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7279-7289, 2000.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D. Increased spinal release of excitatory aminoacids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. **Brain Research**, v. 798, p. 281-286, 1998.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Experimental Neurology**, v. 151, p. 138–142, 1998.

SOMMER, C.; PETRAUSCH, S.; LINDENLAUB, T.; TOYKA, K. V. Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 270, p. 25–28 (1999).

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, p. 9-19, 2001.

STEEN K.H.; ISSBERNER, U.; REEH, P.W. Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. **Neuroscience Letters**, v. 199, p. 29-32, 1995.

STEFANI, A.; SPADONI, F.; BERNARDI, G. Voltage-activated calcium channels: targets of antiepileptic drug therapy? **Epilepsia**, v. 38, p. 959-965, 1997.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 31, 445-451, 1988.

STEINBERG, G. K.; BELL, T. E.; YENARI, M. A. Dose escalation safety and tolerance study of *N*-methyl-D-aspartate antagonist dextromethorphan in neurosurgery patients. **Journal of Neurosurgery**, v. 84, p. 860-866, 1996.

STEINER, T. J.; SILVEIRA, C.; YUEN, A. W. C. and the North Thames Lamictal Study Group. Comparison of lamotrigine (Lamictal) and phenytoin monotherapy in newly diagnosed epilepsy. **Epilepsia**, v. 35, p. 61, 1994.

STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DeHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 3245–3249, 1988.

STORY, G. M.; PEIER, A. M.; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; McINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S. PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, p. 819-829, 2003.

SUCHER, N. J.; AWOBULUYI, M.; CHOI, Y. B. LIPTON, S. A. NMDA receptors : from genes to channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, p. 348-355, 1996.

SUGIURA, T.; TOMINAGA, M.; KATSUYA, H.; MIZUMURA, K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, p. 544-548, 2002.

SUN, X.; LARSON, A. A. Behavioral sensitization to kainic acid and quisqualic acid in mice: comparison to NMDA and substance P responses. **Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 3111-3123, 1991.

SUTHERLAND, S. P.; BENSON, C. J.; ADELMAN, J. P.; McCLESKEY, E. W. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 711-716, 2001.

SUTO, K.; GOTOH, H. Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root neurons. **Neuroscience**, v. 92, p. 1131-1135, 1999.

SUZUKI, R.; MATTHEWS, E.A.; DICKENSON, A. H. Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. **Pain**, v. 91, p. 101-109, 2001

SYRIATOWICZ, J. P.; HU, D; WALKER, J. S.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, v. 94, p. 587-594, 1999.

TAKAHASHI, K.; SATO, J.; MIZUMURA, K. Responses of C-fiber low threshold mechanoreceptors and nociceptors to cold were facilitated in rats persistently

inflamed and hypersensitive to cold. **Neuroscience Research**, v. 47, p. 409-419, 2003.

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

TAL M.; BENETT, G. J. Neuropathic pain sensations are differentially sensitive to dextrorphan. **NeuroReport**, v. 5, p. 1438-1440, 1994.

TANIGUCHI, H.; OKUMURA, N.; HAMADA, J.; INAGAKI, N.; NAKAHATA, Y.; SANO, S.; NAGAI, K. Cold exposure induces tyrosine phosphorylation of BIT through NMDA receptors in the rat hypothalamus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, p. 178-184, 2004.

TEOH, H.; FOWLER, L. J.; BOWERY, N. G. Effects of lamotrigine on the electrically-evoked release of endogenous aminoacids from slices of dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 34, p. 1273-1278, 1995.

TEOH, H.; MALCANGIO, M.; FOWLER, L. J.; BOWERY, N. G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not  $\gamma$ -aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **European Journal of Pharmacology**, v. 302, p. 27-36, 1996.

THUT, P. D.; WRIGLEY, D.; GOLD, M. S. Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons *in vitro*. **Neuroscience**, v. 119, p. 1071-1083, 2003.

TINGLEY, W.G.; EHLERS, M.D.; KAMEYAMA, K.; DOHERTY, C.; PTAK, J.B.; RILEY, C.T.; HUGANIR, R.L.; Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 5157-5166, 1997.

TOHDA, C.; SASAKI, M.; KONEMURA, T.; SASAMURA, T.; ITOH, M.; KURAIISHI, Y. Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, p. 1628-1635, 2001.

TOMINAGA, M.; WADA, M.; MASU, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 6951-6956, 2001.

TOREBJORK, H. E.; LUNDBERG, L. E. R.; LaMOTTE, R. H. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **Journal of Physiology**, v. 448, p. 765-780, 1992.

TOTANI, T.; TAKETANI, Y.; UEDA, N.; NISHISHO, T.; OHMOTO, Y.; SAKATA, Y.; MURAGUCHI, M.; WADA, K.; YAMAMOTO, S. Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 302-309, 1999.

TREEDE, R. D.; KENSHALO, D. R.; GRACEY, R. H. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, p. 105-111, 1999.

TROUPIN, S. A.; MENDIUS, J. R.; CHENG, F.; RISINGER, M. W. MK-801. In: **New Anticonvulsant Drugs** (Meldrum, B. S. & Porter, R. J.), p. 191-201. John Libbey, Londres, 1986.

TRUSSEL, L. O.; THIO, L. L.; ZORUMSKI, C. F.; FISCHBACH, G. D. Rapid desensitization of glutamate receptors in vertebrate central neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 4562-4566, 1988.

TURNBACH, M. E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E<sub>2</sub> or zymosan in the rat. **Pain**, v. 97, p. 127-137, 2002.

UGAWA, S.; UEDA, T.; ISHIDA, Y.; NISHIGAKI, M.; SHIBATA, Y.; SHIMADA, S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 1185-1190, 2002.

UGAWA, S.; UEDA, T.; YAMAMURA, H.; SHIMADA, S. *In situ* hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. **Brain Research & Molecular Brain Research**, v. 136, p. 125-133, 2005.

VANDERAH, T. W.; GARDELL, L. R.; BURGESS, S. E.; IBRAHIM, M.; DOGRUL, A.; ZHONG, C. M.; ZHANG, E. T.; MALAN, T. P.; OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; PORRECA, F. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 7074-7079, 2000.

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

VASKO, M.R.; CAMPBELL, W.B.; WAITE, K.J. Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 4987-4997, 1994.

VESTERGAARD, K.; ANDERSEN, G.; GOTTRUP, H.; KRISTENSEN, B. T.; JENSEN, T. S. Lamotrigine for central poststroke pain: a randomized controlled trial. **Neurology**, v. 56, p. 184-190, 2001.

VOILLEY, N.; DE WEILLE, J.; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 8026-8033, 2001.

VOILLEY, N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Current Drug Targets for Inflammation and Allergy**, v. 3, p. 71-79, 2004.

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

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M. Fos expression in the medullary dorsal horn of the rat after chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **Journal of Comparative Neurology**, v. 357, p. 362-375, 1995.

WALKER, F. O.; HUNT, V. P. An open label trial of dextromethorphan in Huntington's disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 12, p. 322-330, 1989.

WALLACE, M. S.; QUESSY, S.; SCHULTEIS, G. Lack of effect of two oral sodium channel antagonists, lamotrigine and 4030W92, on intradermal capsaicin-induced hyperalgesia model. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 349-355, 2004.

WANG, S. J.; HUANG, C. C.; HSU, K. S.; TSAI, J. J.; GEAN, P. W. Inhibition of N-type calcium currents by lamotrigine in rat amygdalar neurones. **Neuroreport**, v. 7, p. 3037-40, 1996.

WANG, H.; LIU, R. J.; ZHANG, R. X.; QIAO, J. T. Peripheral NMDA receptors contribute to activation of nociceptors: a c-fos expression study in rats **Neuroscience Letters**, v. 221, p. 101-104, 1997.

WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 949-956, 2003.

WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.; DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience**, v. 101, p. 393-401, 2000.

WATSON, C.P.; CHIPMAN, M.; REED, K.; EVANS, R.J.; FJIRKCTT, N. Amitriptyline versus maprotiline in postherpetic neuralgia: a randomized, double-blind, crossover trial. **Pain**, v. 48, p. 29-36, 1992.

WESEMANN, W.; SONTAG, K. H.; MAJ, J. On the pharmacodynamics and pharmacokinetics of memantine. **Arzneimittelforschung**, v. 33, p. 1122-1134, 1983.

WINKELSTEIN, B. A. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v.14, p. 87-93, 2004.

WOOLF, C. J. Wind up and central sensitization are not equivalent. **Pain**, v. 66, p. 105-108, 1996.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiology of Disease**, v. 7, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**, v. 74, p. 2605-2610, 2004.

WOOLF, C. J.; DOUBELL, T. P. The pathophysiology of chronic pain—increased sensitivity to low threshold A $\beta$ -fibre inputs. **Current Opinion in Neurobiology**, v.4, p. 525-534, 1994.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

XIAO, H. S.; HUANG, Q. H.; ZHANG, F. X.; BAO, L.; LU, Y. J.; GUO, C.; YANG, L.; HUANG, W. J.; FU, G.; XU, S. H.; CHENG, X. P.; YAN, Q.; ZHU, Z. D.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; HAN, Z. G.; ZHANG, X. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 8360-8365, 2002.

XIE, W.; STRONG, J. A.; MEIJ, J. T. A.; ZHANG, J. M.; YU, L. Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. **Pain**, v. 116, p. 243-256, 2005.

YANG, L. C.; MARSALA, M.; YAKSH, T. L. Characterization of spinal cord aminoacids, citrulline and PGE<sub>2</sub> release after carragenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. **Pain**, v. 67, p. 345-354, 1996.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; SMITH, J. A.; SANGAMESWARAN, L.; EGLIN, R.; BIRCH, R. Increased acid-sensing ion channel ASIC-3 in inflamed human intestine. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. 891-896, 2001.

YASHPAL, K.; FISHER, K.; CHABOT, J. G.; CODERRE, T. J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, v. 94, p. 17-29, 2001.

YENARI, M. A.; BELL, T. E.; KOTAKE, A. N.; POWELL, M.; STEINBERG, G. K. Dose escalation safety and tolerance study of the competitive NMDA antagonist selfotel (CGS 19755) in neurosurgery patients. **Clinical Neuropharmacology**, v. 21, p. 28-34, 1998.

YONEHARA, N.; SHIBUTANI, T.; INOKI, R. Contribution of substance P to heat-induced edema in rat paw. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 242, p. 1071-1076, 1987.

YUDIN, Y.K.; TAMAROVA, Z.A.; OSTROVSKAYA, O. I.; MOROZ, L. L.; KRISHTAL, O. A. RfA-related peptides are algogenic: evidence in vitro and in vivo. **European Journal of Neuroscience**, v.20, p. 1419-1423, 2004.

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

ZAJAC, J. M.; LOMBARD, M. C.; PESCHANSKI, M.; BESSON, J. M.; ROQUES, B. P. Autoradiographic study of mu and delta opioid binding sites and neutral endopeptidase-24.11 on rat after dorsal root rhizotomy. **Brain Research**, v. 477, p. 400-403, 1989.

ZANCHET, E. M.; CURY, Y. Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by Phoneutria nigriventer venom. **European Journal of Pharmacology**, v. 467, p. 111-118, 2003.

ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, p. 1069-1075, 1997.

ZHANG, X.; BAO, L.; SHI, T. J.; JU, G.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 82, p. 223-240, 1998.

ZHANG, X.; DE ARAUJO, L.; ELDE, R.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HOKFELT, T. Effect of morphine on cholecystikinin and mu-opioid receptor-like immunoreactivities in rat spinal dorsal horn neurons after peripheral axotomy and inflammation. **Neuroscience**, v. 95, p. 197-207, 2000.

ZHOU, X.; POLGAR, P.; TAYLOR, L. Role for interleukin-1 $\beta$ , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B<sub>1</sub> receptor gene expression. **Biochemical Journal**, v. 330, p. 361–366, 1998.

ZOU, X.; LIN, Q.; WILLIS, D. Role of protein kinase A in phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. **Neuroscience**, v. 115, p. 775-786, 2002.

ZUO, Y.; PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J.; GECZY, C. L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v. 105, p. 467–479, 2003.