

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO



## **DOR OROFACIAL: MEDIADORES ENVOLVIDOS E CONTROLE FARMACOLÓGICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto  
Zampronio

CURITIBA

2002

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

# **DOR OROFACIAL: MEDIADORES ENVOLVIDOS E CONTROLE FARMACOLÓGICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto  
Zampronio

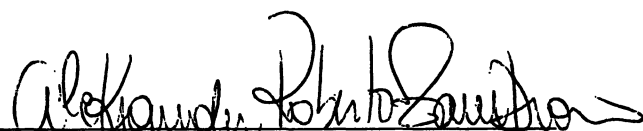
CURITIBA

2002




## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “DOR OROFACIAL: CONTROLE FARMACOLÓGICO E MEDIADORES ENVOLVIDOS”, de autoria da Pós-Graduanda JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, e composta pelos Professores Dr. Aleksander Roberto Zampronio (como orientador e Presidente); Dr. Igor Dimitri Gama Duarte (UFMG), Dr<sup>a</sup>. Berenice Borges Lorenzetti (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, nota A ( ); Prof. Dr Igor Dimitri Gama Duarte, nota A ( ); e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berenice Borges Lorenzetti, nota A ( ). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi Aprovada, com a nota A ( ). Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo orientador. Em Curitiba, 02 de agosto de 2002.

  
Dr. Aleksander Roberto Zampronio

  
Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

  
Dr<sup>a</sup>. Berenice Borges Lorenzetti

**O que sabemos é uma gota, o que não sabemos é um oceano.**

**Newton**

**Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Carlos e Nelci,  
pelo carinho e apoio em todas as minhas decisões.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, pela amizade, pela contribuição para o meu desenvolvimento pessoal e científico e pelo incentivo na busca do conhecimento.**

**A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berenice Borges Lorenzetti pelo seu carinho, ensinamentos e colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte pelas importantes sugestões .**

**A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Soares de Arruda pela sua disposição em dividir seus conhecimentos e experiências.**

**A todos os professores do Departamento de Farmacologia pela sua contribuição na minha formação.**

**A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Adriana e Silvia, por estarem sempre dispostos a ajudar.**

**Aos funcionários do Biotério, especialmente Candido e Luís, pela sua colaboração.**

**Aos animais pela sua significativa participação na realização deste trabalho.**

**Aos colegas do mestrado pelo companheirismo em todos os momentos.**

**Aos amigos do laboratório, Maria Fernanda , Renata, Caroline, Shirley, Melissa e Daniel pela amizade, pela alegria nos bons momentos e pela ajuda nos momentos mais difíceis.**

**Ao meu marido Gustavo, pelo companheirismo, incentivo e compreensão durante todo este período.**

**Aos meus irmãos, Rodrigo e Júnior pelo seu carinho, e Gian pelo seu constante apoio e incentivo.**

**A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	i
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 A DOR COMO UM SINAL DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA .....	1
1.2 DOR E NOCICEPÇÃO .....	1
1.3 DOR INFLAMATÓRIA .....	4
1.3.1 Principais mediadores da dor inflamatória .....	5
1.3.2 Controle da dor inflamatória .....	15
1.4 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	18
1.5 DOR OROFACIAL: Origem e Controle .....	20
1.5.1 O Nervo Trigêmio .....	20
1.5.2 Controle da dor orofacial .....	27
1.6 OBJETIVOS .....	30
1.6.1 Objetivo geral .....	30
1.6.2 Objetivos específicos .....	30
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
2.1 MATERIAIS .....	32
2.1.1 Animais .....	32
2.1.2 Drogas, doses e soluções .....	32
2.2 MÉTODOS .....	34
2.2.1 Teste de formalina : curva dose-resposta .....	34
2.2.2 Teste de formalina na pata .....	35

2.2.3 Tratamento dos animais com anti-inflamatórios não esteroidais, PGE <sub>2</sub> , e com um inibidor da 5-lipoxigenase .....	35
2.2.4 Tratamento dos animais com atenolol, guanetidina e tiramina .....	35
2.2.5 Tratamento dos animais com um inibidor da cininase II e antagonistas dos receptores de bradicinina .....	36
2.2.6 Tratamento dos animais com endotelina-1 e com antagonistas de receptores de endotelina .....	36
2.2.7 Tratamento dos animais com histamina e com um antagonista de receptores H1 histaminérgicos .....	36
2.2.8 Tratamento dos animais com citocinas e anticorpos .....	36
2.2.9 Tratamento dos animais com un antiinflamatório esteroidal .....	37
2.2.10 Tratamento dos animais com glutamato, com um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e com lamotrigina .....	37
2.2.11 Análise Estatística .....	37
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE FORMALINA NA DOR OROFACIAL ..	38
3.2 PARTICIPAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	41
3.3 PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	50
3.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	52
3.5 PARTICIPAÇÃO DA BRADICININA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	56
3.6 PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	60
3.7 PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	64

3.8 PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	67
3.9 EFEITO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM DEXAMETASONA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	77
3.10 PARTICIPAÇÃO DO GLUTAMATO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL.....	79
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE FORMALINA NA DOR OROFACIAL ..	83
4.2 PARTICIPAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	85
4.3 PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	89
4.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	90
4.5 PARTICIPAÇÃO DA BRADICININA NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	93
4.6 PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	95
4.7 PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	98
4.8 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	99
4.9 EFEITO DA DEXAMETASONA NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	103
4.10 PARTICIPAÇÃO DO GLUTAMATO NA DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS .....	104
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Esquema da cascata de liberação de mediadores para ativação do nociceptor.....	14
FIGURA 2 -	Representação esquemática do sistema sensorial trigeminal .....	22
FIGURA 3 -	Nervo trigêmio em humanos e suas ramificações: V <sub>1</sub> – divisão oftálmica, V <sub>2</sub> - divisão maxilar e V <sub>3</sub> – divisão mandibular .....	24
FIGURA 4 -	Nervo trigêmio em ratos e suas ramificações: V <sub>1</sub> – divisão oftálmica, V <sub>2</sub> - divisão maxilar e V <sub>3</sub> – divisão mandibular.....	25
TABELA 1 -	Alguns mediadores e seus receptores identificados no gânglio trigeminal e neurônios aferentes trigeminais primários.....	26
FIGURA 5 -	Curva temporal da resposta induzida pela administração local de diferentes concentrações de formalina.....	39
FIGURA 6 -	Curva dose-resposta induzida pela administração local de diferentes concentrações de formalina.....	40
FIGURA 7 -	Efeito da indometacina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	43
FIGURA 8 -	Efeito da indometacina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	44
FIGURA 9 -	Efeito da indometacina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina na pata.....	45
FIGURA 10 -	Efeito do meloxicam administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzido por formalina.....	46
FIGURA 11 -	Efeito do celecoxibe administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	47
FIGURA 12 -	Efeito do celecoxibe administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	48
FIGURA 13 -	Efeito da prostaglandina E <sub>2</sub> administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	49

FIGURA 14 - Efeito do Mk 886 administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	51
FIGURA 15 - Efeito do atenolol administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	53
FIGURA 16 - Efeito da guanetidina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	54
FIGURA 17 - Efeito da guanetidina administrada sistemicamente na potenciação da resposta nociceptiva à formalina pela administração local de tiramina .....	55
FIGURA 18 - Efeito do Captopril administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	57
FIGURA 19 - Efeito do HOE 140 administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	58
FIGURA 20 - Efeito do DALBK administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	59
FIGURA 21 - Efeito da ET-1 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	61
FIGURA 22 - Efeito do BQ123 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	62
FIGURA 23 - Efeito do BQ788 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	63
FIGURA 24 - Efeito da histamina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	65
FIGURA 25 - Efeito da meclisina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.....	66
FIGURA 26 - Efeito do TNF $\alpha$ administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	69
FIGURA 27 - Efeito do anticorpo anti-TNF $\alpha$ administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	70

FIGURA 28 - Efeito da IL-1 $\beta$ administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	71
FIGURA 29 - Efeito do antisoro anti- IL-1 $\beta$ administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	72
FIGURA 30 - Efeito da IL-6 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	73
FIGURA 31 - Efeito do antisoro anti-IL-6 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	74
FIGURA 32 - Efeito da IL-8 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	75
FIGURA 33 - Efeito do antisoro anti-IL-8 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	76
FIGURA 34 - Efeito da dexametasona administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	78
FIGURA 35 - Efeito do glutamato administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	80
FIGURA 36 - Efeito do AP-5 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	81
FIGURA 37 - Efeito da lamotrigina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina .....	82
TABELA 2 - Resultados obtidos nas fases I e II do teste de formalina orofacial .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIES – antiinflamatórios esteroidais
- AINES – antiinflamatórios não esteroidais
- AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi—5-metil-isoxazol
- AMPC – adenosina monofosfato cíclico
- AP-1 – proteína ativadora –1
- AP-5 – ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico
- ATP – adenosina trifosfato
- BK – bradicinina
- CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CINC – fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas
- COX 1– ciclooxigenase 1
- COX-2 – ciclooxigenase 2
- CRH – hormônio liberador de corticotropina
- DALBK – des-arg<sup>9</sup>-leu<sup>8</sup>-BK
- DGR – gânglio da raiz dorsal
- ET – endotelina
- GABA – ácido  $\gamma$  aminobutírico
- GMPc – guanosina monofosfato cíclico
- GRE – elemento de resposta à glicocorticóides
- IF $\kappa$ B – inibidor do fator  $\kappa$ B
- IL – interleucina
- LOX – lipoxigenase
- mGLU – receptores metabotrópicos de glutamato
- MIP – proteína inflamatória de macrófagos
- NF $\kappa$ B – fator nuclear  $\kappa$ B
- NGF – fator de crescimento neural
- NKA – neurocinina A
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- PAF – fator de agregação plaquetária
- PBS – solução salina tamponada com fosfatos

**PFPF – fator pirogênico pré-formado**

**PG – prostaglandina**

**PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>**

**PGE<sub>1</sub> – prostaglandina E<sub>1</sub>**

**PGF<sub>1α</sub> - prostaglandina F<sub>1α</sub>**

**PGH<sub>2</sub> - prostaglandina H<sub>2</sub>**

**PGI<sub>2</sub> – prostaciclina**

**RANTES – fator regulado pela ativação de células T normais, expresso e secretado**

**SNC – sistema nervoso central**

**SP – substância P**

**Sp5 – núcleo trigeminal espinhal**

**Sp5O – núcleo trigeminal espinhal oral**

**Sp5I – núcleo trigeminal espinhal interpolar**

**Sp5C – núcleo trigemina espinhal caudal**

**TNF $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$**

**TXA<sub>2</sub>– tromboxano A<sub>2</sub>**

## RESUMO

A região orofacial é freqüentemente acometida por dores agudas ou crônicas. No entanto, os mecanismos e mediadores envolvidos neste processo ainda são pouco entendidos. Isto pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao reduzido número de modelos animais destinados ao estudo das dores de origem trigeminal. O teste de formalina orofacial pode ser utilizado para a realização destes estudos. Neste teste, após a injeção de formalina diluída no lábio superior de ratos, a intensidade da dor pode ser medida através da análise de um único parâmetro: a fricção da área injetada. Esta resposta apresenta um perfil bifásico. A primeira fase reflete a ativação direta dos nociceptores pela formalina, enquanto que a segunda fase parece ser o resultado da resposta inflamatória induzida pela formalina. Utilizando o teste de formalina orofacial, o objetivo do nosso estudo foi avaliar mediadores que participam da primeira e da segunda fase desta resposta. Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar, pesando entre 160-240 g. Após um período de ambientação, os animais receberam uma injeção local de salina ou formalina (50 µl) e a resposta nociceptiva foi avaliada durante 30 minutos (0-3 min fase I e 12-30 min- fase II). A administração de formalina nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 3,75; e 5% induziram uma resposta nociceptiva dose-dependente nos animais. A dose de 0,625% foi selecionada para experimentos que visassem avaliar o efeito potenciador de drogas ou mediadores, enquanto que a dose de 2,5% foi utilizada para avaliar o efeito antinociceptivo das drogas. As drogas foram administradas por via s.c. para o tratamento local (50 µl) ou por via i.p ou s.c. para o tratamento sistêmico (1 ml/kg). Os dados aqui apresentados mostram % máxima de redução ou potenciação. O tratamento com o antagonista de receptores ET<sub>A</sub> de endotelina (BQ123, 1-10 nmol/50 µl), com o antagonista de receptores B<sub>2</sub> de bradicinina (BK) (HOE140, 0,1-10 mg/kg) ou com o antiinflamatório esteroidal (dexametasona, 0,5-2,0 mg/kg) reduziu as fases I (45, 67 e 66%) e II (49, 46 e 43%), respectivamente, da resposta induzida por formalina 2,5%. A fase I da resposta foi potenciada pelo tratamento dos animais com ET (endotelina)-1 (10 pmol, 94,3%). A fase II desta resposta foi reduzida pelo tratamento com os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) meloxicam (0,31-5 mg/kg, 55%) e celecoxibe (1-10 mg/kg, 51% ou 12,5-200 µg, 52%), com os agentes simpatolíticos atenolol, (6,25-100 µg, 56%) e guanetidina (30 mg/kg, 54%), com o antagonista de receptores B<sub>1</sub> de BK (DALBK, 0,5-2,0 µg/50 µl, 43%), com o antagonista de receptores H<sub>1</sub> de histamina (meclisina, 12,5-200 µg, 62%), com anticorpo anti-fator de necrose tumoral (TNF)-α (46%), e com antisoros anti-interleucina (IL)-1β (48%), anti-IL-6 (47%) anti-IL-8 (43%), com o antagonista de receptores NMDA (AP-5, 30-300 µg, 46%) e com o anticonvulsivante lamotrigina (3-30 mg/kg, i.p., 58,9%). Por outro lado, a fase II da resposta à formalina 0,625 % foi potenciada pelo tratamento com o inibidor da cininase II (captopril, 5 mg/kg, 87%), prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> (50 e 100 ng, 79%), tiramina (200 µg, 46%), ET-1 (10 pmol, 133%), histamina (250 µg, 95,8%) TNFα (1,25-5,0 pg, 72%), IL-1β (0,125-0,5 pg, 61%), IL-6 (1,0-2,0 ng, 84%) ou IL-8 (100 e 200 pg, 70%) e glutamato (100 nmol, 76,2%). O AINE (Indometacina, 2 e 4 mg/kg ou 100 e 300 µg/50 µl), o inibidor da 5-lipoxigenase (MK 886, 0,3-3,0 mg/kg) e o antagonista de receptores ET<sub>B</sub> de ET (BQ788, 3 e 10 nmol) não modificaram a resposta. Nossos resultados sugerem a participação da BK (via receptores B<sub>2</sub>) e endotelina (via receptores ET<sub>A</sub>), em ambas as fases, e de PGs, aminas simpatomiméticas, BK (via receptores B<sub>1</sub>), histamina, citocinas e glutamato na fase II da resposta à formalina orofacial.

## ABSTRACT

The orofacial region is frequently assaulted by chronic and acute pain. However, the mechanisms and mediators underlying these process are still poorly understood. This is partially due to the relative scarcity of experimental animal models available for the study of trigeminal pain. The orofacial formalin test can be used for this purpose. In this model, after an injection of diluted formalin into the upper lip of rats, the pain intensity can be evaluated by the analysis of single parameter, e.g. the rubbing of the injected area. This response shows a biphasic profile similar to that observed after injection of formalin into the hind paw. Even though several mediators have been implicated in the formalin-induced pain in the paw, there are only a few studies evaluating these mediators in the orofacial formalin model. The aim of this study was to evaluate some mediators involved in both phases of this response. The experiments were conducted using male Wistar rats weighting 160-240 g. After a short habituation period, animals received an injection of 50 $\mu$ l formalin at different concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 3.75, 5%) or saline and the nociceptive response was recorded at 3 min blocks up to 30 min. The injection of crescent concentrations of formalin induced a concentration related response. Formalin 0.625 was selected for experiments where an increase in the response was expected and formalin 2.5% was selected for experiments where antinociceptive drugs were used. Drugs were given by local s.c. injection (50 $\mu$ l) or systemically by i.p. or s.c. injection (1 ml/kg). Data show maximum percentage of reduction or potentiation. The treatment of animals with the endothelin ET<sub>A</sub> receptor antagonist (BQ123, 1-10 nmol), the bradykinin (BK) B<sub>2</sub> receptor antagonist (HOE140, 1-10 mg/kg), or with dexamethasone (0.5-2.0 mg/kg) reduced phases I (45, 67 and 66%) and II (49, 46 and 43%), respectively, of formalin-induced response. Local treatment of animals with endothelin (ET)-1 (10 pmol) resulted in a potentiation (94,3%) of phase I of the formalin-induced response. The phase II or formalin-induced response was reduced by the treatment of animals with NSAIDS like meloxicam (0.31-5 mg/kg, 55%) or celecoxib (1-10 mg/kg, 51%, or 12.5-100  $\mu$ g, 52%). This reduction was also observed when animals were treated with sympatolitic agents atenolol (6.25-100  $\mu$ g, 56%) or guanethidine (30 mg/kg, 54%), BK B<sub>1</sub> receptor antagonist (DALBK, 0.5-2  $\mu$ g, -43%), histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist (meclizine, 12.5-200  $\mu$ g, 62%), antibody against tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (46%), or antiserum against interleukin (IL)-1 $\beta$  (48%), IL-6 (47%) or IL-8 (43%), or with the NMDA receptor antagonist (AP-5, 30-300  $\mu$ g, 46%) On the other hand, phase II was potentiated by treatment with the cininase II inhibitor (captopril, 5 mg/kg, 87%), prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> (50 ng, 79%), tyramine (200  $\mu$ g, 46%), ET-1 (10 pmol, 133%), TNF $\alpha$  (1.25-5 pg, 72%), IL-1 $\beta$  (0.125-0,5 pg, 61%), IL-6 (1-2 ng, 84%) or IL-8 (100 and 200pg,70%). The NSAID Indomethacin, (2 and 4 mg/kg or 100 and 300  $\mu$ g), the 5-lipoxygenase inhibitor (MK 886, 0.3-3.0 mg/kg) and the endothelin ET<sub>B</sub> receptors antagonist (BQ788, 3 and 10 nmol) did not reduce the phase I or II of formalin-induced response. Our results suggest the participation of BK (via B<sub>2</sub> receptors) and ET (via ET<sub>A</sub> receptors) in both phases or formalin-induced response, and the participation of PGs (formed via COX-2), BK (via B<sub>1</sub> receptors), histamine, cytokines and glutamate (via NMDA receptors) in phase II of formalin-induced response. The partial inhibitory effect observed with dexamethasone indicates that pre-formed mediators have a role in formalin-induced orofacial pain.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A DOR COMO UM SINAL DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta do organismo a lesão ou destruição de um tecido que envolve eventos celulares e vasculares, orquestrados por múltiplos tipos de leucócitos, mediadores químicos e fatores de crescimento teciduais ou plasmáticos (WEAVER, 1995).

A inflamação aguda caracteriza-se por quatro sinais clássicos: dor, calor, rubor e tumor. Eventualmente um quinto sinal pode ser adicionado a estes, a perda da função do órgão ou tecido. Microscopicamente esses sinais envolvem uma complexa série de eventos que incluem dilatação de arteríolas, capilares e vênulas com aumento da permeabilidade e fluxo sanguíneo, exsudação de fluidos e migração de leucócitos para o foco inflamatório. Os eventos básicos desencadeados frente as respostas inflamatórias são iniciados pelo trauma (de origem mecânica, térmica ou química), que ocasiona ativação de células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias. Substâncias químicas são liberadas no foco inflamatório, sendo responsáveis pela série de eventos locais. Essas substâncias são conhecidas como mediadores químicos da inflamação e podem ter origem celular (histamina, eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF), neuropeptídeos, óxido nítrico e citocinas) ou plasmática (cininas, C5a, fibrinopeptídeos e fator XII ativado) (GALLIN et al., 1982).

Os macrófagos residentes podem ser considerados células de alarme pois, quando estimulados, liberam grande quantidade de substâncias ativas, dentre elas as citocinas, que funcionam como reguladores das ações inflamatórias e imunes (FERREIRA, 1980; FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; THOMAZZI et al., 1997).

### 1.2 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma "experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões".

Portanto a dor possui, dentre outros, um caráter subjetivo. Cada indivíduo aprende a utilizar este termo através de suas experiências. Este conceito não admite uma relação direta entre lesão tecidual e dor e enfatiza o aspecto da subjetividade na interpretação do fenômeno doloroso.

Enquanto que a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao sistema nervoso central (SNC) da existência da injúria. Portanto, dor seria o termo mais apropriado para o homem, enquanto que nocicepção seria mais indicado para animais experimentais (ALMEIDA, 1996).

Quase um século atrás, Sherrington propôs a existência de nociceptores, neurônios sensoriais primários que seriam ativados por estímulos nocivos (SHERRINGTON, 1906). De acordo com este modelo, os nociceptores teriam uma sensibilidade ou limiar característico que os distinguiria de outras fibras sensoriais nervosas. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos demonstraram a existência de neurônios sensoriais primários que são ativados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas que não respondem a estímulos inócuos (BURGESS e PERL, 1967).

Desta maneira, os nociceptores podem ser definidos como receptores sensoriais que são ativados por estímulos nocivos e, apresentam-se como terminações nervosas livres mielinizadas do tipo A $\delta$  e não mielinizadas do tipo C (MESSLINGER, 1997). Essas fibras nervosas apresentam velocidade de condução rápida (fibras A $\delta$ ) e lenta (fibras C). As fibras aferentes A $\delta$  respondem a estímulos mecânicos e térmicos, e as fibras aferentes do tipo C (polimodais) respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (WILLIS, 1985). Considera-se ainda que quando há um estímulo intenso duas sensações dolorosas diferentes ocorrem: uma breve e aguda, chamada "dor primária", transmitida por fibras A $\delta$ , seguida de uma sensação mais difusa e duradoura, conhecida como "dor secundária", transmitida por fibras C (BASBAUM e JESSEL, 2000).

A ativação dos nociceptores em resposta a estímulos nocivos leva a despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra. Canais de sódio regulados por voltagem controlam a excitabilidade neuronal e estão envolvidos na indução e propagação dos potenciais de ação (WOOLF e

SALTER, 2000). A despolarização se propaga ao longo de toda fibra alcançando o corno dorsal da medula espinhal, que constitui importante estação relé para a transmissão da dor. Os nociceptores terminam de uma maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinhal, com as finas fibras mielinizadas A $\delta$  terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II. Essas fibras sensoriais de alto limiar ativam um grande número de interneurônios de segunda ordem e neurônios de projeção na medula espinhal, alguns deles são ativados exclusivamente por estímulos nocivos (nociceptivos específicos) e outros são ativados por estímulos de alta ou baixa intensidade (limiar dinâmico e amplo). O impulso originado nas fibras aferentes primárias no local da injúria causa a liberação de vesículas, ao nível da primeira sinapse do corno dorsal, contendo neuropeptídeos, como substância P e glutamato, os quais são responsáveis pela produção de potenciais sinápticos excitatórios. O glutamato pode atuar através da ativação de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e de receptores metabotrópicos (mGLUR1 a mGLUR8). A ativação de receptores NMDA nos neurônios do corno dorsal da medula parece ter importante participação no desenvolvimento da sensibilização central e hiperalgesia (MELLER e GEBHART, 1993, WOOLF, 1994). Existem evidências de que os receptores AMPA e cainato também estejam envolvidos na transmissão da informação nociceptiva (CARLTON, 2001). Quanto aos receptores metabotrópicos de glutamato, tem sido demonstrado que a ativação de alguns destes receptores leva a liberação espinhal de glutamato, o que contribui para um aumento da atividade pós sináptica dos receptores NMDA no corno dorsal da medula (FISHER e CODERRE, 1996).

Após a integração da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal, ela é conduzida via neurônios de projeção para centros cerebrais superiores (BESSON e CHAOUCH, 1987). Apesar da complexidade das vias ascendentes da dor, neuroanatomicamente elas podem ser divididas em: vias monosinápticas e polisinápticas. As vias monosinápticas projetam-se diretamente para os centros cerebrais superiores e incluem o trato espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinotalâmico e espinoreticular. As vias polisinápticas possuem uma estação relé de neurônios de segunda ordem antes de se projetarem aos centros cerebrais superiores. As duas principais vias polisinápticas são o trato espinocervical e o trato da coluna dorsal pós-sináptica (MILLAN, 1999).

Com relação a modulação da informação nociceptiva, estudos neurofisiológicos realizados na década de 60 demonstraram que a estimulação de fibras aferentes primárias, mielinizadas e de baixo limiar reduzem a resposta dos neurônios do corno dorsal aos nociceptores não mielinizados, enquanto que o bloqueio da condução nas fibras mielinizadas aumentavam a resposta dos neurônios do corno dorsal. A partir dessa idéia foi introduzida a teoria de controle do portão. De acordo com essa teoria, os neurônios envolvidos na modificação dos impulsos dos neurônios do corno dorsal compreendem as fibras de baixo limiar  $A\alpha/A\beta$ , fibras C, neurônios de projeção do corno dorsal que organizam e distribuem os sinais para o cérebro, e interneurônios inibitórios, os quais inibem os neurônios de projeção. Os neurônios de projeção são diretamente ativados por ambas as fibras de baixo limiar, mielinizadas e não-mielinizadas. A diferença crucial nos impulsos dessas duas classes de fibras aferentes é que as fibras mielinizadas também ativam os interneurônios inibitórios, enquanto que as fibras não mielinizadas suprimem sua atividade. Deste modo, quando fibras mielinizadas de baixo limiar são ativadas, a atividade dos neurônios de projeção e a percepção da dor fica reduzida (MELZACK e WALL, 1965).

A transmissão nociceptiva ao nível espinhal ainda está sujeita a regulação por neurônios descendentes originados de diversos centros cerebrais. Os corpos neuronais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos incluindo núcleo magno da rafe, rafe dorsal, núcleo reticular paragigantocelular, loco cerúleo, substância cinzenta periaquedutal, formação reticular mesencefálica, hipotálamo e córtex somatossensorial. Tais fibras liberam diversos neurotransmissores inibitórios incluindo serotonina, dopamina, noradrenalina, peptídeos opióides e GABA (ácido  $\gamma$  aminobutírico) (HAMMOND, 1986; MALCANGIO e BOWERY, 1996).

### 1.3 DOR INFLAMATÓRIA

A dor inflamatória inicia com a injúria tecidual e conseqüente inflamação e se caracteriza pela mudança na sensibilidade de transdução dos nociceptores no local da injúria e nos tecidos normais adjacentes (WOOLF, 1994). A resposta inflamatória provoca inicialmente uma mudança local na sensibilidade das fibras sensoriais, um

fenômeno conhecido como sensibilização periférica (HANDWERKER e REEH, 1991). Esta sensibilização, ou hiperalgesia, é conseqüência da exposição dos terminais nociceptivos a agentes sensibilizantes que levam a um aumento na excitabilidade da membrana do nociceptor e conseqüente redução da despolarização necessária para iniciar um potencial de ação. Existe uma latência entre a injúria tecidual e o estabelecimento da dor inflamatória, o que sugere que o estímulo nocivo desencadeie a liberação de mediadores os quais podem ativar diretamente os referidos nociceptores, como por exemplo a histamina e a bradicinina (BK) ou sensibilizar os mesmos como as prostaglandinas (PGs) e as aminas simpatomiméticas (noradrenalina e dopamina). A sensibilização dos nociceptores envolve a ativação da enzima adenilato ciclase com conseqüente aumento nos níveis intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) (LORENZETTI e FERREIRA, 1981; FERREIRA E NAKAMURA, 1979a).

A idéia que prevalece atualmente é que a hiperalgesia não resulta apenas da sensibilização dos neurônios sensoriais primários associados aos nociceptores polimodais de alto limiar, mas também da ativação de nociceptores denominados "silenciosos". Estes nociceptores tornam-se responsivos somente quando sensibilizados pelos mediadores liberados após a injúria tecidual (SCHAIBLE e SCHIMIDT, 1988, MACMAHON, 1990).

Duas zonas de hiperalgesia podem ser caracterizadas após o dano tecidual: a hiperalgesia primária, que resulta da mudança na sensibilidade dos nociceptores periféricos e conseqüente aumento na sensibilidade dolorosa em resposta a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, e a zona de hiperalgesia secundária que depende inicialmente da atividade neural originada no local da injúria e propagação dos potenciais de ação através de outros ramos das fibras aferentes levando a sensibilização de neurônios centrais (CAMPBELL et al., 1988; RAJA et al., 1984).

### 1.3.1 Principais mediadores da dor inflamatória

Na dor inflamatória, a sensibilidade dos nociceptores pode ser modificada por uma combinação de mediadores inflamatórios e químicos, os quais são liberados

após a injúria tecidual, e atuam sinergicamente ativando ou sensibilizando esses nociceptores (RANG et al., 1991; TREEDE et al., 1992).

As evidências de que uma substância era liberada das células da pele por diversos estímulos lesivos, e até mesmo pela reação de um antígeno com um anticorpo (LEWIS, 1927) levaram a identificação de um dos principais mediadores químicos da fase inicial da resposta inflamatória, a histamina. Esta amina é estocada nos grânulos dos mastócitos e liberada por vários agentes físicos e inúmeros mediadores como substância P (SP), interleucina 1 (IL-1) e fator de crescimento neural (NGF) (BEVAN, 1982; HILL, 1990; SCHWARTZ et al., 1991). Juntamente com a histamina, os mastócitos também podem liberar serotonina, porém somente em roedores (GRAZIANO, 1988), sendo que a fonte de serotonina em humanos são as plaquetas (PAGE, 1989). A histamina e a serotonina são capazes de excitar certas populações de fibras aferentes polimodais (fibras C) que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (HANDWERKER, 1991).

Mais tarde, demonstrou-se que a histamina também era capaz de induzir respostas nociceptivas quando injetada na pata de ratos (CARSTENS, 1997). As suspeitas iniciais de que a histamina atuaria sobre mais de um receptor se confirmaram e atualmente sabe-se que existem pelo menos três classes distintas de receptores para histamina, denominadas H1 (ASH e SCHILD, 1966), H2 (BLACK et al., 1972) e H3 (ARRANG et al., 1987).

Pelo fato do NGF estar implicado na degranulação dos mastócitos, é possível que a histamina e a serotonina liberadas dessas células estejam envolvidas nas respostas nociceptivas mediada pelo NGF. O NGF estimula a síntese de neuropeptídeos como SP e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) no gânglio da raiz dorsal (DRG) (LINDSAY e HARMAR, 1989; GOEDERT et al., 1981).

Um outro mediador possivelmente envolvido na fase inicial da resposta nociceptiva é a SP. Essa substância faz parte de uma família de peptídeos denominados taquicininas. Desta família, SP e neurocinina A (NKA) são codificadas a partir de um mesmo precursor e apresentam o mesmo padrão de distribuição (HELKE et al., 1990; MARKSTEINER et al., 1992). A SP e a NKA atuam via receptores NK1 e NK2, respectivamente. As evidências de que esses receptores estejam envolvidos na mediação da estimulação nociva prolongada (GARRET et al., 1991; CHAPMAN e DICKENSON, 1993) são particularmente importantes na

subpopulação de neurônios aferentes primários onde SP (e NKA) coexistem com o glutamato, pois a ação desses transmissores nos receptores NMDA do corno dorsal contribuem para o fenômeno de facilitação central (BATTAGLIA e RUSTIONI, 1988; CUELLO et al., 1993).

Estudos recentes têm demonstrado que receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e não NMDA também participam da modulação da informação nociceptiva na periferia (LAWAND et al., 1997; WANG et al., 2000). A injeção intraplantar de antagonistas de receptores NMDA reduz significativamente a resposta à formalina na pata, indicando a presença destes receptores periféricamente (DAVIDSON e CARLTON, 1998).

Assim como a SP, o CGRP também participa da inflamação neurogênica. O CGRP é sintetizado e estocado em alguns neurônios sensoriais e pode ser liberado tanto em suas terminações periféricas como centrais (MARTLING et al., 1988). O CGRP é liberado pelos terminais das fibras C, após estimulação ou sensibilização desses terminais pelos autacóides que são liberados após a injúria tecidual. Os efeitos do CGRP durante a inflamação neurogênica sugerem que essa ativação local pode ter importante função não apenas para prover a informação aferente necessária para a geração de respostas mediadas centralmente, mas também para prover uma regulação trófica local (HUA e YAKSH, 1993). Sugere-se que o efeito fisiológico mais importante do CGRP seja sua ação vasodilatadora, que resulta em um aumento da permeabilidade vascular e no exsudato de proteínas, como albumina e cininogênios (BUCKLEY et al., 1991a,b).

Outros importantes mediadores envolvidos na dor inflamatória são as endotelinas (YANAGISAWA et al., 1988). A isoforma ET-1 (endotelina-1) foi a primeira a ser identificada. Inicialmente, a ET-1 foi reconhecida pela sua potente atividade vasoconstritora. Estudos posteriores revelaram que a ET-1 produzia uma grande diversidade de efeitos em várias células e tecidos, e possuía função patofisiológica em várias doenças (MASAKI et al., 1992).

As endotelinas são peptídeos de 21 aminoácidos com ampla distribuição no SNC e periférico, representadas por três famílias biologicamente ativas: ET-1, ET-2 e ET-3 (MASAKI et al., 1992). Elas estão expressas e são secretadas por vários tipos celulares, como por exemplo, células endoteliais (YANAGISAWA et al., 1988), macrófagos (EHRENREICH, et al., 1990), astrócitos (MACCUMBER et al., 1990) e

neurônios (GIAID et al., 1989) As endotelinas atuam através da estimulação de pelo menos dois receptores específicos : ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. O receptor ET<sub>A</sub> possui alta afinidade pela isoforma ET-1 em comparação a isoforma ET-3, por outro lado, o receptor ET<sub>B</sub> possui afinidade igual para as isoformas ET-1 e ET-3 (MASAKI et al., 1992). Tem sido demonstrado que a isoforma ET-1 possui várias propriedades pró-inflamatórias, como por exemplo: aumento da permeabilidade vascular (FILEP et al., 1995); ativação e recrutamento de leucócitos via aumento da expressão de moléculas de adesão (ISHIDA et al., 1990); liberação de citocinas (STANKOVA et al., 1996) e degranulação de mastócitos (YAMAMURA et al., 1994). Em adição, estudos recentes sugerem a participação da ET-1 na nocicepção. PIOVESAN et al.(1997, 1998) demonstraram o envolvimento da ET-1 na nocicepção induzida por formalina e capsaicina em camundongos.

Dentre os mediadores da dor inflamatória, a bradicinina (BK) é considerada um dos mais potentes ativadores dos nociceptores. A BK foi identificada em 1949 por ROCHA e SILVA et al., a partir de observações da existência de uma nova substância relaxante liberada no plasma pela ação do veneno da *Bothrops jararaca*. Desde então, tem sido demonstrado o envolvimento da BK e peptídeos relacionados em diversos processos fisiológicos como controle da pressão arterial, contração e relaxamento da musculatura lisa, respostas inflamatórias e indução de dor e hiperalgesia (revisado por CALIXTO et al., 2000).

A BK e seu metabólito ativo des-Arg BK, são rapidamente geradas no local da injúria tecidual ou infecção, onde induzem uma variedade de efeitos pró-inflamatórios através da ativação de receptores específicos B<sub>2</sub> ou B<sub>1</sub>. A estimulação dos receptores B<sub>2</sub> nos tecidos periféricos parecem induzir quase todos os eventos da inflamação aguda, como vasodilatação, formação de edema e dor (BHOOLA et al., 1992; HALL, 1982; DRAY e PERKINS, 1993). Além disso, a estimulação dos receptores B<sub>2</sub> está relacionada a indução e liberação de um grande número de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos, entre eles, neuropeptídeos, óxido nítrico, aminoácidos excitatórios e metabólitos do ácido araquidônico (WALKER et al., 1995). Enquanto os receptores B<sub>2</sub> estão expressos constitutivamente na maioria dos tecidos, a expressão do receptor B<sub>1</sub> é mais limitada. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que durante a inflamação crônica a ativação e expressão do receptor B<sub>1</sub> está aumentada (REGOLI et al., 1986; HALL, 1982; PERKINS et al., 1993; DAVIS

e PERKINS, 1994; PERKINS E KELLY, 1994) e estudos mais recentes sugerem a participação de ambos os receptores na hiperalgesia inflamatória (POOLE et al., 1999).

A BK tem duas funções no desenvolvimento da dor inflamatória: ativação e sensibilização dos nociceptores. A ativação dos nociceptores causa dor declarada e imediata, enquanto que a sensibilização é responsável pelo desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. A BK parece contribuir para a hiperalgesia inflamatória pela liberação de PGs e aminas simpatomiméticas via liberação de citocinas hiperalgésicas (FERREIRA et al., 1993; TONUSSI E FERREIRA, 1997).

Com relação às PGs, o primeiro registro destes autacóides na literatura data de 1913, quando BATTEZ e BOULET demonstraram que a injeção intravenosa de extrato prostático humano, em cães, provocava hipertensão. No entanto, este material ativo só foi identificado anos mais tarde por EULER (revisado por EULER, 1973). O maior interesse sobre as PGs teve início a partir de 1960 quando BERGSTRÖM e SJÖVAL extraíram da vesícula seminal do carneiro dois compostos cristalinos ativos: prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) e prostaglandina F<sub>1α</sub> (PGF<sub>1α</sub>) (revisado por BERGSTRÖM e SAMUELSSON, 1968). Quatro anos mais tarde BERGSTRÖM et al. e VON DORP et al. conseguiram, independentemente, a biossíntese da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) a partir do ácido araquidônico, utilizando homogenatos da vesícula seminal de carneiro (revisado por SAMUELSSON, 1972). A percepção de que as PGs constituíam apenas uma pequena fração dos produtos fisiologicamente ativos do metabolismo do ácido araquidônico resultou na descoberta do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (HAMBERG et al., 1975), da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (MONCADA et al., 1976) e dos leucotrienos (SAMUELSSON, 1983).

Nos seres humanos, o ácido araquidônico é o precursor mais abundante das PGs e dos leucotrienos. Ele é clivado a partir dos fosfolípidios das membranas celulares pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> e da fosfolipase C ativadas por uma variedade de mediadores intercelulares e intracelulares (AXELROD et al., 1988). Uma vez livre, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias: a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase. Entre os produtos da via da lipoxigenase, o leucotrieno B<sub>4</sub> parece estar envolvido na patogênese de uma ampla variedade de doenças inflamatórias (LEWIS et al., 1990). O leucotrieno B<sub>4</sub> é um potente agente quimiotático para neutrófilos (FORD-HUTCHINSON et al., 1980) e causa hiperalgesia, de

maneira indireta, em várias espécies, inclusive ratos e humanos através da diminuição do limiar de ativação das fibras C (LEVINE et al., 1984; BISGAARD e KRISTENSEN, 1985; MARTIN et al., 1987). O leucotrieno B<sub>4</sub> ainda parece estar envolvido na sensibilização das fibras intra-pulpares A $\delta$  (MADISON et al., 1992) e na hiperalgesia induzida por NGF (AMANN et al., 1996). Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> medeiam reações inflamatórias por induzirem alterações no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular (FORD- HUTCHINSON, 1985; DAHLÉN et al., 1981). Esses leucotrienos também têm sido associados com a patofisiologia da asma (CHANARIN e JOHNSTON, 1994).

Quando o ácido araquidônico sofre a ação da enzima ciclooxygenase (COX), ele é transformado em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), que através da ação de isomerasas, prostaciclina sintetase e tromboxanas sintetase, origina as PGs, PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>, respectivamente. Duas isoformas da enzima COX foram identificadas, COX-1 e COX-2. Após a identificação de uma segunda isoforma, a COX-1 foi considerada a enzima constitutiva, responsável pela produção fisiológica das PGs, e portanto pelos seus efeitos benéficos em tecidos como estômago, ovários, plaquetas e rins. Já a COX-2, foi considerada a enzima induzida por uma variedade de agentes incluindo citocinas e fatores de crescimento e, portanto, responsável pela produção patológica de PGs em condições inflamatórias (VANE et al., 1998). No entanto, existem várias evidências que demonstram a expressão constitutiva da enzima COX-2 em vários órgãos e tecidos, como rins, ovário, útero, medula espinhal e SNC. Então, a supressão da enzima COX-2 com inibidores seletivos não pode ser associada com a ausência de efeitos colaterais. Além disso, existem evidências que a enzima COX-1 contribui para a inflamação e dor, portanto a inibição seletiva da COX-2 não possui necessariamente a mesma eficácia da inibição não seletiva de ambas as enzimas (WALLACE, 1999).

A capacidade das PGs de sensibilizarem diretamente os neurônios aferentes primários foi intensamente estudada em modelos experimentais utilizando-se técnicas comportamentais (FERREIRA et al., 1978; FERREIRA et al., 1990). As PGs, principalmente PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, são capazes de causar hiperalgesia quando administradas em patas de ratos (FERREIRA et al., 1978a) e sua liberação pode ocorrer mediante a aplicação de diferentes estímulos nocivos, como por exemplo, a administração subcutânea de formalina na pata (MALMBERG e YAKSH, 1995 a,b;

MUTH-SELBACH et al., 1999). As PGs, quando liberadas, desencadeiam uma série de eventos que incluem alterações nas correntes das membranas celulares e indução da liberação de diversos mediadores. A PGE<sub>2</sub> quando liberada produz uma diminuição no limiar de ativação dos canais de sódio tetrodotoxina-resistentes, aumentando assim o número de potenciais de ação por estímulo gerados nas fibras nociceptivas primárias. A PGE<sub>2</sub> atua ainda inibindo as correntes de potássio, causando diminuição no limiar de disparos e novamente aumento no número de potenciais de ação por estímulo (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998; NICOL et al., 1997). Finalmente, a liberação de PGE<sub>2</sub> causa um aumento do influxo de cálcio por atuar em canais de cálcio voltagem-dependente, causando a liberação de vários mediadores como glutamato, aspartato, SP e CGRP (NISHIHARA et al., 1995; NICOL et al., 1992; VASKO., 1995). Os efeitos diretos das PGs nos aferentes nociceptivos e na medula espinhal e suas ações como adjuvantes de outros agentes como BK resultam em um aumento na transmissão dos sinais nociceptivos assim como na sua transmissão sináptica na medula espinhal.

Além das PGs, NAKAMURA e FERREIRA (1987) demonstraram que agonistas adrenérgicos (noradrenalina, adrenalina e dopamina) ou aminas simpatomiméticas de ação indireta (como a tiramina) também são capazes de induzir hiperalgesia. Em adição, esses mesmos autores demonstraram a eficácia do tratamento com antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos ou antagonistas de receptores dopaminérgicos DA-1 em reduzir a hiperalgesia induzida pela administração de um estímulo inflamatório como a carragenina, demonstrando a participação de um componente simpático nesse processo. Posteriormente, a participação do componente simpático também foi demonstrada utilizando a metodologia de contorções abdominais induzidas por ácido acético (DUARTE et al., 1988).

Embora a ativação de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  no sistema nervoso central produza analgesia e/ou antinocicepção em diversos modelos animais de dor (PETROVAARA, 1993), inclusive no teste da formalina (MASTRIANNI et al., 1989), e que este mecanismo possa produzir analgesia em humanos (KUNOS et al., 1987; PETROVAARA, 1993), a ativação dos mecanismos adrenérgicos na periferia parece ser pro-nociceptivo. O tratamento com simpatolíticos produz alívio da dor e da hiperalgesia em diversos modelos animais (LEVINE et al., 1986; CODERRE et al., 1984 a; CODERRE et al., 1984b). No teste de formalina na pata a administração local

de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, como a fentolamina, causa redução da resposta nociceptiva (HONG e ABBOTT, 1996). Em humanos, os efeitos mais significativos do tratamento com estes agentes são observados em estados de dor crônica que envolvem hiperpatia e exacerbação por estresse (RAJA et al., 1991; MCMAHON, 1991; GHOSTINE et al., 1984; HANNINGTON-KIFF, 1974; TREEDE et al., 1992). A administração de noradrenalina no tecido normal (não inflamado) não produz dor ou hiperalgesia mecânica. No entanto, quando agonistas adrenérgicos são administrados em tecidos inflamados ou em locais de lesão nervosa crônica são capazes de induzir dor e hiperalgesia mecânica (ABBOTT et al., 1996, DAVIS et al., 1994).

A contribuição relativa dos componentes de cada uma das vias hiperalgélicas (PGs ou aminas simpatomiméticas) parece depender das características do estímulo nocivo (FERREIRA, 1972; HANNINGTON – KIFF, 1974; NAKAMURA e FERREIRA, 1987) e a liberação de ambos ocorre subsequente à liberação de citocinas, como IL-1 $\beta$  e IL-8, respectivamente (CUNHA et al., 1991).

A presença de um antígeno nos tecidos ou de uma lesão tissular provoca uma resposta precoce considerada uma reação de alarme em que há liberação de citocinas. Neste contexto, as citocinas parecem constituir um elo entre a injúria celular ou o reconhecimento de antígenos e a liberação de mediadores responsáveis pelo desenvolvimento de sinais e sintomas locais e sistêmicos, inclusive a dor, liberando os componentes PG e simpático da hiperalgesia (CUNHA et al., 1992).

Em 1993, FERREIRA et al. sugeriram que a hiperalgesia induzida por BK é mediada por TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), uma vez que a hiperalgesia induzida por BK foi abolida pelo tratamento com antisoro anti-TNF $\alpha$ , enquanto que a hiperalgesia induzida por TNF $\alpha$  não foi inibida pelo antagonistas de receptores B<sub>2</sub> de BK, HOE 140.

Uma propriedade do TNF $\alpha$  e de diversas outras citocinas é sua capacidade de induzir sua própria produção e a produção de outras citocinas. Assim, demonstrou-se que o TNF $\alpha$  induz a produção de IL-1 (DINARELLO et al., 1987), e por sua vez, a IL-1 induz a produção de IL-1 (DINARELLO et al., 1987), IL-6 (VAN DAMME et al., 1987), e IL-8 (STREITER et al., 1989). Tem sido demonstrado ainda,

que a IL-1 estimula a síntese de PGs em vários tipos celulares (MIZEL et al., 1983; ROSSI et al., 1985; CHANG et al., 1986).

De acordo com esta seqüência de liberação de citocinas, sugere-se que o TNF $\alpha$  represente a primeira citocina hiperalgésica liberada, portanto considerada citocina pivô na cascata de liberação dos mediadores inflamatórios, uma vez que estimula a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais estimulam a geração dos produtos da COX, e/ou a liberação de IL-8 que estimula a liberação dos mediadores simpatomiméticos (CUNHA et al, 1992; FERREIRA et al., 1993). Esta seqüência de mediadores proposta por CUNHA et al. (1992) e FERREIRA et al. (1993) está esquematizada na Figura 1.

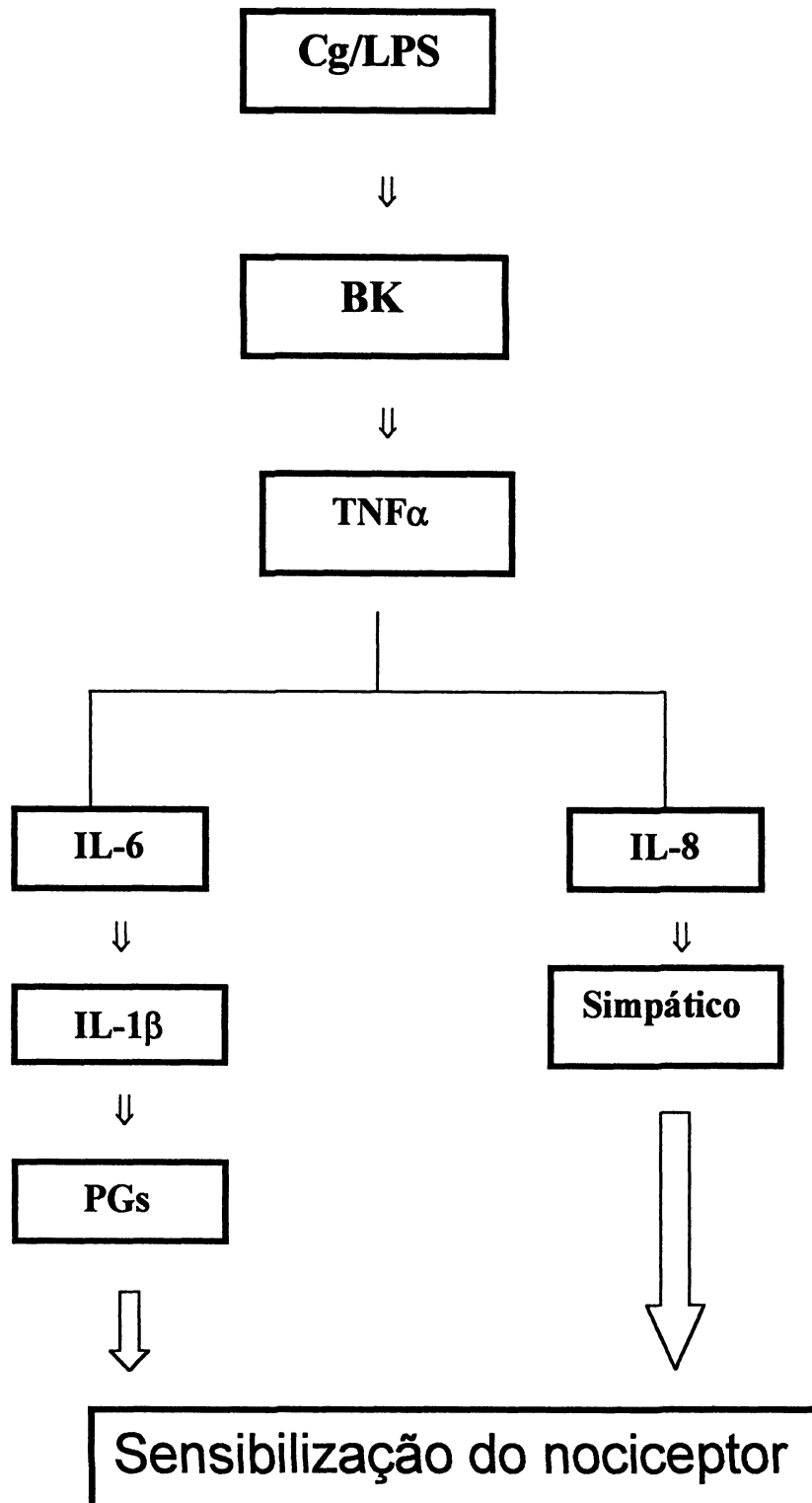


Figura 1 - Esquema da cascata de liberação de mediadores para a ativação do nociceptor. Cg = carragenina, LPS = lipopolissacarídeo, BK = bradicina, TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral  $\alpha$ , IL-6 = interleucina 6, IL-8 = interleucina 8, IL-1 $\beta$  = interleucina 1 $\beta$ , PGs = prostaglandinas.

### 1.3.2. Controle da dor Inflamatória

Uma das classes de drogas mais utilizadas para o controle da dor inflamatória é representada pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). Sugere-se que os efeitos analgésico e anti-inflamatório dos AINES resultam, pelo menos em parte, da supressão da síntese de PGs devido à inibição da enzima COX (FU et al., 1990). Em 1971, VANE et al. demonstraram que baixas concentrações de aspirina e indometacina inibiam a produção enzimática de PGs. Posteriormente, FERREIRA et al. (1978b), demonstraram que as PGs eram os principais mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores no processo inflamatório, e sua hipótese inicial de que drogas como a aspirina previnem a sensibilização do nociceptor por inibição da síntese das PGs é amplamente aceita.

A identificação molecular de uma segunda isoforma da enzima COX (COX-2) foi o passo determinante para que as companhias farmacêuticas investissem no desenvolvimento de drogas que bloqueiam a atividade da COX-2 sem afetar a atividade da COX-1. As drogas consideradas inibidoras da COX-2 podem também inibir a COX-1, porém com uma afinidade menor. O meloxicam, testado em diferentes metodologias, apresenta potência de 3 a 77 vezes maior para a inibição da COX-2 em relação a COX-1, sendo considerado um inibidor preferencial da COX-2. No início de 1999 foi introduzido no mercado farmacêutico o primeiro inibidor "altamente seletivo" para COX-2, o celecoxibe, e em junho do mesmo ano foi lançado o rofecoxibe. Estas drogas são consideradas inibidores específicos para COX-2, sendo que o celecoxibe é 375 vezes e o rofecoxibe mais de 800 vezes mais potente para inibir a COX-2 em relação a COX-1 (baseado em ensaios de enzima recombinante humana) (VANE et al., 1998; HAWKEY, 1999).

Ainda com relação aos AINES, uma alternativa que tem sido utilizada para reduzir as reações adversas por eles causadas e aumentar sua atividade anti-inflamatória é o desenvolvimento de inibidores seletivos de COX-2 associados a inibidores da 5-lipoxigenase (5-LOX). Os inibidores duplos (COX/5-LOX) que têm sido testados em ratos e camundongos demonstraram efeitos anti-inflamatórios superiores aos da indometacina sem apresentar efeitos ulcerogênicos ( INAGAKI et al., 2000; HORIZOE et al., 1998).

Os glicocorticóides, como a dexametasona, também são importantes agentes anti-inflamatórios que têm sido utilizados desde a década de 40 (BARANIUK, 1996). Com relação à dor inflamatória, a dexametasona previne o desenvolvimento da hiperalgesia através da inibição da síntese de citocinas (BARTON et al., 1991), PGs e outros eicosanóides (HIRATA et al., 1980; BLACKWELL et al., 1980). Apenas recentemente os mecanismos de ação dos glicocorticóides foram esclarecidos. Os glicocorticóides, devido a sua natureza lipofílica, cruzam a membrana plasmática das células e ligam-se aos seus receptores citoplasmáticos, ativando-os. O complexo glicocorticóide-receptor ativado desloca-se até o núcleo celular para ativar a repressão ou a transcrição de genes alvo que contém elementos responsivos a glicocorticóides (GRE) em seus promotores. Os glicocorticóides induzem a transcrição de diversas proteínas, dentre elas, a lipocortina (BARANIUK, 1996). A lipocortina-1 é uma proteína considerada o mediador endógeno potencial das ações antiinflamatórias dos glicocorticóides (FLOWER e ROTHWELL, 1994). A lipocortina inibe a enzima fosfolipase A2, prevenindo a geração de ácido araquidônico, o precursor das PGs, tromboxanos e produtos da lipoxigenase (FLOWER e BLACKWELL, 1979). Outro mecanismo que explica os intensos efeitos anti-inflamatório e anti-hiperalgésico destas drogas está relacionado a sua capacidade de estimular a produção do inibidor do fator  $\kappa$ B (IF $\kappa$ B). O IF $\kappa$ B é uma proteína que se encontra ligada, no citoplasma de diversas células, ao NF $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B), um fator de transcrição responsável pela indução de diversas citocinas, de receptores inflamatórios (como o receptor B<sub>1</sub> de BK) e de enzimas inflamatórias (como a enzima COX-2) (AUPHAN et al., 1995; SCHEINMAN et al., 1995; CAMPOS et al., 1999). Após a ativação da célula, por citocinas pró-inflamatórias por exemplo, o IF $\kappa$ B é fosforilado, por quinases específicas, deixando o NF $\kappa$ B livre para se deslocar até o núcleo celular e ativar a transcrição de genes alvo. Além do NF $\kappa$ B, a expressão de diversos mediadores inflamatórios é regulada por uma outra família de fatores de transcrição (proteína ativadora -1, AP-1) que pode atuar sinergisticamente com o NF $\kappa$ B. O complexo glicocorticóide/receptor ativado pode interagir diretamente com o AP-1 ativado. Esta interação leva a inativação mútua dos complexos e o AP-1 perde seus efeitos transcripcionais (STEIN et al., 1993; BARANIUK, 1996). Como na maioria dos promotores de genes de proteínas

inflamatórias, GRES negativos não tem sido identificados, o mecanismo de interação direta entre o receptor de glicocorticóide ativado e fatores de transcrição, como AP-1 e NF $\kappa$ B parece ser mais importante que a indução da síntese do IF $\kappa$ B. Além disso, foi demonstrado que a indução do aumento da síntese de IF $\kappa$ B pelos glicocorticóides não é um mecanismo que ocorre em todos os tipos celulares (revisado por BOSSCHER et al., 2000).

Outro grupo de drogas que atua prevenindo o desenvolvimento da hiperalgesia são os agentes simpatolíticos e inibidores da liberação das aminas simpatomiméticas (guanetidina), através do bloqueio do componente simpático da hiperalgesia inflamatória. A eficácia clínica destas drogas parece estar restrita a algumas situações, possivelmente onde há uma participação predominante do componente simpático da hiperalgesia em relação ao componente PG, como por exemplo, na dor e hiperalgesia resultantes da lesão de fibras nervosas (revisado por FERREIRA, 1993).

Estudos experimentais utilizando metodologias de dor inflamatória demonstram que antagonistas de receptores de BK, antagonistas de receptores de endotelinas e bloqueadores de citocinas, embora ainda não estejam disponíveis para utilização clínica, representam instrumentos importantes para o controle da dor. Os antagonistas de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de BK têm se mostrado efetivos em modelos de hiperalgesia inflamatória (POOLE et al., 1999) e dor inflamatória aguda e crônica (CORRÊA e CALIXTO, 1993; SUFKA e ROACH, 1996) e os antagonistas de receptores de endotelina são capazes de interferir tanto na ativação dos nociceptores como na resposta inflamatória (PIOVESAN et al., 1997, 1998, DE MELO et al., 2000). A utilização de anticorpos contra citocinas como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 reduzem a hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 1992). Drogas como anti-inflamatórios esteroidais são eficazes no tratamento da hiperalgesia inflamatória, em parte, por inibir a síntese destas citocinas.

Experimentalmente, a dor inflamatória também pode ser controlada pela administração local de opióides. Os mecanismos moleculares das ações periféricas dos opióides ainda não estão bem esclarecidos. Pelo fato da hiperalgesia inflamatória ser devido a um aumento do conteúdo neuronal de Ca<sup>2+</sup> e AMPc (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; COLLIER e ROY, 1974), sugeriu-se que o efeito antinociceptivo periférico destas drogas estaria associado com a inibição da ativação

da adenilato ciclase (FERREIRA e NAKAMURA, 1979). No entanto, foi proposto que o mecanismo de antinocicepção periférica dos opióides seria devido ativação da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc (DUARTE et al., 1990; FERREIRA et al., 1991). Mais recentemente, RODRIGUES e DUARTE (2000) demonstraram que o aumento de GMPc promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, e portanto que a entrada de íons potássio e conseqüente hiperpolarização das células neuronais estaria envolvida no mecanismo de ação periférica dos opióides.

No entanto, os efeitos antinociceptivos dos opióides não se restringem ao seu efeito periférico, mas incluem efeitos supra-espinhais e espinhais. Os efeitos antinociceptivos supra espinhais dos opióides resultam da ativação de múltiplos sistemas de controle descendente da dor, com conseqüente liberação de neurotransmissores como noradrenalina e serotonina na medula espinhal. A ativação destas vias descendentes por agonistas opióides, como a morfina, parece ser resultado da inibição da atividade de um interneurônio gabaérgico que atua inibindo a ativação das vias descendentes (DUBNER e BENNET, 1983; BASBAUM e FIELDS; 1984; SUH et al., 1989; JESSEL e KELLY, 1991).

Ainda, os opióides podem exercer uma ação analgésica direta na medula espinhal através da ativação de receptores opióides presentes nos terminais centrais dos aferentes primários. A interação de agonistas opióides com estes receptores leva a uma diminuição da entrada de cálcio para o interior dos terminais nervosos, diretamente, pela diminuição da condutância de íons cálcio, ou indiretamente, através da indução do aumento da condutância aos íons potássio. O resultado da diminuição da entrada de cálcio para a terminação nervosa é a inibição da liberação de neurotransmissores como glutamato e SP (JESSEL e KELLY, 1991).

A restrição para o uso clínico dos opióides no controle da dor baseia-se em evidências de que o uso prolongado destas drogas está freqüentemente associado com o desenvolvimento de tolerância ao efeito analgésico e dependência física e psicológica.

#### 1.4 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA

O teste da formalina, padronizado por DUBUISSON e DENNIS (1977) em ratos e gatos, por HUNSKAAR et al. (1985) em ratos, e por ALREJA et al. (1984) em

macacos, é considerado um modelo de dor bifásica. O comportamento de resposta dos animais após a injeção de formalina consiste em uma fase inicial de curta duração, possivelmente causada pelo efeito químico direto da formalina nos receptores sensoriais, seguida por uma fase contínua e prolongada, a qual é devido, ao menos em parte, a uma inflamação causada pela formalina (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR, et al. 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987). Portanto, este teste tem sido utilizado como um modelo de dor inflamatória persistente e plasticidade do SNC. A ativação do nociceptor durante a fase inicial parece produzir uma sensibilização neuronal no corno dorsal, a qual contribui para a nocicepção da segunda fase da resposta à formalina (DICKENSON e SULLIVAN, 1987 a e b; CODERRE et al., 1990).

O modelo original do teste de formalina foi baseado na interpretação do comportamento apresentado pelos animais após a injeção subcutânea de formalina diluída em qualquer uma das patas, a saber, a proteção ao andar ou descansar, sapateado, elevação, lambida ou mordida da pata (DUBUISSON e DENNIS, 1977; FRANKLIN e ABBOTT, 1989).

Em 1989, CLAVELOU et al. adaptaram o teste de formalina para a dor orofacial. Este teste consiste na injeção subcutânea de formalina diluída no lábio superior do animal, e o perfil da resposta bifásica é semelhante às manifestações de comportamento vistas após a injeção na pata (DALLEL et al., 1995).

As principais vantagens do teste de formalina orofacial são a possibilidade do uso de um único "indicador de dor", ou seja, o tempo que o animal permanece esfregando a área injetada, e o fato de representar um método confiável para acessar dor na região trigeminal (CLAVELOU et al., 1989). Com relação à maioria dos estímulos nocivos comumente aplicados em experimentos comportamentais para o estudo da dor orofacial, como a estimulação elétrica da polpa dental (RAJAONA, et al., 1986; YOUNG, et al., 1981), radiação de calor (DUBNER, et al., 1975; ROSENFELD, et al., 1978) ou estimulação mecânica (YOUNG, et al., 1981), o teste de formalina também apresenta certas vantagens. Enquanto que estes modelos produzem apenas uma dor fásica e requerem uma certa restrição dos animais durante o período de teste, o que pode alterar a sensibilidade dolorosa (AMIR e AMIT, 1979; DUBUISSON e DENNIS, 1977; HILL et al., 1952), o teste de formalina é um modelo de dor tônica que envolve o mínimo de restrição dos animais.

## 1.5 DOR OROFACIAL: ORIGEM E CONTROLE

### 1.5.1 O nervo trigêmeo

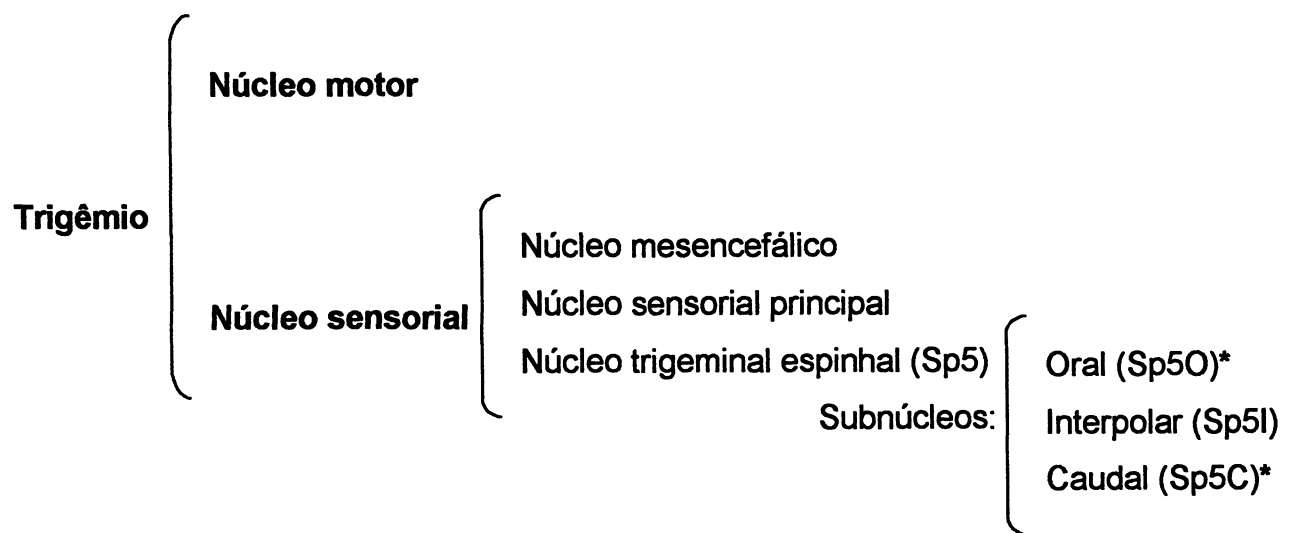
Após a injeção de formalina no lábio superior de ratos, a resposta bifásica é observada em registros eletrofisiológicos dos neurônios do tronco cerebral trigeminal, demonstrando o envolvimento do sistema sensorial trigeminal na resposta à formalina orofacial (DICKENSON e SULLIVAN, 1987 a,b ; RABOISSON et al., 1991). Uma importante característica do sistema sensorial trigeminal é que os corpos celulares dos aferentes primários estão localizados no gânglio trigeminal e no cérebro (USUNOFF et al., 1997; LAZAROV, 2000). O gânglio trigeminal representa o análogo no cérebro do DGR no sistema nervoso periférico (DARIAN-SMITH, 1973).

Os neurônios do gânglio trigeminal inervam principalmente mecanorreceptores, termorreceptores e nociceptores na face, cavidades oral e nasal (DUBNER et al., 1978; DAVIES, 1988). Os processos centrais destes neurônios terminam em vários grupos de neurônios de segunda ordem, cujos impulsos convergem, via tálamo, para o córtex somatossensorial (KRUGER e YOUNG, 1981; PFALLER e ARVIDSSON, 1988). Existem ainda, alguns neurônios de segunda ordem que fazem parte de um circuito neuronal local (YOSHIDA et al., 1994, YOSHIDA e OKA, 1998).

A análise das células dos neurônios do gânglio trigeminal em ratos e gatos, têm revelado 3 grupos celulares distintos: células pequenas (20-30  $\mu\text{m}$ ), relacionadas aos ramos cutâneos; células de tamanho mediano (30-50  $\mu\text{m}$ ), relacionadas com os aferentes da córnea; e células de tamanho grande (50-80  $\mu\text{m}$ ), relacionadas aos ramos oral e perioral, inclusive a polpa dental (MARFURT, 1981; SUGIMOTO et al., 1986). Os grupos celulares do gânglio trigeminal também foram classificados de acordo com a velocidade de condução de seus axônios e sua modalidade sensorial em:  $A\alpha/A\beta$ ,  $A\delta$  e C (BURGESS e PERL, 1973; DUBNER e BENNET, 1983). As fibras de tamanho mediano a grande possuem velocidades de condução condizentes com as categorias  $A\beta$  e  $A\delta$ . As fibras  $A\beta$  representam mecanorreceptores de baixo limiar, enquanto que as fibras  $A\delta$  representam mecanorreceptores de alto limiar, termorreceptores e nociceptores. As células de

tamanho pequeno possuem uma velocidade de condução que corresponde a categoria C e são consideradas nociceptores (LAWSON, 1992).

O núcleo sensorial trigeminal divide-se em três grupos principais: o núcleo mesencefálico, o núcleo sensorial principal e o núcleo trigeminal espinhal (Sp5). O Sp5 está subdividido em três partes : oral (Sp5O), interpolar (Sp5I) e caudal (Sp5C) (DARIAN-SMITH, 1973) (Figura 2).



\*Subnúcleos envolvidos com as respostas nociceptivas.

Figura 2 – Representação esquemática do sistema sensorial trigeminal.

O Sp5O e o Sp5C representam um relé dos impulsos nociceptivos das regiões oral e perioral, no entanto atribui-se uma maior importância ao Sp5C. Registros extracelulares dos neurônios do Sp5O revelaram a existência de respostas induzidas por estímulos nocivos aplicados nestas regiões (DALLEL et al., 1990; RABOISSON et al., 1991; SESSLE, 1996). No entanto, estudos recentes demonstraram que a maior parte dos terminais dos axônios aferentes primários, não mielinizados, trigeminais (fibras C) se projetam ao Sp5C e raramente a outras subdivisões do complexo sensorial trigeminal (CRISSMAN et al., 1996). A tractotomia que exclui o Sp5C e preserva o Sp5O suprime as sensações de dor intensa das áreas orofaciais de pacientes com neuralgia trigeminal (MORITA e HOSOBUCHI, 1992). A tractotomia do Sp5C também suprime o comportamento de resposta à formalina, pois este estímulo ativa preferencialmente as fibras do tipo C, cujos terminais estão localizados principalmente nas lâminas I e II do Sp5C (PAJOT et al., 2000). A importância do subnúcleo Sp5C na nocicepção orofacial também foi demonstrada por DUALE et al. (1996) através da realização de injeções de morfina em diferentes subnúcleos trigeminais previamente à injeção subcutânea de formalina no lábio superior ipsilateral.

O gânglio trigeminal fornece a inervação somatossensorial da face e da cavidade oral através das três divisões do nervo trigêmio: oftálmica, maxilar e mandibular. O ramo oftálmico inerva testa, pálpebra, córnea, conjuntiva, mucosas sinusais do frontal, etmóide e esfenóide e dorso do nariz ; o ramo maxilar inerva o lábio superior, porções laterais do nariz, parte da cavidade oral, mucosa da cavidade nasal, maxilar superior, palato e arcada dental superior; o ramo mandibular inerva lábio inferior, bochechas, queixo, arcada dental inferior, gengiva, mucosa do maxilar inferior, assoalho da boca e os dois terços anteriores da língua (BRODAL, 1981; USUNOFF et al., 1997; VOOGD et al., 1998). O nervo trigêmio , por se tratar de um nervo misto, possui ainda uma raiz motora, cujos axônios trafegam juntamente com o ramo mandibular e inervam os músculos da mastigação. O nervo trigêmio e suas ramificações em humanos e ratos está demonstrado nas figuras 3 e 4.

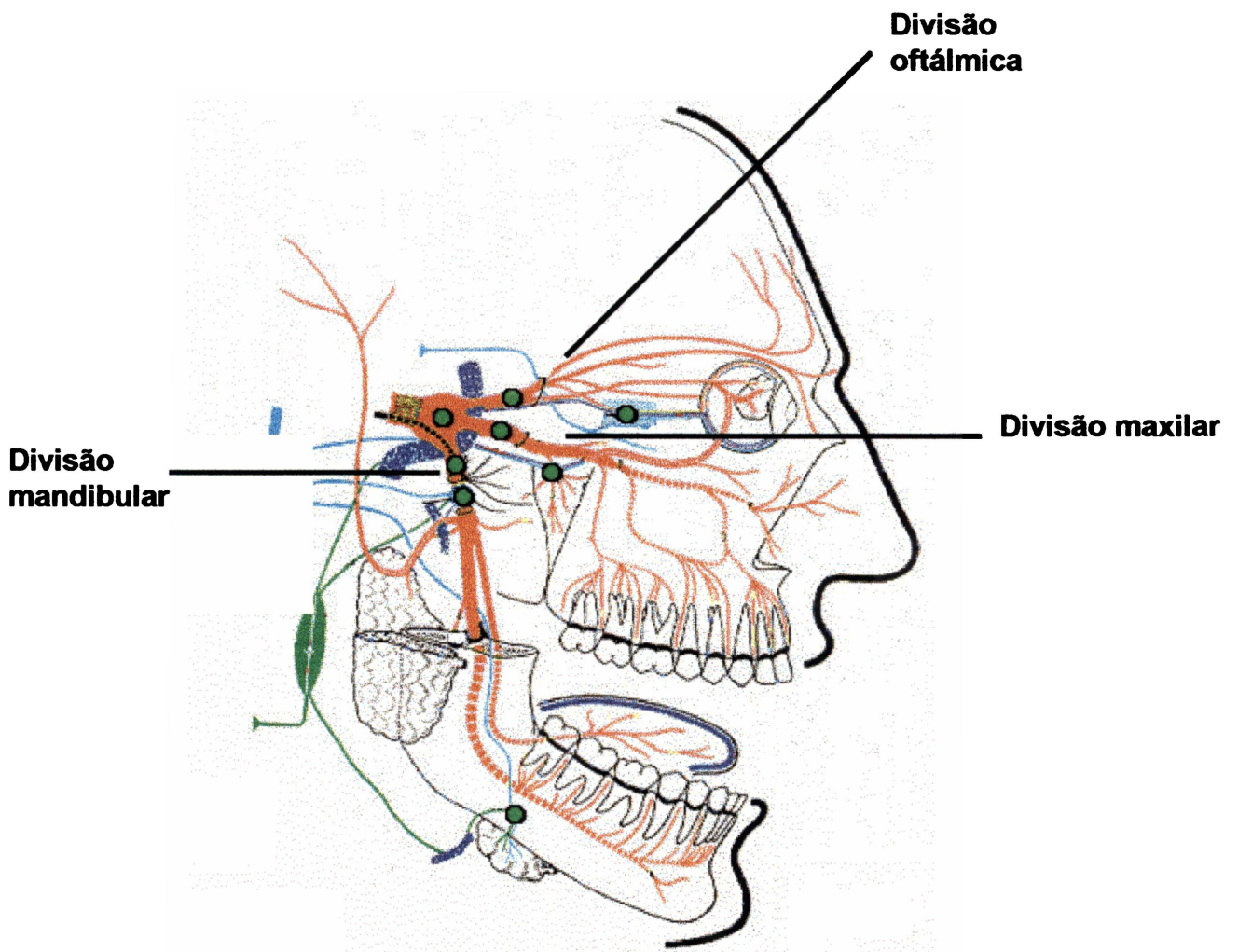


Figura 3 - Nervo trigêmeo em humanos e suas ramificações: divisão oftálmica, divisão maxilar e divisão mandibular.

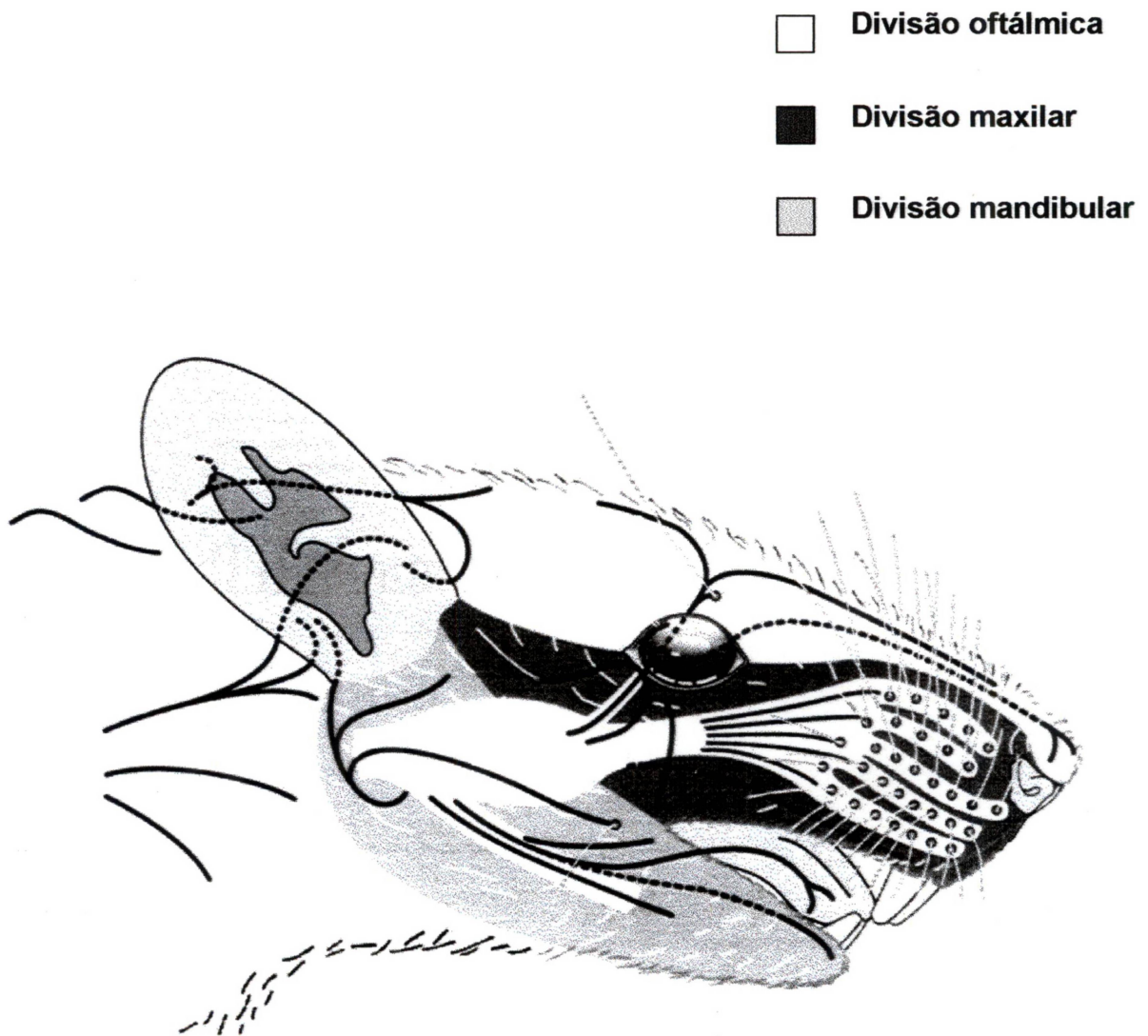


Figura 4 - Nervo trigêmeo em ratos e suas ramificações: divisão oftálmica, divisão maxilar e divisão mandibular.

Os neurônios aferentes primários trigeminais utilizam vários neuromediadores químicos para a transmissão sináptica (LAZAROV, 2000). Nos últimos anos diversas substâncias transmissoras e seus receptores foram identificados nos aferentes trigeminais primários. Algumas destas substâncias estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Alguns mediadores e seus receptores identificados no gânglio trigeminal e neurônios aferentes trigeminais primários.

Mediadores	Receptores
Glutamato	Receptor para cainato, mGluR5
Aspartato	
GABA	Receptor GABA <sub>A</sub> subunidades $\gamma$ 1 e $\gamma$ 2 GABA <sub>B</sub> subunidade GABA <sub>B2</sub>
Dopamina	Receptor D <sub>2</sub>
Serotonina	Receptores 5-HT <sub>1B</sub> , 5HT <sub>1D</sub> , 5HT <sub>1F</sub> , 5HT <sub>7</sub>
Histamina	Receptor H <sub>1</sub>
Acetilcolina	Receptores nicotínicos
Adenosina	Receptor A <sub>1</sub>
ATP	Receptor P <sub>2x</sub>
Óxido nítrico	
Substância P	
CGRP	
Somatostatina	
Colecistocinina	
Peptídeos opióides	Receptores opoidérgicos $\mu$ , $\delta$ e $\kappa$
Galanina	
Peptídeo intestinal vasoativo	
Neuropeptídeo Y	Receptores subtipo Y <sub>1</sub> e Y <sub>2</sub>

Outro importante grupo de neurotransmissores que tem sido associado aos neurônios aferentes primários trigeminais é formado pelas catecolaminas. As primeiras evidências da inervação catecolaminérgica do gânglio trigeminal foram apresentadas nos estudos de SANTINI (1966) e LUKÁS et al. (1970). As fibras nervosas com conteúdo catecolaminérgico que suprem o gânglio trigeminal são consideradas ramos terminais de neurônios simpáticos pós-ganglionares noradrenérgicos. Existem evidências de estudos imunohistoquímicos que sugerem que os neurônios do gânglio trigeminal não utilizam catecolaminas como neurotransmissores, mas estão sob influência de fibras aferentes catecolaminérgicas de origem simpática.

### 1.5.2 Controle da dor orofacial

Os estudos realizados até o momento com a metodologia de formalina orofacial objetivaram avaliar os mecanismos envolvidos no estabelecimento da primeira e segunda fases de resposta, e o efeito de algumas drogas analgésicas e antiinflamatórias na resposta à formalina.

Na investigação da origem da primeira e segunda fases da resposta à formalina, estudos foram realizados com agentes anestésicos locais administrados no mesmo local de injeção da formalina antes ou após a primeira fase (DALLEL et al., 1995). Os dados obtidos demonstraram que a administração de lidocaína (50 ou 150  $\mu$ l, 2%), previamente a administração de formalina, produziu um bloqueio completo da primeira fase de resposta à formalina. Esse resultado corrobora outros estudos comportamentais os quais utilizaram a injeção local de bupivacaína (150  $\mu$ l, 0.5%) (CODERRE et al., 1990) ou lidocaína (100  $\mu$ l, 1%) (WHEELER-ACETO e COWAN, 1991), e sugerem que a primeira fase de resposta à formalina reflete a ativação aguda dos aferentes nociceptivos primários. Com relação à segunda fase, DALLEL et al. (1995) demonstraram ainda que a injeção de lidocaína após a primeira fase produz uma redução dose-dependente da segunda fase da resposta nociceptiva. Estes resultados confirmam os resultados obtidos por DICKENSON e SULLIVAN (1987a) que demonstraram que a injeção s.c. de lidocaína (50  $\mu$ l, 2%),

após a primeira fase de resposta, aboliu completamente a segunda fase durante aproximadamente 10 min.

A possibilidade de que este efeito inibitório possa ser devido a um efeito central do anestésico local parece improvável, pois o pré-tratamento com lidocaína sistêmica (i.v.) não reduziu de forma significativa a segunda fase da resposta. Esses resultados contribuem para a hipótese de que a segunda fase da resposta nociceptiva depende de impulsos em andamento gerados nos aferentes nociceptivos primários (DALLEL et al., 1995).

Ainda neste contexto, em 1995, CADET et al. demonstraram que a injeção de formalina aplicada no lábio superior esquerdo de ratos pode induzir, uma a duas semanas depois, um aumento na resposta nociceptiva após a injeção de formalina no lábio contralateral. Esse resultado parece indicar que a mensagem nociceptiva de curta duração deixa "vestígios" no SNC. As modificações vistas podem ser bloqueadas no sétimo dia através da administração de um agente anestésico local imediatamente antes da aplicação da formalina. Esse estudo sugere que o impulso inicial disparado pela formalina não é suficiente para manter e elevar a excitabilidade central, porém é necessário para iniciar a mudança, e o aumento da resposta nociceptiva também depende dos impulsos em andamento da inflamação induzida pela formalina.

Com relação aos analgésicos, a administração local e sistêmica de morfina suprimiu ambas as fases de resposta à formalina orofacial de maneira dose-dependente, no entanto a administração local de morfina parece apresentar um efeito analgésico superior à administração sistêmica (EISENBERG et al. 1996). Segundo os resultados de CLAVELOU et al. (1989), o efeito antinociceptivo da morfina administrada via intra-peritoneal era menor durante a primeira fase de resposta quando comparado a segunda fase.

Com relação aos AINES, o efeito antinociceptivo do ácido acetilsalicílico (400 mg/kg) e do paracetamol (300 mg/kg) durante ambas as fases da resposta à formalina foi demonstrado por CLAVELOU et al. (1989). No entanto, estes autores observaram que estas drogas eram mais efetivas em reduzir a segunda fase da resposta nociceptiva quando comparado a primeira fase.

O efeito da dipirona, administrada via subcutânea ou local, previamente à formalina causou uma redução de ambas as fase da resposta, e este efeito

antinociceptivo periférico da dipirona parece ser dependente de canais de  $K^+$  e independente de receptores opióides periféricos (PIMENTA et al., 2000).

O efeito anti-hiperalgésico da epibatidina, um agonista do receptor nicotínico neuronal, foi demonstrado em ambas as fases da resposta induzida por formalina orofacial, e este efeito apresentou-se dose e tempo-dependente (GILBERT et al., 2001).

Os resultados apresentados indicam que a segunda fase de resposta à formalina parece depender, ao menos em parte, do estabelecimento da primeira fase, e demonstram também o efeito de algumas drogas na nocicepção orofacial. No entanto os mediadores que participam do estabelecimento e manutenção desta resposta ainda não foram investigados.

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 OBJETIVO GERAL

O modelo de dor orofacial parece produzir uma dor semelhante à dor descrita clinicamente. A diversidade de mediadores envolvidos na sensibilização periférica, responsável pela resposta nociceptiva inicial e durante uma resposta inflamatória, que contribui para a nocicepção da segunda fase da dor no modelo da formalina, tornam extremamente complexo o controle da dor. Alguns destes mediadores já foram descritos no modelo de dor da formalina na pata, o que permitiu um avanço no entendimento de como esta resposta se desenvolve. No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento para identificar estes mediadores no modelo de dor orofacial, sendo este o objetivo do nosso estudo.

### 1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Neste estudo propusemo-nos a avaliar a participação de diversos mediadores na nocicepção orofacial através de:

- a. **redução** da resposta nociceptiva por antagonistas de receptores, inibidores da síntese, anticorpos ou por depleção dos estoques citoplasmáticos do mediador.
- b. **aumento** da resposta nociceptiva por adição de mediadores sintéticos ou de inibidores de metabolização ou de liberadores do neurotransmissor.

Assim, os experimentos foram realizados no sentido de :

- Padronizar o teste de formalina orofacial através da realização de curvas dose-resposta de formalina.

- Avaliar a participação das PGs na resposta nociceptiva induzida por formalina, através do pré-tratamento de ratos com inibidores não seletivos (indometacina), e seletivos (meloxicam e celecoxibe) de COX. E ainda neste aspecto, avaliar o efeito da administração local de PGE<sub>2</sub> na resposta nociceptiva induzida por formalina.

- Avaliar a participação de leucotrienos na resposta nociceptiva à formalina através do pré-tratamento com um inibidor da 5-lipoxigenase (MK 886).

- Avaliar a participação do sistema nervoso simpático na resposta nociceptiva à formalina, através do pré-tratamento com atenolol, guanetidina e tiramina.

- Avaliar a participação da BK na resposta induzida por formalina, através do pré-tratamento com um inibidor da cininase II (captopril), e com antagonistas dos receptores B<sub>2</sub> (HOE-140) e B<sub>1</sub> (DALBK).

- Avaliar a participação das endotelinas na resposta à formalina através do pré-tratamento com ET-1 e com antagonistas dos receptores ET<sub>A</sub> (BQ-123) e ET<sub>B</sub> (BQ 788).

- Avaliar a participação da histamina na resposta à formalina através do pré-tratamento de ratos com histamina e com um antagonista do receptor H1 (meclisina).

- Avaliar o efeito da administração local de citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 e seus anticorpos ou antisoros correspondentes na resposta nociceptiva induzida por formalina orofacial.

- Avaliar a eficácia terapêutica de um antiinflamatório esteroideal (dexametasona) em ambas as fases da nocicepção induzida por formalina orofacial.

- Avaliar a participação do glutamato na resposta à formalina através do pré-tratamento de ratos com glutamato e com um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (AP-5). Ainda neste contexto, avaliar o efeito da lamotrigina na nocicepção induzida por formalina orofacial.

-

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 160-240 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) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes dos experimentos, agrupados em um número máximo de 6 animais por caixa. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura e sempre durante o ciclo claro (11:00 às 19:00 h).

#### 2.1.2 Drogas, doses e soluções

- Formaldeído 37 %
- Solução salina estéril 0,9%
- Indometacina (Merck, Sharpe & Dohme Ltd) 2 e 4 mg/kg, i.p. e 100 e 300 µg, s.c.
- Meloxicam (Boehringer Ingelheim) 0,31; 1,25 e 5,0 mg/kg, i.p.
- Celecoxibe (Searle-Pfizer) 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p. e 12,5 ; 50 e 200 µg, s.c.
- Prostaglandina E<sub>2</sub> (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 50 e 100 ng, s.c.
- MK 886 (BIOMOL Research Labs.) 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p.
- Atenolol (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 6,25; 25 e 100 µg, s.c.
- Tiramina (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 200 µg, s.c.
- Monosulfato de Guanetidina (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 30 mg/kg, s.c.
- Captopril (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 5 mg/kg, s.c.
- HOE 140 (Hoechst, Germany) 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 10,0 mg/kg, s.c.
- DALBK (Peninsula Laboratories, EUA) 0,5; 1,0 e 2,0 µg, s.c.
- ET-1(Sigma, Chemicals & Co, EUA ) 10 pmol, s.c.

- BQ 123 (Sigma, Chemicals & Co, EUA ) 1,0; 3,0 e 10,0 nmol, s.c.
- BQ 788 (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 3,0 e 10,0 nmol, s.c.
- Histamina (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 250 µg, s.c.
- Meclisina (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 12,5; 50 e 200 µg, s.c.
- TNF $\alpha$  (NIBSC, Inglaterra) 1,25; 2,5 e 5,0 pg, s.c.
- Anticorpo anti-TNF $\alpha$  (R&D) 25 pg, s.c.
- IL-1 $\beta$  (NIBSC, Inglaterra) 0,125; 0,25 e 0,5 pg, s.c.
- Antisero anti-IL-1 $\beta$  (NIBSC, Inglaterra) diluição 1 : 5 em salina, s.c.
- IL-6 (R&D) 1,0; 1,5 e 2,0 ng, s.c.
- Antisero anti-IL-6 (R&D), s.c.
- IL-8 (R&D) 100; 200 e 400 pg, s.c.
- Antisero anti- IL-8 (NIBSC, Inglaterra) diluição 1 : 5 em salina, s.c.
- Soro de carneiro pré-imune
- Dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda) 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, s.c.
- Ácido L-glutâmico (Sigma, Chemicals & Co, EUA) 100 nmol, s.c.
- AP-5 (SIGMA) 10; 30 e 100 µg, s.c.
- Lamotrigina (The Wellcome Research Laboratories) 3,0; 10,0 e 30,0 mg/kg, i.p.

Os veículos para a diluição das drogas utilizadas corresponderam à:

- solução tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 8,3) para dissolução de indometacina,
- solução de carboximetilcelulose 0,1% em salina para dissolução do MK 886;
- solução de cremofor 5% em salina para dissolução da meclisina;
- solução de PBS (solução salina tamponada com fosfatos) para dissolução do glutamato e AP-5;
- solução de carboximetilcelulose 0,5%, Tween 80 0,4% e álcool benzílico 0,9% em salina para dissolução da lamotrigina;
- solução salina estéril para todas as outras drogas.

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

As drogas e veículos foram administrados por via subcutânea (s.c.) no lábio superior, para o tratamento local, ou pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou s.c. para o tratamento sistêmico. O volume administrado no tratamento local foi de 50  $\mu$ l, em cada injeção, sendo o mesmo volume para o veículo e para a formalina. No tratamento sistêmico as drogas e veículos foram administrados no volume de 1 ml/kg.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Teste de formalina orofacial: curva dose-resposta

Para a determinação das concentrações de formalina que seriam utilizadas em experimentos posteriores e para a padronização da técnica, foram realizadas curvas dose-resposta de formalina nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 3,75 e 5%. Esse teste consistiu na injeção s.c. de formalina (50  $\mu$ l) no lábio superior de ratos, conforme descrito por Clavelou et al. (1989). Inicialmente cada animal foi colocado em um funil de vidro, com espelhos posicionados ao seu redor, por um período de 10 minutos para minimizar o estresse dos animais ao novo ambiente. Imediatamente após a injeção de formalina nas diferentes concentrações o animal retornou ao funil de vidro para o período de observação. O tempo de observação foi dividido em 10 blocos de 3 minutos (totalizando 30 minutos) e a intensidade da nocicepção foi determinada para cada bloco pela contagem do tempo (em segundos) que o animal permaneceu friccionando a área injetada com as patas traseiras ou dianteiras. Movimentos com a pata ipsilateral normalmente foram acompanhados de movimentos com a pata contralateral. De acordo com os períodos de atividade máxima dos animais, foram determinados quais intervalos de tempo correspondiam a primeira e segunda fases. Também foram determinadas as concentrações de formalina que seriam utilizadas em experimentos posteriores: uma dose baixa, que permitiria avaliar o efeito de potenciação de determinadas drogas, e uma dose sub-máxima, que permitiria avaliar o efeito de drogas capazes de reduzir a resposta nociceptiva à formalina. Imediatamente após o período de observação, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical a fim de evitar o sofrimento desnecessário dos mesmos.

### 2.2.2 Teste de formalina na pata

O teste de formalina na pata foi utilizado como controle para os experimentos, para a avaliação da eficácia de algumas drogas que não apresentaram efeito no teste de formalina orofacial. Este teste consistiu na injeção subcutânea de formalina 2,5% ou salina em uma das patas traseiras dos animais. O volume administrado em cada injeção foi de 50 µl. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados em funis de vidro e observados durante 45 minutos. Neste período, o tempo que o animal permaneceu executando os comportamentos de lambida e elevação da pata injetada eram registrados. Estes comportamentos ocorreram em um padrão bifásico, sendo que a fase I correspondeu aos primeiros 5 minutos e a fase II foi considerada o período entre 15 e 40 minutos.

### 2.2.3 Tratamento dos animais com anti-inflamatórios não esteroidais, Prostaglandina E<sub>2</sub> e com um inibidor da 5-lipoxigenase

Os tratamentos com drogas anti-inflamatórias (indometacina, meloxicam ou celecoxibe) foram realizados 30 min antes do estímulo (formalina 2,5%). Com exceção do celecoxibe que foi administrado local ou sistemicamente (i.p.), as outras drogas foram administrada por via i.p.

O tratamento local dos animais com PGE<sub>2</sub> foi realizado 1 h antes da injeção de formalina 0,625%, e o inibidor da 5-lipoxigenase (MK 886) foi administrado sistemicamente (via i.p) 1 h antes da injeção de formalina 2,5%.

### 2.2.4 Tratamento dos animais com atenolol, guanetidina e tiramina

O atenolol foi administrado localmente 30 min antes da injeção de formalina 2,5%.

Para a depleção dos terminais noradrenérgicos, os animais foram tratados com guanetidina durante 3 dias na dose de 30 mg/kg (s.c), enquanto que os animais dos grupos controle receberam injeções de salina (1 ml/kg, s.c.). No dia seguinte ao término do tratamento, os animais receberam uma injeção de salina ou formalina 2,5% no lábio superior e o comportamento de resposta nociceptivo foi avaliado.

Em animais que receberam tratamento com guanetidina (30 mg/kg, s.c.) ou salina (1ml/kg, s.c.) durante 3 dias, também foi avaliado o efeito do pré-tratamento local com tiramina (200 µg) 2 h antes da administração de salina ou da dose mais baixa de formalina (0,625%) no mesmo local.

#### 2.2.5 Tratamento dos animais com um inibidor da cininase II e antagonistas dos receptores de bradicinina

O tratamento sistêmico (s.c.) dos animais com o inibidor da cininase II (captopril) foi realizado 2 h antes do estímulo (formalina 0,625%).

O antagonista de receptores B<sub>1</sub> de BK (DALBK), foi realizado localmente 30 min antes da injeção de formalina 2,5%, e o antagonista de receptores B<sub>2</sub> (HOE 140) foi administrado sistemicamente (s.c.) 1 h antes da injeção de formalina 2,5%.

#### 2.2.6 Tratamento dos animais com endotelina-1 e com antagonistas dos receptores de endotelina

A ET-1 foi administrada localmente, 30 minutos antes da formalina 0,625%. Os antagonistas de receptores ETA (BQ 123) e ETB (BQ788) de endotelina também foram administrados localmente, 30 min antes da formalina 2,5%.

#### 2.2.7 Tratamento dos animais com histamina e com um antagonista de receptores histaminérgicos

A histamina foi administrada localmente, 30 minutos antes da formalina 0,625%.

O antagonista de receptores H<sub>1</sub> de histamina (meclisina) foi administrado localmente 30 min antes da administração de formalina 2,5%.

#### 2.2.8 Tratamento dos animais com citocinas e anticorpos

Para avaliar a participação de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 na nocicepção induzida por formalina, os animais foram tratados localmente com anticorpo anti-

TNF $\alpha$  , ou antisoros anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 e anti-IL-8, 1 h antes da administração do estímulo (formalina 2,5%).

Ainda, avaliamos se o pré-tratamento local dos animais com estas citocinas era capaz de potenciar o comportamento de resposta a uma dose mais baixa de formalina. Para tanto, as citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 foram administradas localmente 2 h antes da injeção de formalina 0,625%.

#### 2.2.9 Tratamento dos animais com um antiinflamatório esteroidal

O antiinflamatório esteroidal dexametasona foi administrado sistemicamente (s.c.) 1 ou 2 h antes da injeção de formalina 2,5%.

#### 2.2.10 Tratamento dos animais com glutamato, com um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e com lamotrigina

O glutamato foi administrado localmente, 30 minutos antes da formalina 0,625%. O antagonista de receptores NMDA (AP-5) foi administrado localmente, 30 min antes da injeção de formalina 2,5%. A lamotrigina foi administrada sistemicamente 30 min antes da injeção de formalina 2,5%.

#### 2.2.11 Análise Estatística

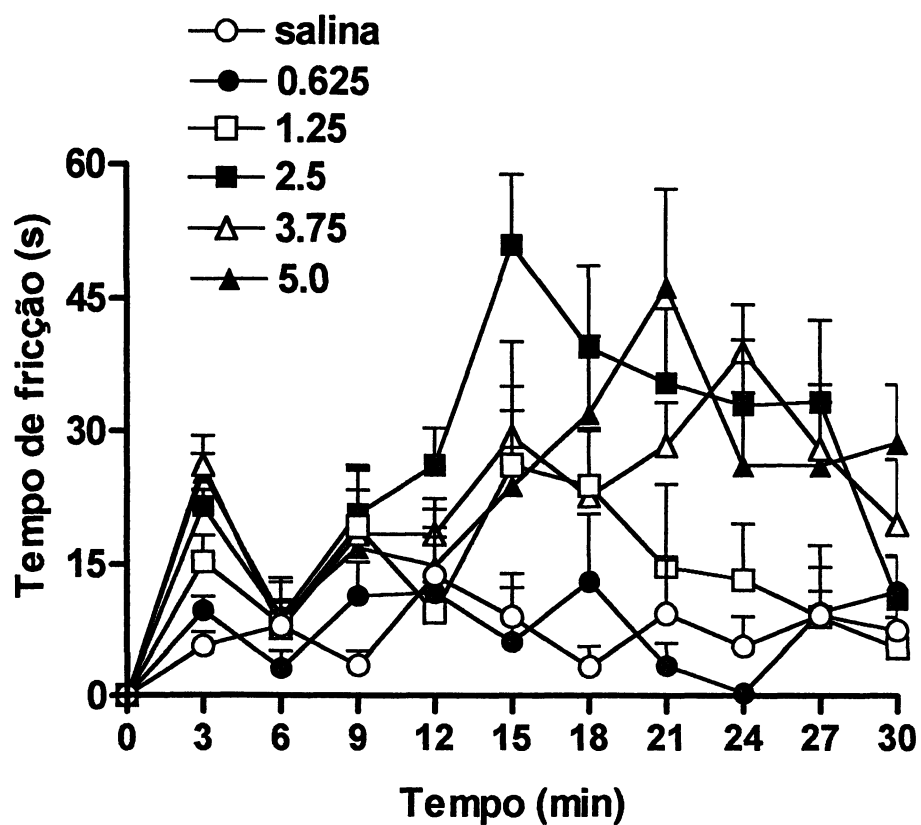
A amplitude do comportamento de resposta foi avaliada pelo tempo (em segundos) que o animal permaneceu esfregando a área injetada e expressa como média  $\pm$  EPM. Os dados expressos nos gráficos de barra representam o tempo dispendido pelos animais na fricção do local em fases distintas (fase I : 0-3 min e fase II : somatória do intervalo de tempo entre 12-30 min) e foram avaliados por análise de variância ANOVA ONE WAY, seguida por teste de Bonferroni para comparação entre grupos. O nível de significância considerado foi de 5%.

### **3 RESULTADOS**

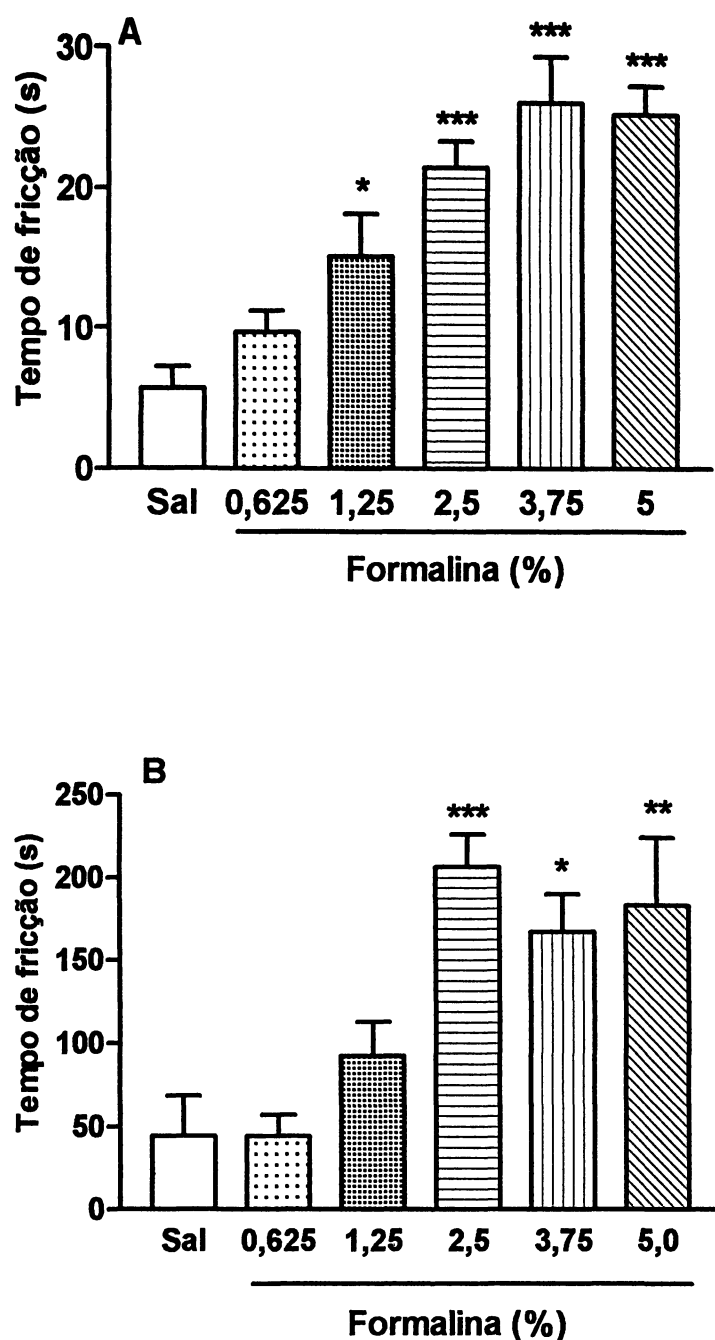
#### **3.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DE FORMALINA NA DOR OROFACIAL**

A administração local de formalina nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 3,75 e 5% induziu uma resposta bifásica nos animais. A figura 5 mostra o desenvolvimento temporal da resposta nociceptiva após a administração de diferentes concentrações de formalina. A partir da análise deste experimento, os 3 primeiros minutos da resposta nociceptiva foram considerados a primeira fase, enquanto que o período entre 12 e 30 min foi considerado como segunda fase. A figura 6 mostra o tempo total de fricção do local em fases distintas: fase I (0-3 min) e fase II (12-30 min). A administração de doses crescentes de formalina induziram uma resposta dose-dependente na fase I, mas não pudemos observar esta relação na fase II da resposta.

Após a realização deste experimento ficou determinada a concentração de 2,5% de formalina para avaliar o efeito de drogas que pudessem inibir alguns dos mediadores que estariam participando da resposta nociceptiva. Passamos a utilizar a dose de 0,625% de formalina em estudos que envolvessem o aumento da resposta nociceptiva por drogas ou mediadores, o que seria um indicativo da participação destes mediadores no processo avaliado. Em nossas condições, os animais apresentaram uma melhor resposta à formalina no período entre 11:00 e 19:00 h, sendo este estabelecido para todos os experimentos realizados posteriormente.



**Figura 5: Curva temporal da resposta induzida pela administração local de diferentes concentrações de formalina.** A resposta nociceptiva foi avaliada após a injeção local de formalina (50  $\mu$ l, s.c.) nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 3,75 ou 5% ou o mesmo volume de salina. Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local avaliado a cada 3 min durante 30 min (n=6).



**Figura 6: Curva dose-resposta induzida pela administração local de diferentes concentrações de formalina.** A resposta nociceptiva foi avaliada após a administração local de formalina (50  $\mu$ l, s.c.) nas concentrações de 1,25; 2,5; 3,75 ou 5% ou o mesmo volume de salina (Sal). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao controle (Sal) \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 8,721 e F=13,39, respectivamente.

### 3.2 PARTICIPAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Analisou-se a participação de PGs utilizando diferentes AINES, com diferentes seletividades para inibição das enzimas COX-1 e COX-2.

Inicialmente foi testado o efeito da indometacina, um AINE não seletivo, na resposta nociceptiva induzida por formalina. A administração local de indometacina nas doses de 100 e 300 µg, 30 min antes da administração do estímulo nocivo (formalina 2,5%), não modificou nenhuma das fases da resposta à formalina (n=10) (figura 7).

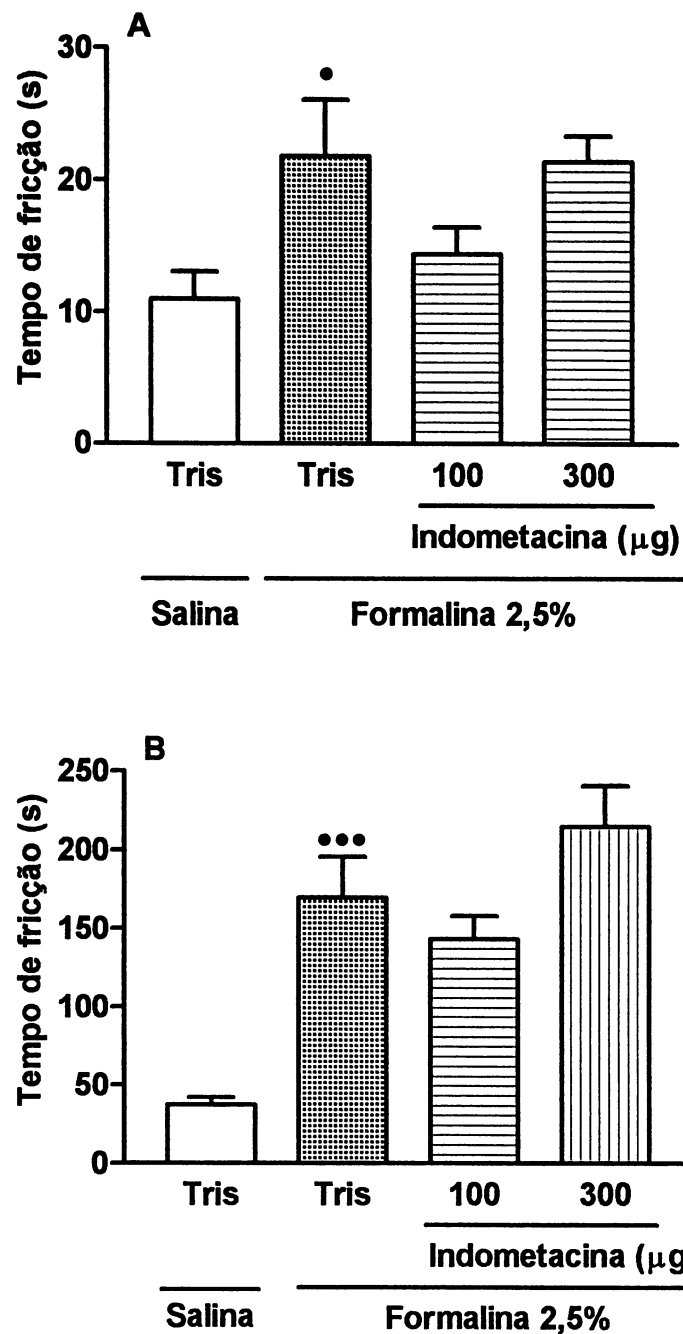
A administração sistêmica de indometacina nas doses de 2 e 4 mg/kg, 30 min antes da injeção de formalina 2,5%, também não modificou nenhuma das fases da resposta induzida por formalina (n=10) (figura 8).

Para avaliar a eficácia da indometacina, realizou-se o mesmo protocolo experimental porém utilizando a metodologia de formalina na pata. Neste teste, a administração sistêmica de indometacina na dose de 4 mg/kg reduziu 40,4 % a fase I, e ambas as doses (2 e 4 mg/kg) modificaram a fase II da resposta à formalina, promovendo reduções de 43,8% e 45,5%, respectivamente (n=6) (figura 9).

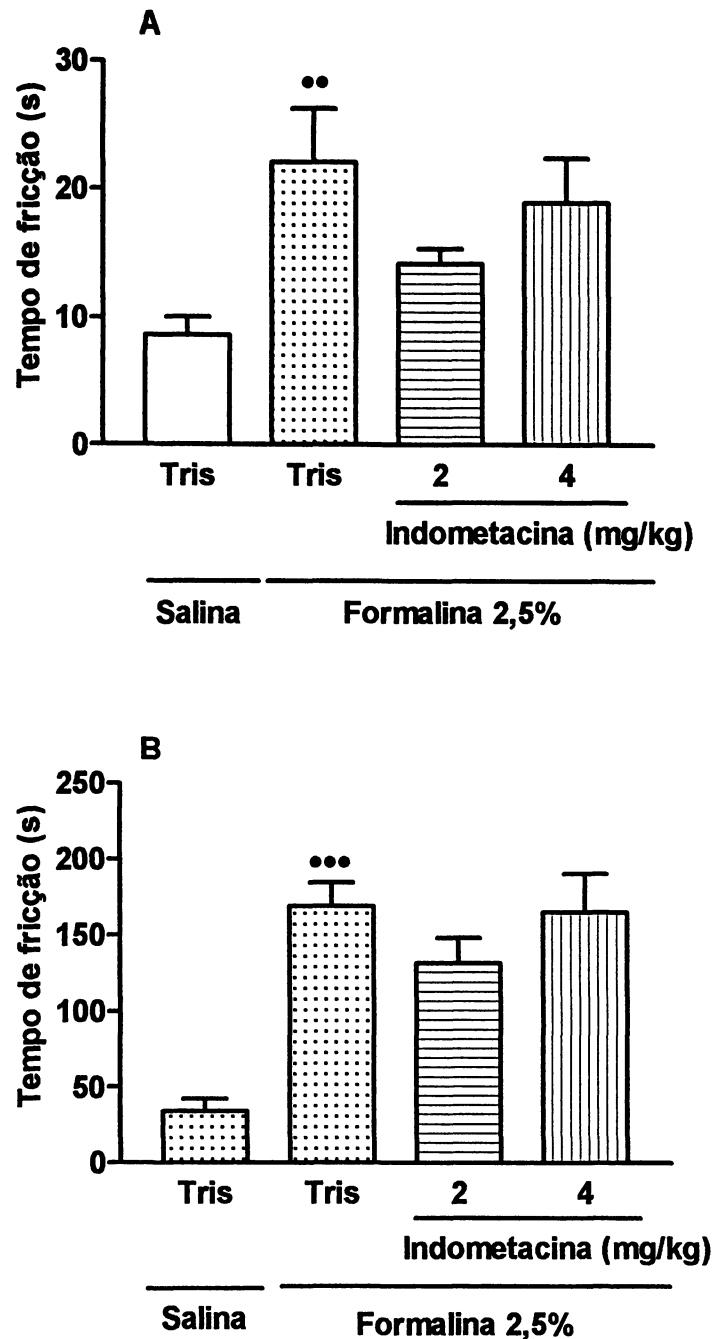
Pelo fato da indometacina ser considerada um AINE não seletivo, realizou-se a seguir o tratamento com meloxicam e celecoxibe, considerados inibidores mais seletivos para a enzima COX-2. A administração sistêmica de meloxicam nas doses de 0,3125 ; 1,25 e 5 mg/kg, 30 min antes da injeção de formalina 2,5%, não modificou a fase I da resposta induzida por formalina orofacial. Entretanto, as doses de 1,25 e 5 mg/kg reduziram a fase II da resposta em 51% e 55,2%, respectivamente (n=10) (figura 10).

O pré-tratamento sistêmico com celecoxibe nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg /kg, 30 min antes da injeção de formalina 2,5% também não modificou a fase I da resposta à formalina. Com relação a fase II, as doses de 1,0 e 3,0 mg/kg reduziram a resposta à formalina em 36 e 38%, respectivamente (n=10) (figura 11). O pré-tratamento local com celecoxibe nas doses de 12,5 ; 50 e 200 µg, 30 min antes da injeção de formalina 2,5%, também não modificou a fase I da resposta nociceptiva. No entanto, as doses de 50 e 200 µg reduziram a resposta à formalina em 50% e 52%, respectivamente (n=10) (figura 12).

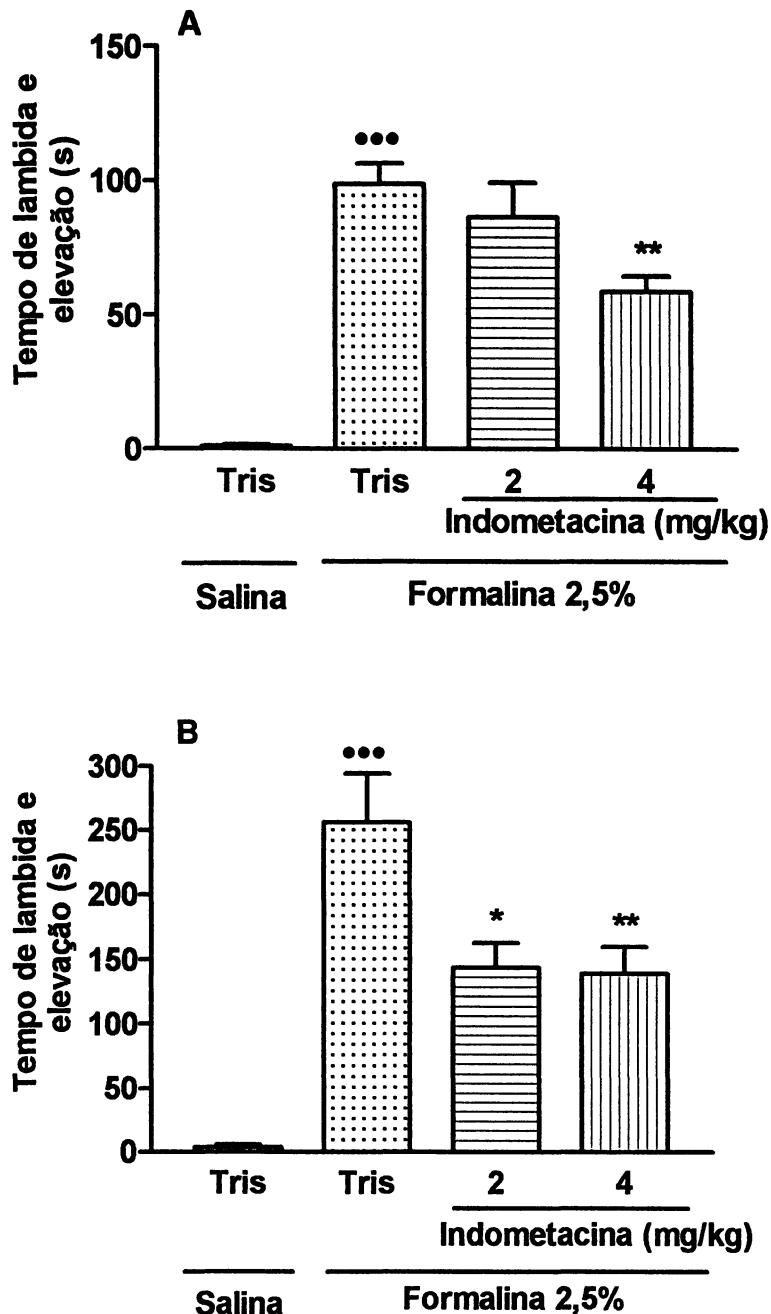
A participação das PGs também foi avaliada através do tratamento dos animais com PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> foi administrada localmente nas doses de 50 ng e 100 ng 1 h antes da administração de formalina 0,625%. O pré-tratamento local com PGE<sub>2</sub> não modificou a fase I da resposta à formalina, mas promoveu um aumento de 59,8 e 40,9%, respectivamente na resposta nociceptiva em relação ao controle (n=10) (figura 13).



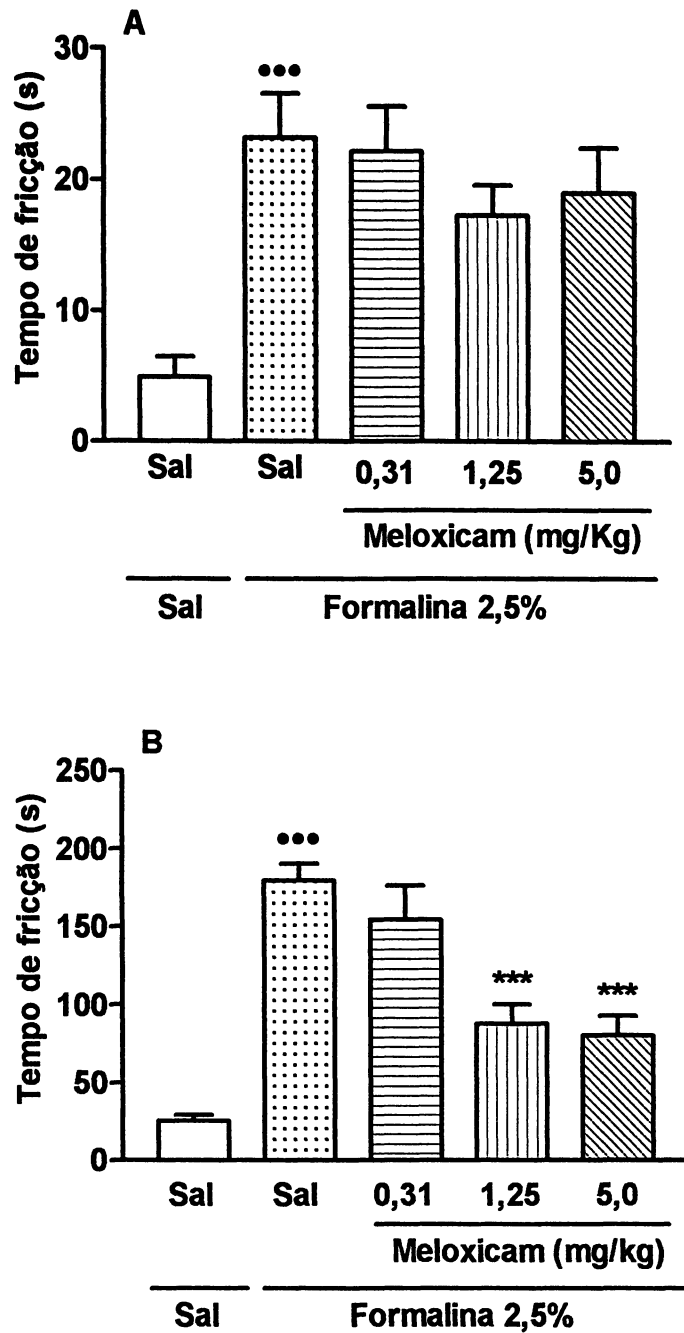
**Figura 7: Efeito da indometacina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com veículo (Tris, 50 µl, s.c.) ou indometacina (100 ou 300 µg/50 µl, s.c.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50 µl, s.c.). Animais controle receberam salina (50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Tris + Salina, \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 3,720 e F=14,59, respectivamente.



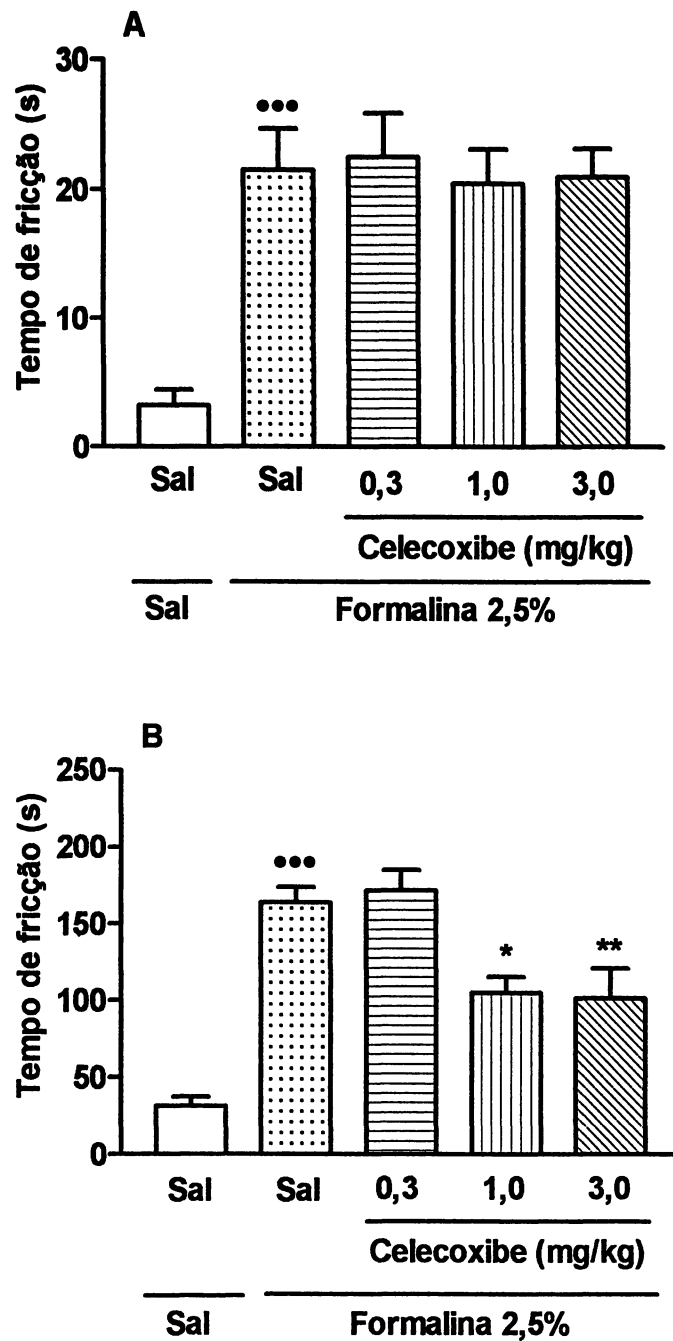
**Figura 8: Efeito da indometacina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com veículo (Tris, 1 ml/kg, i.p.) ou indometacina (2 e 4 mg/kg i.p.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Tris+ Salina, <sup>\*\*</sup>P<0,01 e <sup>\*\*\*</sup>P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 4,162 e F=13,18, respectivamente.



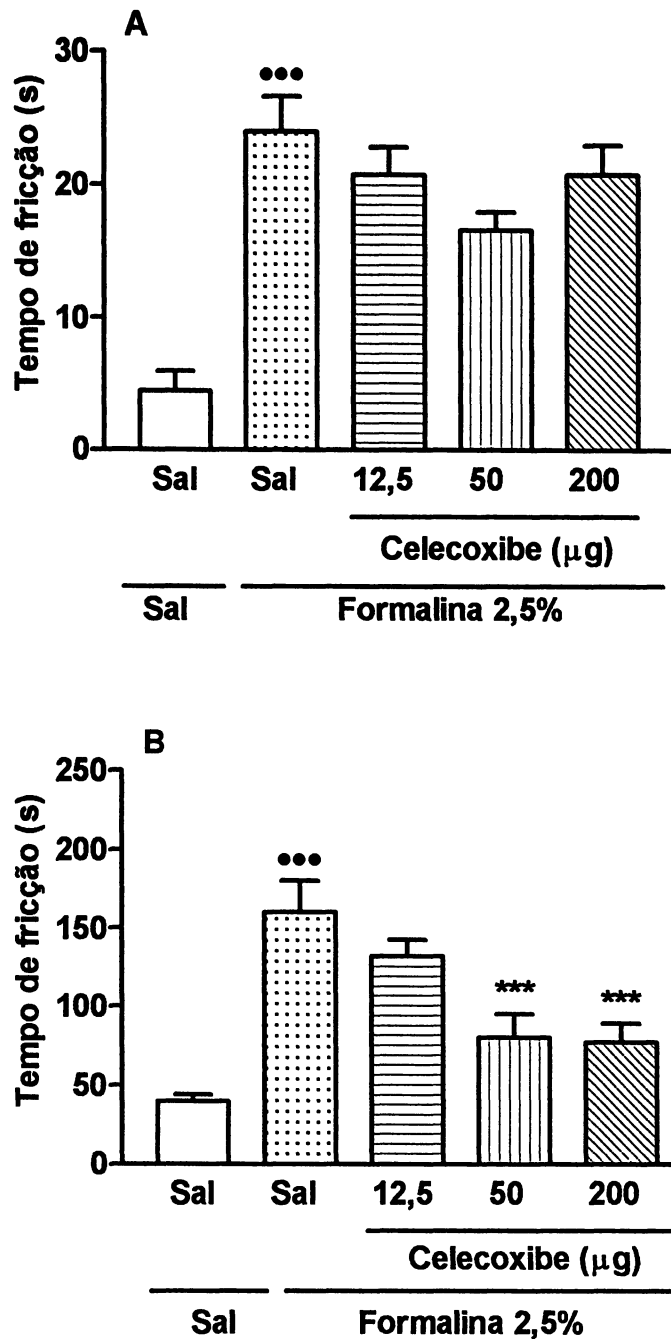
**Figura 9: Efeito da indometacina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina na pata.** Os animais foram tratados com veículo (Tris, 1 ml/kg, i.p.) ou indometacina (2 e 4 mg/kg i.p.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.) na pata traseira. Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de lambida e elevação da pata na fase I (painel A: 0-5 min) e na fase II (painel B: 15-40 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Tris + Salina, \*\*\*P<0,001 e em relação ao grupo Tris + Formalina \*P<0,05 e \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 18,70 e F=29,42, respectivamente.



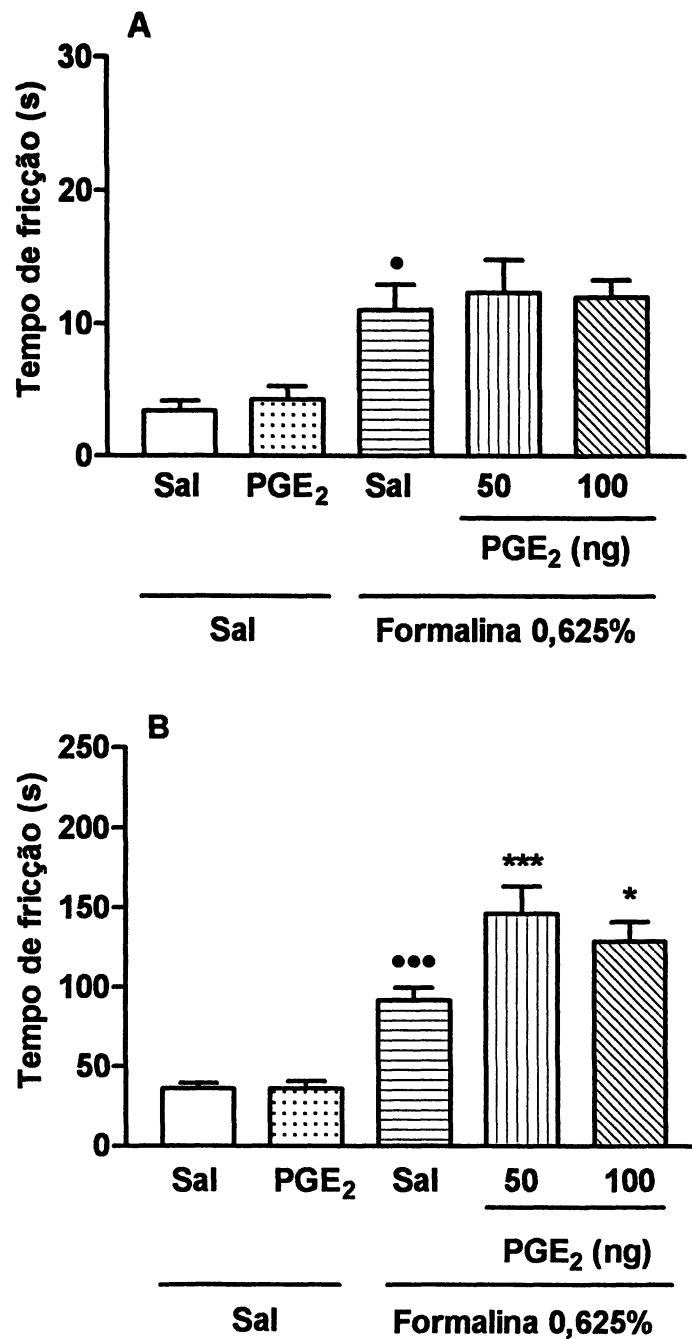
**Figura 10: Efeito do meloxicam administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 1 ml/kg, i.p.) ou meloxicam (0,31; 1,25; 5,0 mg/kg, i.p.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal \*\*\*P<0,001 e em relação ao grupo Sal + Formalina \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F=6,309 e F=20,27, respectivamente.



**Figura 11: Efeito do celecoxibe administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 1 ml/kg, i.p.) ou celecoxibe (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg i.p.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal, \*\*\*P<0,001 e em relação ao grupo Sal + Formalina, \* P<0,05 e \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 11,44 e F=13,93, respectivamente.



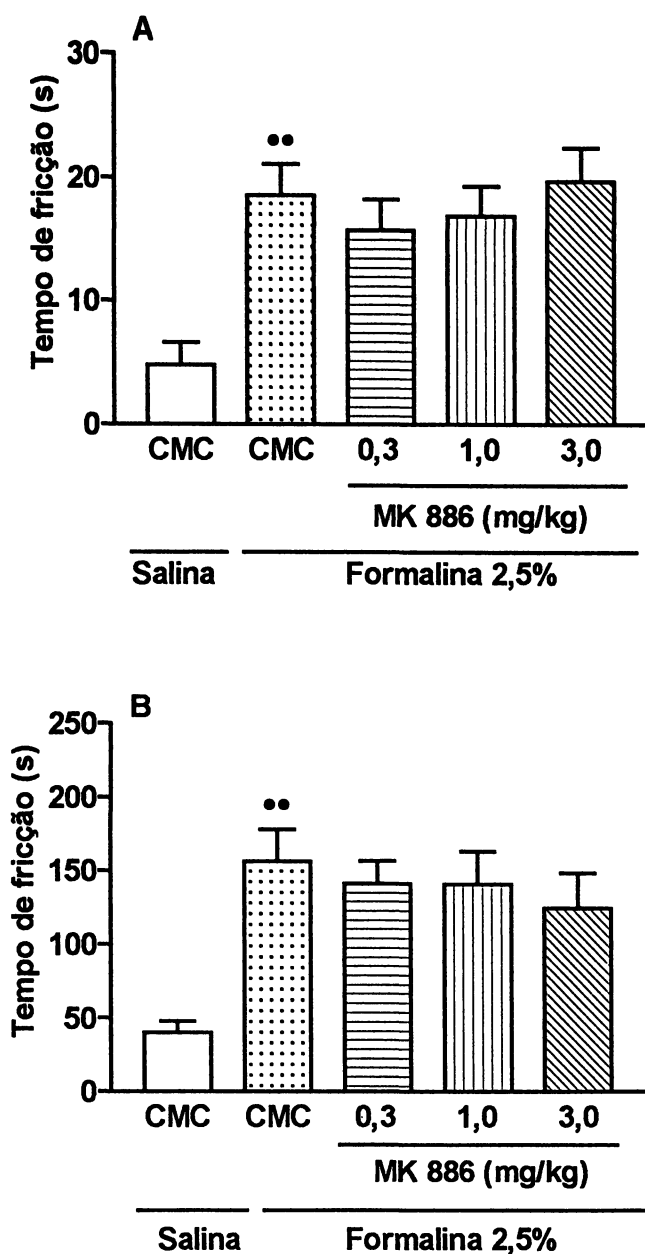
**Figura 12: Efeito do celecoxibe administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu\text{l}$ , s.c.) ou celecoxibe (12,5 ; 50 e 200  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ , s.c.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu\text{l}$ , s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu\text{l}$ , s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) ( $n=10$ ). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal, \*\*\* $P<0,001$  e em relação ao grupo Sal + Formalina \*\*\* $P<0,001$ . Os valores de F para as fases I e II são:  $F=14,29$  e  $F=12,53$ , respectivamente.



**Figura 13: Efeito da prostaglandina E<sub>2</sub> administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou PGE<sub>2</sub> (50 ou 100 ng/50  $\mu$ l, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal+ Sal, \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001 e em relação ao grupo Sal + Formalina \* P<0,05 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 7,97 e F=30,93, respectivamente.

### 3.3 PARTICIPAÇÃO DE LEUCOTRIENOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Para avaliar a participação de leucotrienos na nocicepção induzida por formalina orofacial, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com o inibidor da 5-lipoxigenase, MK 886. A administração sistêmica de MK 886 nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, 1 h antes da injeção local de formalina 2,5% não modificou nenhuma das fases da resposta nociceptiva induzida por formalina (n=6) (figura 14).



**Figura 14: Efeito do Mk 886 administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com veículo (CMC- carboximetilcelulose 0,1% em salina, 1 ml/kg, i.p.) ou MK 886 (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p.) 1 h antes da injeção local de formalina (2,5 %, 50  $\mu$ l, s.c.) . Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=10). Significância estatística em relação ao grupo CMC + Salina, \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 5,922 e F=5,681, respectivamente.

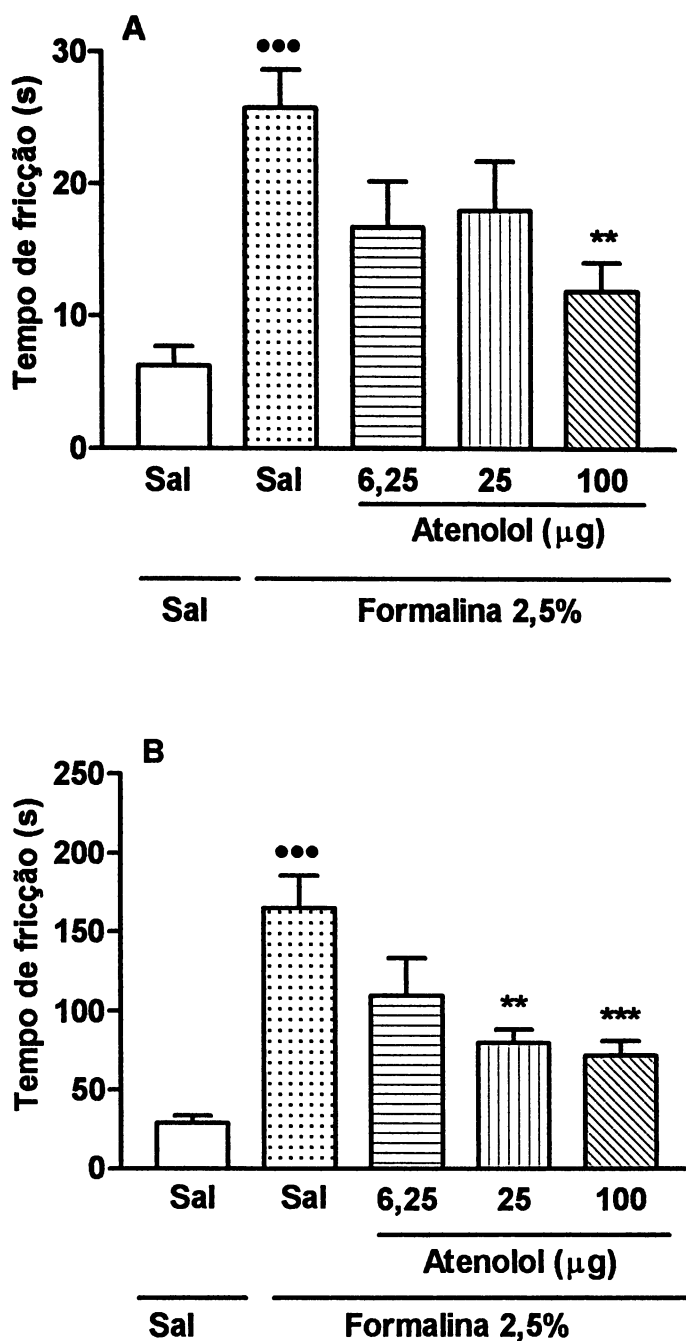
#### 4.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Para avaliar a participação do componente simpático na resposta nociceptiva induzida por formalina, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com o bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, atenolol, o efeito da depleção dos terminais noradrenérgicos através do tratamento com guanetidina, e o efeito do pré-tratamento com a amina simpatotomimética de ação indireta, tiramina.

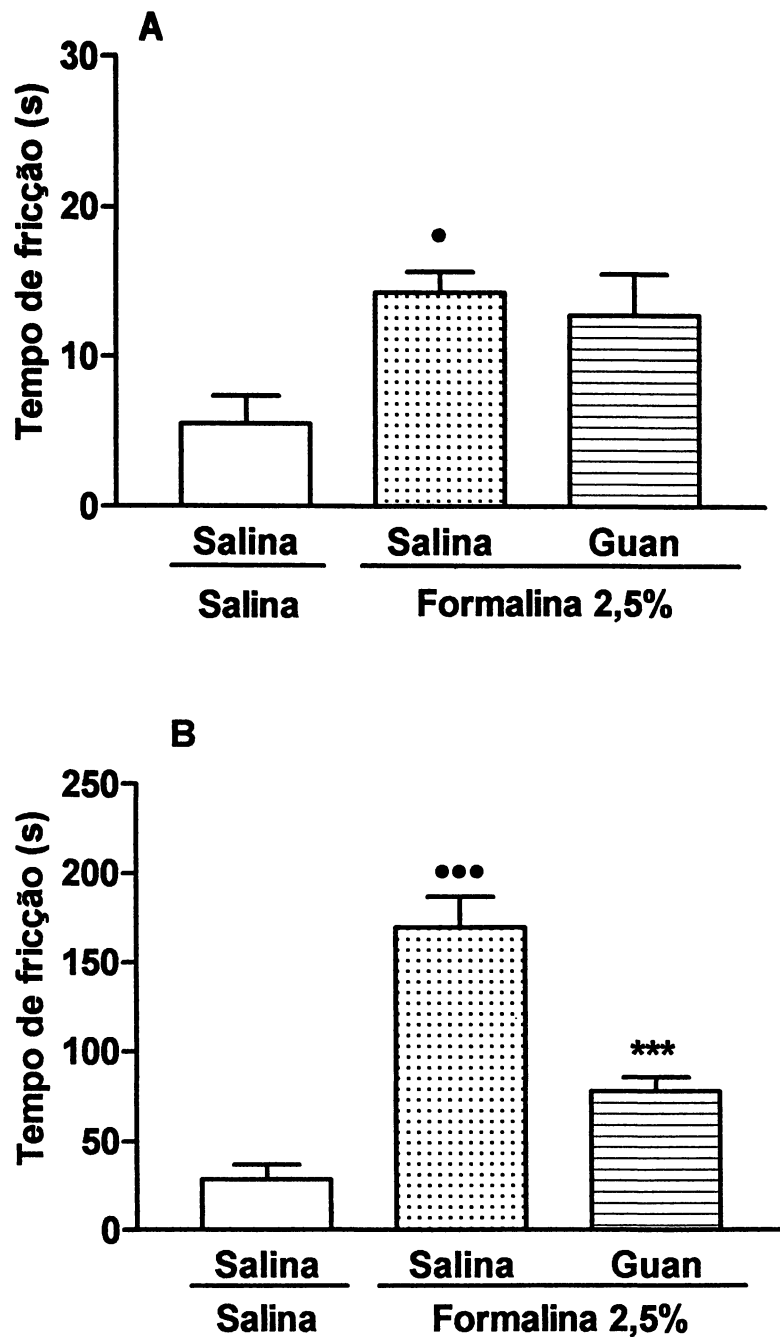
O atenolol administrado localmente nas doses de 6,25 e 25  $\mu$ g, 30 min antes do estímulo nocivo (formalina 2,5%), não modificou a fase I da resposta nociceptiva. No entanto a dose de 100  $\mu$ g reduziu em 54,3 % a fase I. Na fase II, as doses de 25 e 100  $\mu$ g reduziram em 51,3 e 56,3 %, respectivamente, a resposta nociceptiva induzida por formalina (n=10) (figura 15).

O pré-tratamento sistêmico (s.c.) com guanetidina (30 mg/kg) não modificou a fase I da resposta à formalina 2,5%, porém promoveu uma redução de 54,2 % na fase II em relação ao controle (n=6) (figura 16).

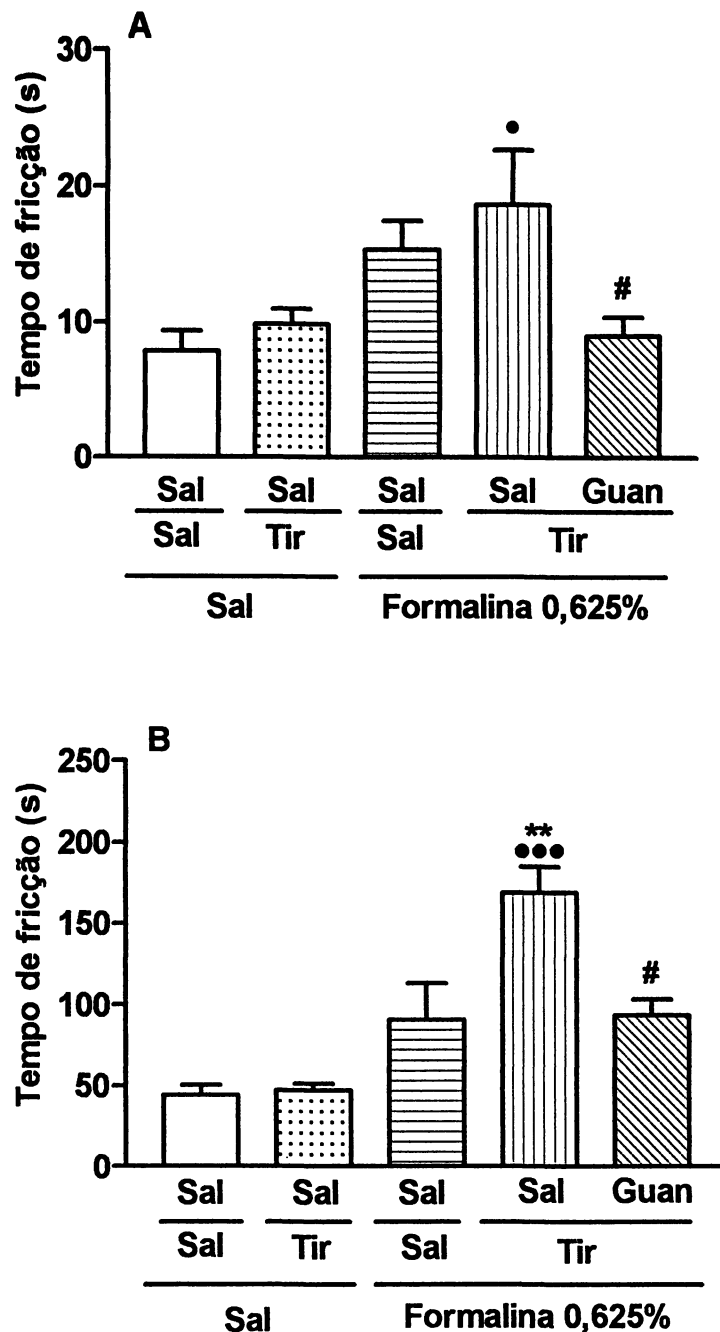
A administração local de tiramina (200  $\mu$ g) previamente a administração de salina não promoveu uma resposta nociceptiva diferente, em ambas as fases, do grupo que recebeu somente salina. A administração de uma dose baixa de formalina (0,625%) também não promoveu uma resposta nociceptiva significativamente diferente, em ambas as fases, do grupo que recebeu somente salina. No entanto, o pré-tratamento dos animais com tiramina (200 $\mu$ g) 2 h antes da administração de formalina 0,625% induziu uma resposta nociceptiva na fase I significativamente diferente em relação aos animais que receberam somente salina e na fase II significativamente diferente em relação aos animais que receberam somente salina ou salina e formalina (0,625%). O pré-tratamento sistêmico com guanetidina durante 3 dias reduziu a resposta nociceptiva dos animais que receberam tiramina e formalina em 51,9 % na fase I e 44,6 % na fase II (n=6) (figura 17).



**Figura 15: Efeito do atenolol administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu\text{l}$ , s.c.) ou atenolol (6,25 ; 25 ou 100  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ , s.c.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu\text{l}$ , s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu\text{l}$ , s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal \*\*\*P<0,001 e em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 6,3 e F=10,69, respectivamente.



**Figura 16: Efeito da guanetidina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (1ml/kg, s.c.) ou guanetidina (Guan 30 mg/kg, s.c.), durante 3 dias e no 4º dia receberam uma injeção local de salina (50 µl, s.c.) ou formalina (2,5%, 50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina, \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 5,108 e F=35,95, respectivamente.



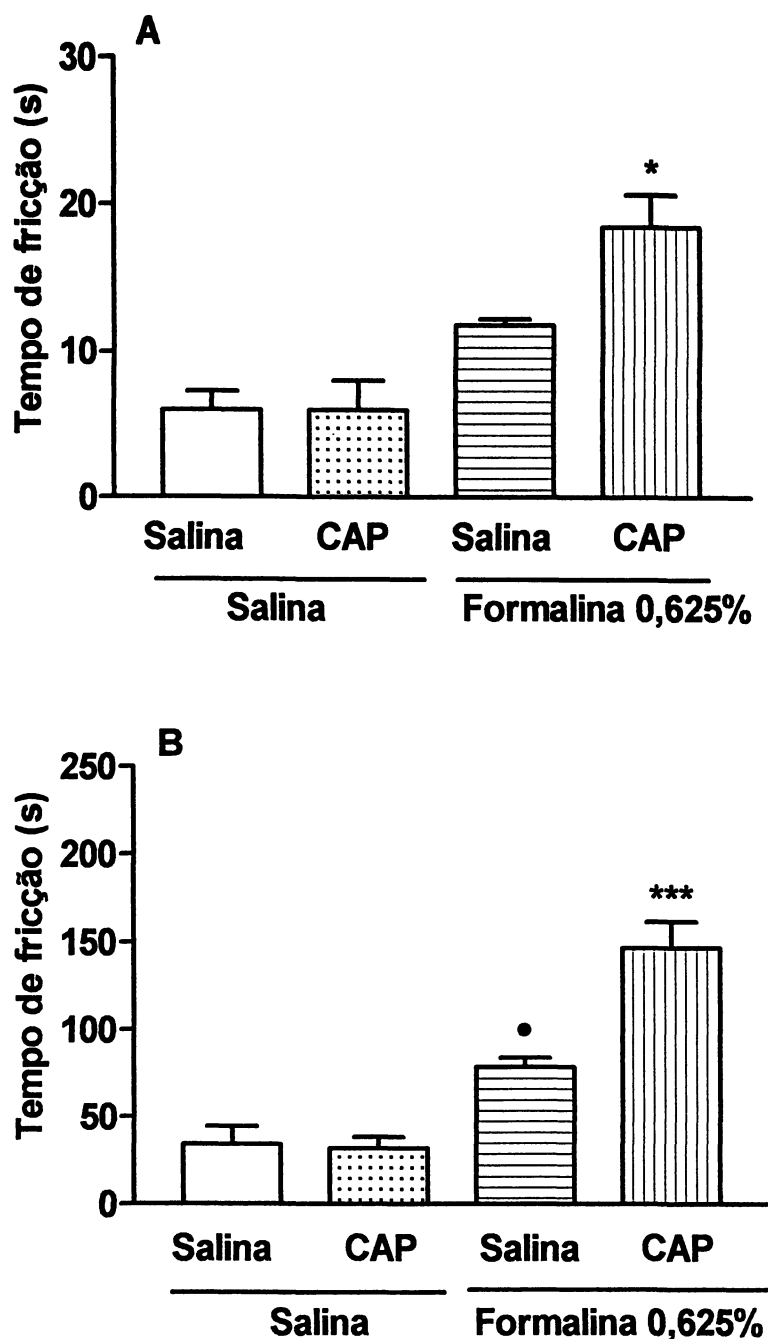
**Figura 17: Efeito da guanetidina administrada sistemicamente na potenciação da resposta nociceptiva à formalina pela administração local de tiramina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 1ml/kg, s.c.) ou guanetidina (Guan 30 mg/kg, s.c.), durante 3 dias e no 4º dia receberam uma injeção local de salina (Sal, 50 µl, s.c.) ou tiramina (Tir, 200 µg/50 µl, s.c.). Após 2 h receberam uma segunda injeção local de salina (50 µl, s.c.) ou formalina (0,625 %, 50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal + Sal, \*P<0,05 e \*\*\*P<0,01; em relação ao grupo Sal + Sal + Formalina \*\*P<0,01, e em relação ao grupo Sal + Tir + Formalina #P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 4,179 e F=14,08, respectivamente.

### 3.5 PARTICIPAÇÃO DA BRADICININA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

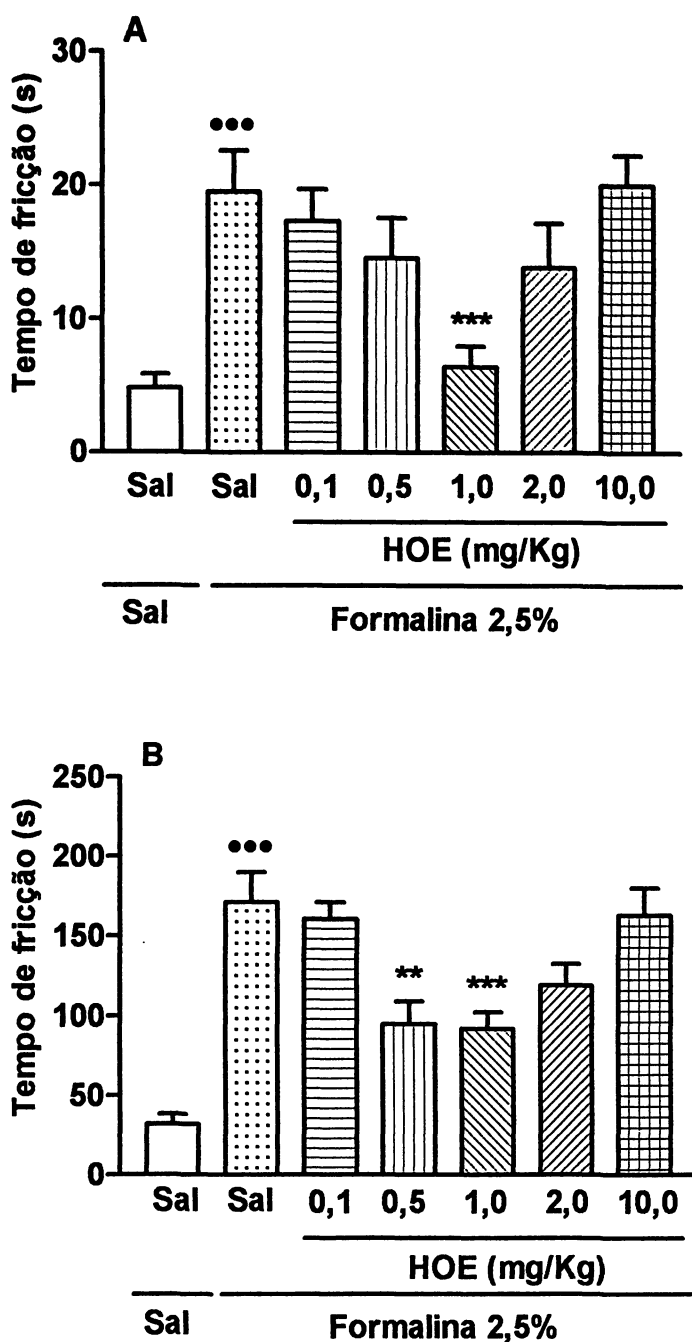
A participação da bradicinina na resposta nociceptiva à formalina foi inicialmente avaliada através do tratamento dos animais com captopril (inibidor da cininase II). A administração sistêmica de captopril na dose de 5 mg/kg, previamente a administração de salina não induziu uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais que receberam somente salina (figura 18). No entanto, este tratamento induziu uma resposta nociceptiva diferente em relação aos animais que receberam uma dose baixa de formalina (0,625%) em ambas as fases da resposta. O aumento da resposta em relação ao grupo que recebeu salina e formalina (0,625%) foi de 56,8% na fase I e 87,3% na fase II (n=6) (figura 18).

Para avaliar a participação de receptores B<sub>2</sub> de bradicinina na nocicepção induzida por formalina, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com HOE 140. Esse antagonista foi administrado sistemicamente nas doses de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 10,0 mg/kg, 1 h antes da injeção local de formalina 2,5%. Apenas a dose de 1,0 mg/kg reduziu a fase I da resposta em 67,2 %. Com relação a fase II, as doses de 0,5 e 1,0 mg/kg ocasionaram reduções de 44,4 e 46,0% respectivamente. Doses superiores a 1 mg/kg não modificaram a resposta nociceptiva (n=10) (figura 19).

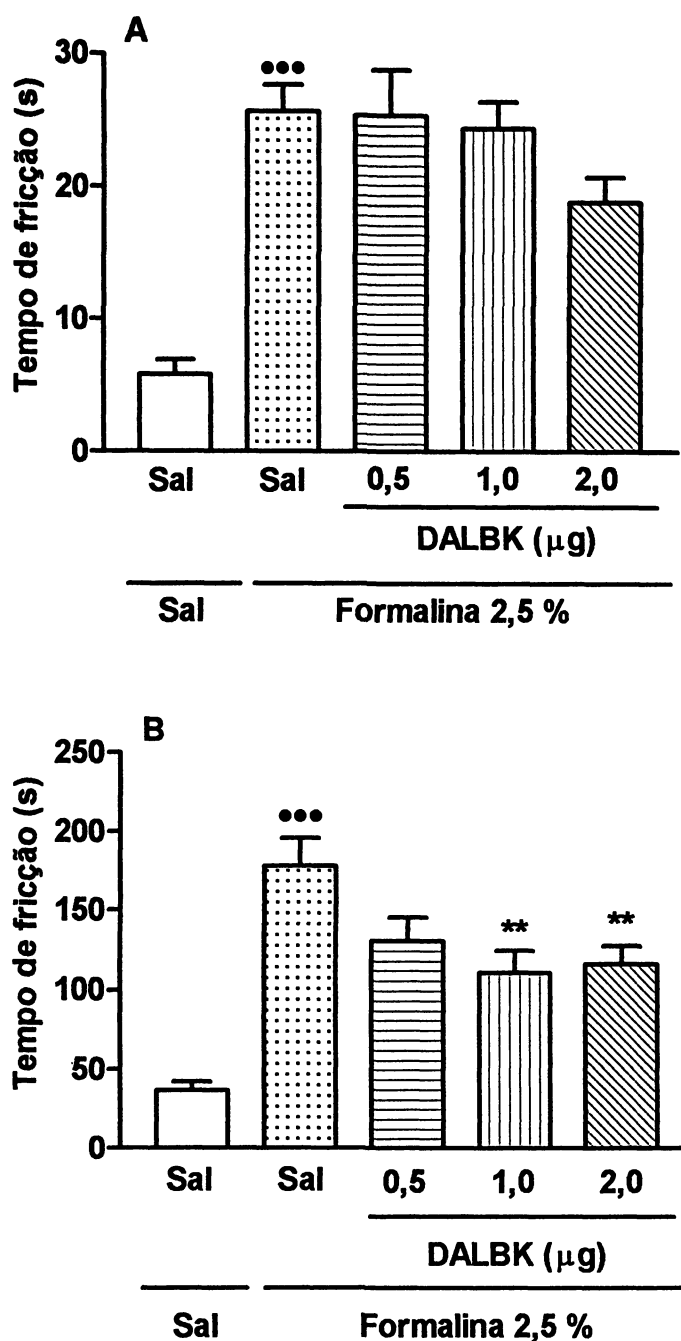
Para avaliar a participação da bradicinina através da ativação de receptores B<sub>1</sub> na nocicepção induzida por formalina, avaliou-se o efeito da administração local de DALBK. Esse antagonista foi administrado nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 µg, 30 min antes da injeção local de formalina 2,5%. O tratamento dos animais com DALBK nestas doses não modificou a fase I da resposta à formalina. No entanto, as doses de 1,0 e 2,0 µg reduziram a fase II em 38 e 34,5%, respectivamente, em relação ao controle (figura 20).



**Figura 18: Efeito do Captopril administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (1 ml/Kg, s.c.) ou Captopril (CAP 5,0 mg/kg, s.c.) 2 h antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina, \*P<0,05, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 13,19 e F=28,87, respectivamente.



**Figura 19: Efeito do HOE 140 administrado sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 1 ml/kg, s.c.) ou HOE 140 (HOE 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 10,0 mg/kg, s.c.) 1h antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=10). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina, \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 7,133 e F=15,10, respectivamente.



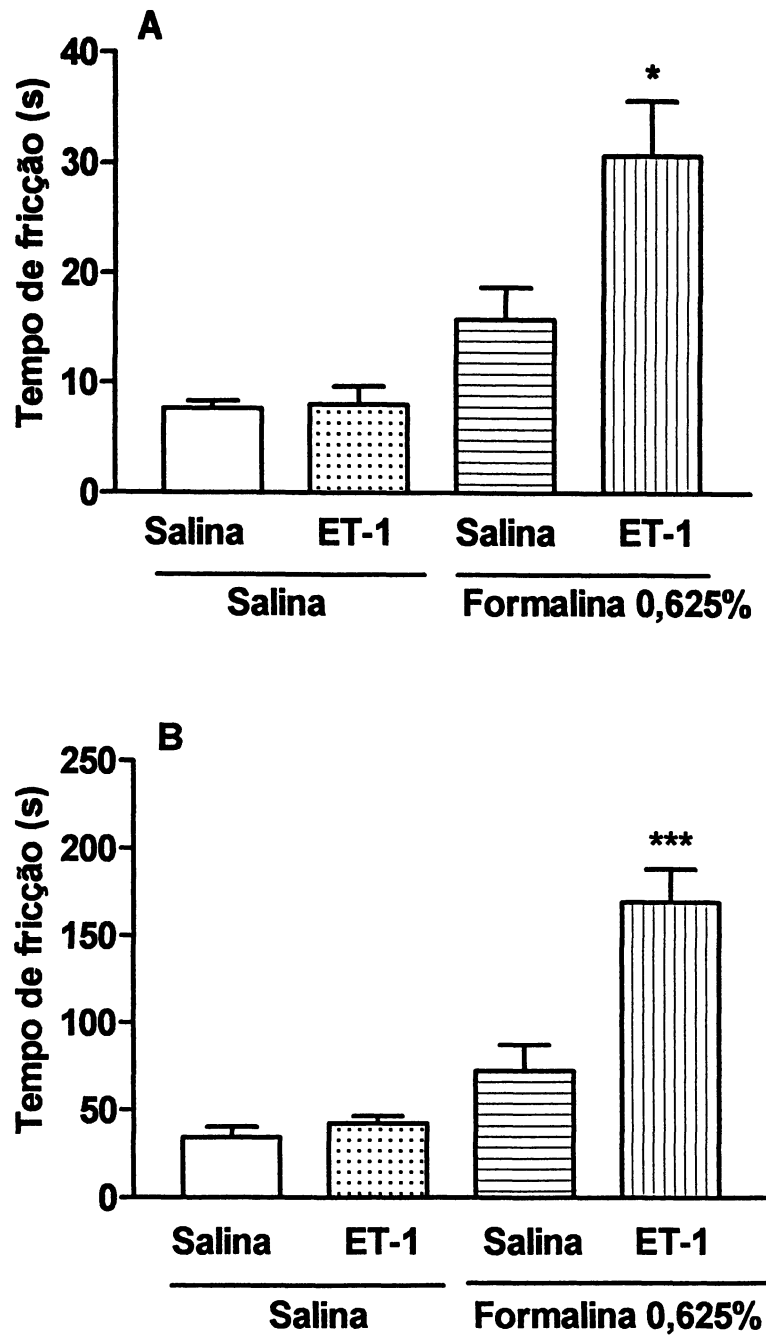
**Figura 20: Efeito do DALBK administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal 50 µl, s.c.) ou DALBK (0,5; 1,0 e 2,0 µg/50 µl, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50 µl, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal, \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Sal + Formalina \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F=13,78 e F=10,42, respectivamente.

### 3.6. PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

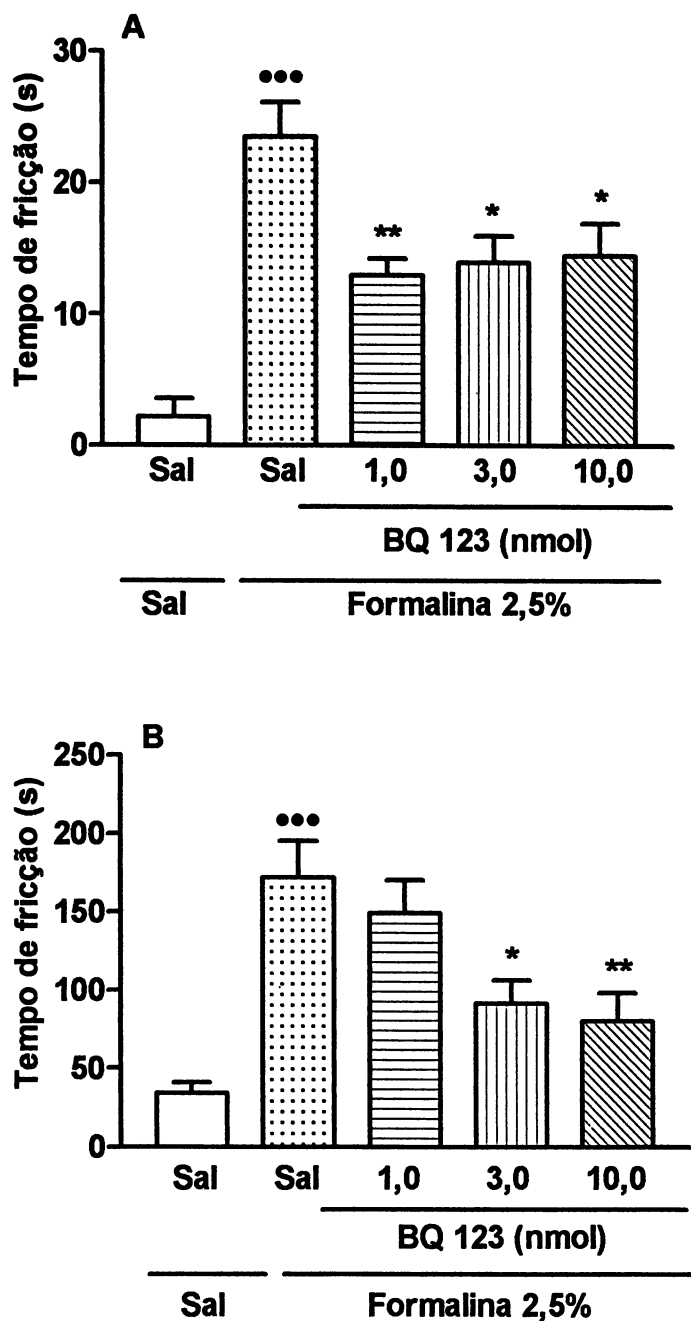
A ET-1 (10 pmol) administrada localmente 30 min antes da injeção de formalina 0,625% aumentou as fases I e II da resposta nociceptiva à formalina em 94,3% e 133,4%, respectivamente (n=6) (figura 21).

Para avaliar a participação das endotelinas através da ativação de receptores ET<sub>A</sub> na nocicepção induzida por formalina, foi realizado o pré-tratamento dos animais com BQ 123. O BQ 123 foi administrado localmente nas doses de 1,0; 3,0 e 10,0 nmol, 30 min antes da injeção de formalina 2,5%. Todas as doses testadas reduziram a fase I da resposta em 44,7; 40,4 e 38,3%, respectivamente. Com relação a fase II, as doses de 3,0 e 10,0 nmol ocasionaram reduções de 46,5 e 53%, respectivamente (n=6) (figura 22).

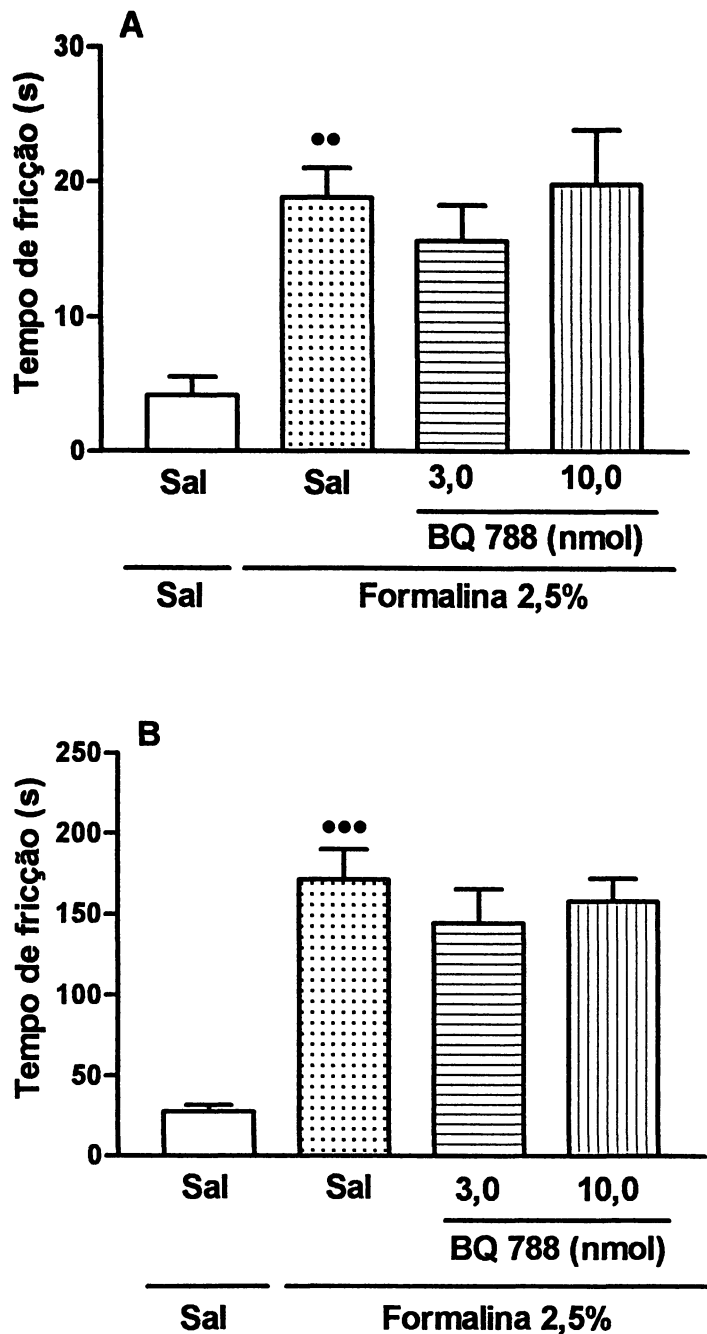
Para avaliar a participação de endotelinas através da ativação de receptores ET<sub>B</sub> na nocicepção induzida por formalina, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com BQ 788. O BQ 788 foi administrado localmente nas doses de 3,0 e 10,0 nmol, 30 min antes da injeção local de formalina 2,5%. Nenhuma das doses testadas modificou a resposta nociceptiva induzida por formalina na fase I e na fase II (n=6) (figura 23).



**Figura 21: Efeito da ET-1 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou ET-1 (10,0 pmol/50  $\mu$ l, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 10,9 e F=21,7, respectivamente.



**Figura 22: Efeito do BQ123 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou BQ 123 (1,0; 3,0 e 10,0 nmol/50  $\mu$ l, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina, \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05 e \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 11,53 e F=8,694, respectivamente.

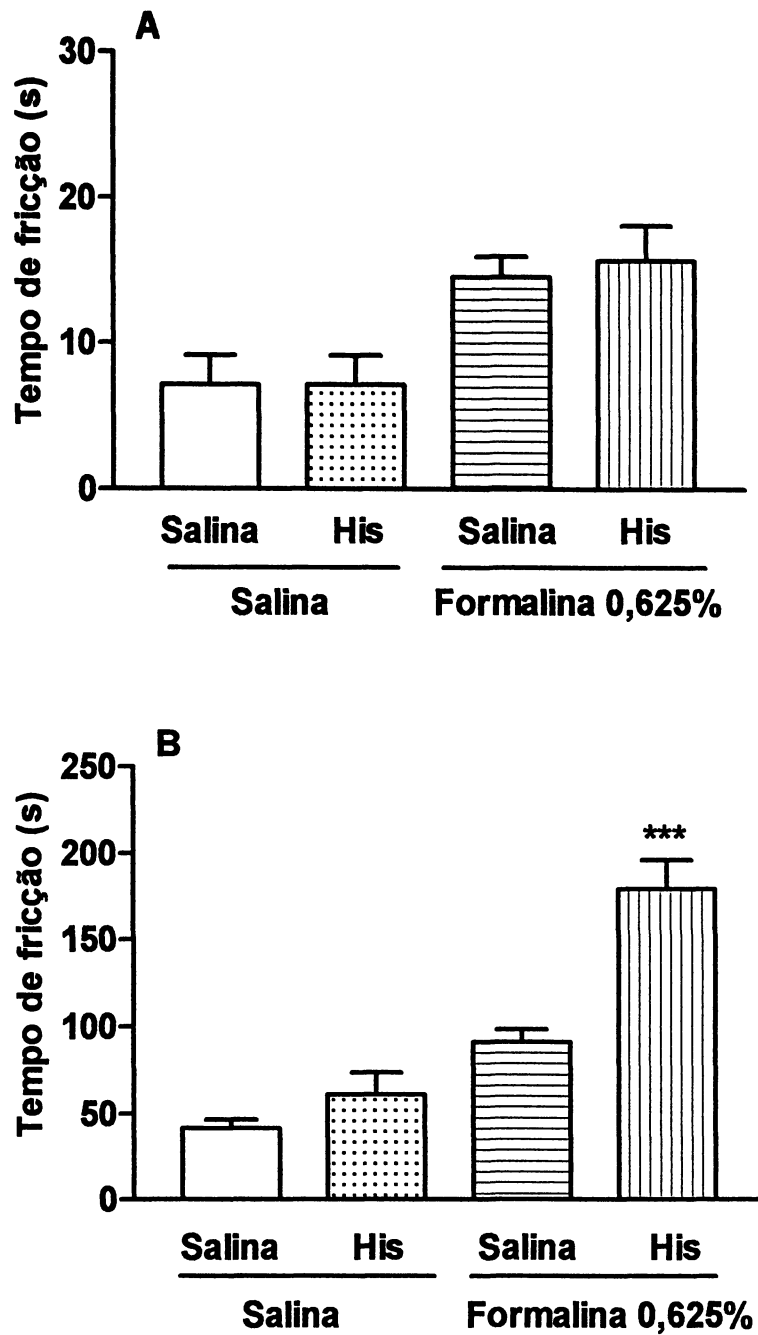


**Figura 23: Efeito do BQ788 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou BQ 788 (1,0; 3,0 e 10,0 nmol/50  $\mu$ l, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (2,5 %, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal, \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F=6,934 e F=17,55, respectivamente.

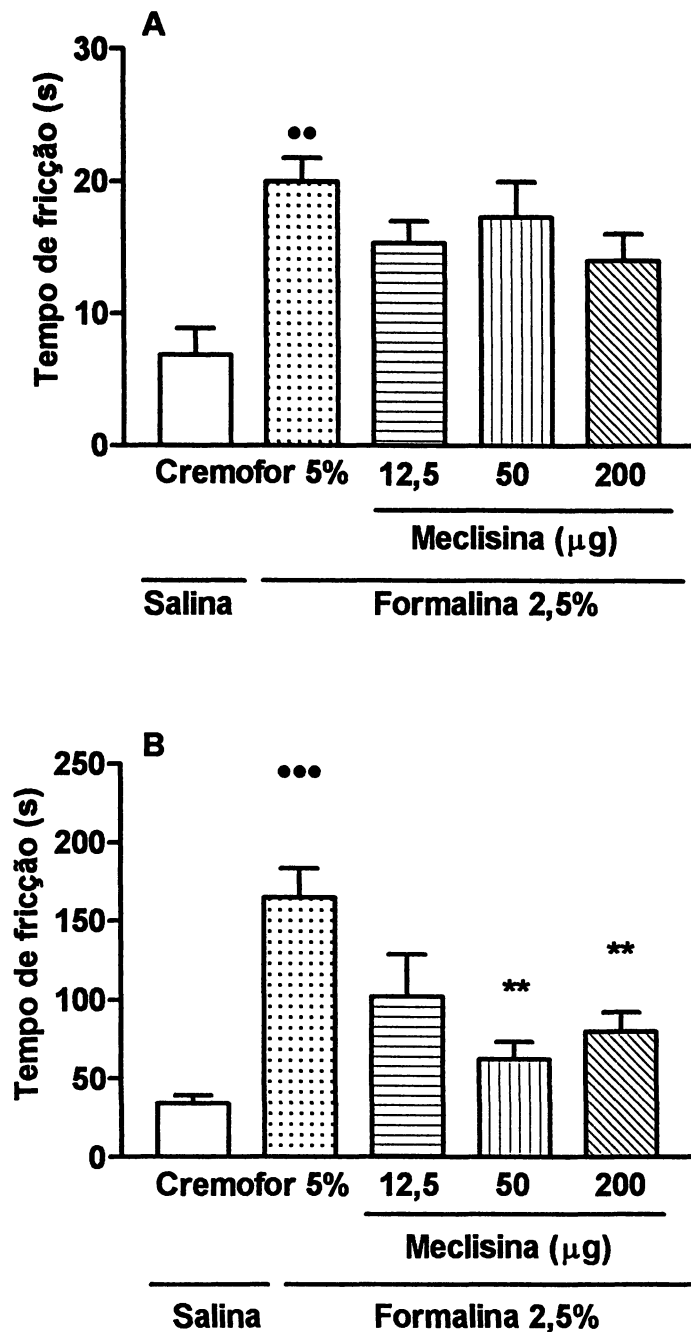
### 3.7 PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

A histamina (250 µg) administrada localmente 30 min antes da injeção de formalina 0,625% não modificou a fase I mas aumentou significativamente a fase II da resposta nociceptiva à formalina em 95,8% (n=6) (figura 24).

Para avaliar a participação da histamina via ativação de receptores H<sub>1</sub> na nocicepção induzida por formalina, avaliou-se o efeito do pré-tratamento dos animais com meclisina. A administração local de meclisina nas doses de 12,5; 50 e 200 µg, 30 min antes da injeção local de formalina 2,5% não modificou a fase I da resposta. No entanto, as doses de 50 e 200 µg reduziram em 62,0 e 51,5 % a fase II em relação ao controle (n=6) (figura 25).



**Figura 24: Efeito da histamina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (50  $\mu$ l.) ou histamina (His, 250  $\mu$ g/50  $\mu$ l, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 2,29 e F=28,17, respectivamente.



**Figura 25: Efeito da meclisina administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com veículo (Cremofor 5% em salina, 50 µl, s.c.) ou meclisina (12,5; 50 e 200 µg/50 µl, s.c.) 30 min antes da injeção local de formalina (2,5 %, 50 µl, s.c.). Animais controle receberam salina (50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=10). Significância estatística em relação ao grupo Cremofor + Salina \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Cremofor + Formalina, \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 5,544 e F=8,829, respectivamente.

### 3.8 PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

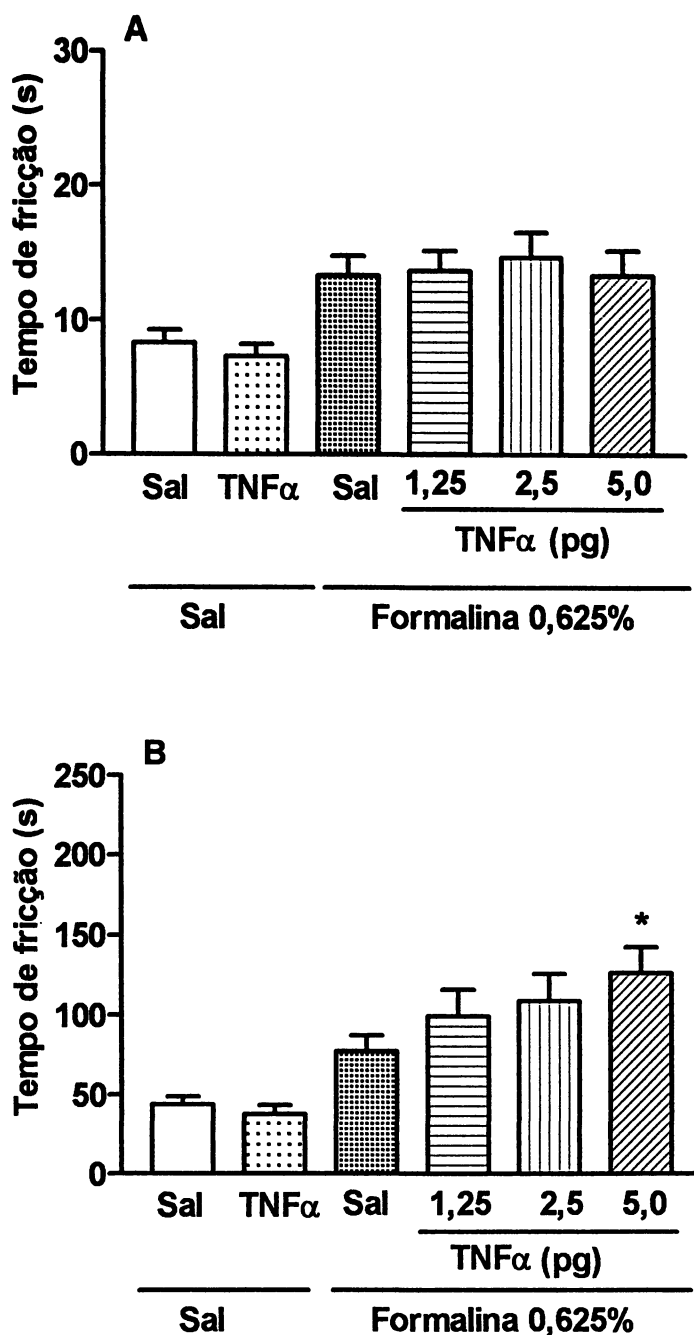
A administração local de  $\text{TNF}\alpha$  na dose de 5,0 pg previamente a administração de salina não promoveu uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais que receberam somente salina. O  $\text{TNF}\alpha$  administrado localmente nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 pg, 2 hs antes da injeção local de formalina 0,625%, também não modificou a fase I da resposta à formalina. No entanto, a dose de 5,0 pg causou um aumento de 72,1% na fase II da resposta (n=10) (figura 26). Em adição, o tratamento local com um anticorpo específico anti- $\text{TNF}\alpha$ , 1 h antes da injeção de formalina 2,5%, não modificou a fase I da resposta à formalina, mas reduziu a fase II em 46,1% (n=6) (figura 27).

A administração de  $\text{IL-1}\beta$ , na dose de 0,5 pg, previamente à administração de salina também não promoveu uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais tratados apenas com salina. Quando a  $\text{IL-1}\beta$  foi administrada localmente nas doses de 0,125; 0,25 e 0,5 pg, 2 hs antes da injeção de formalina 0,625%, não foi observada redução na fase I da resposta à formalina. No entanto, a dose de 0,5 pg causou um aumento de 60,8% na fase II da resposta (n=10) (figura 28). Em adição, o tratamento local com antisoro anti- $\text{IL-1}\beta$  1 h antes da injeção de formalina 2,5% no mesmo local, não modificou a fase I, mas reduziu a fase II em 48,4 % (n=6) (figura 29).

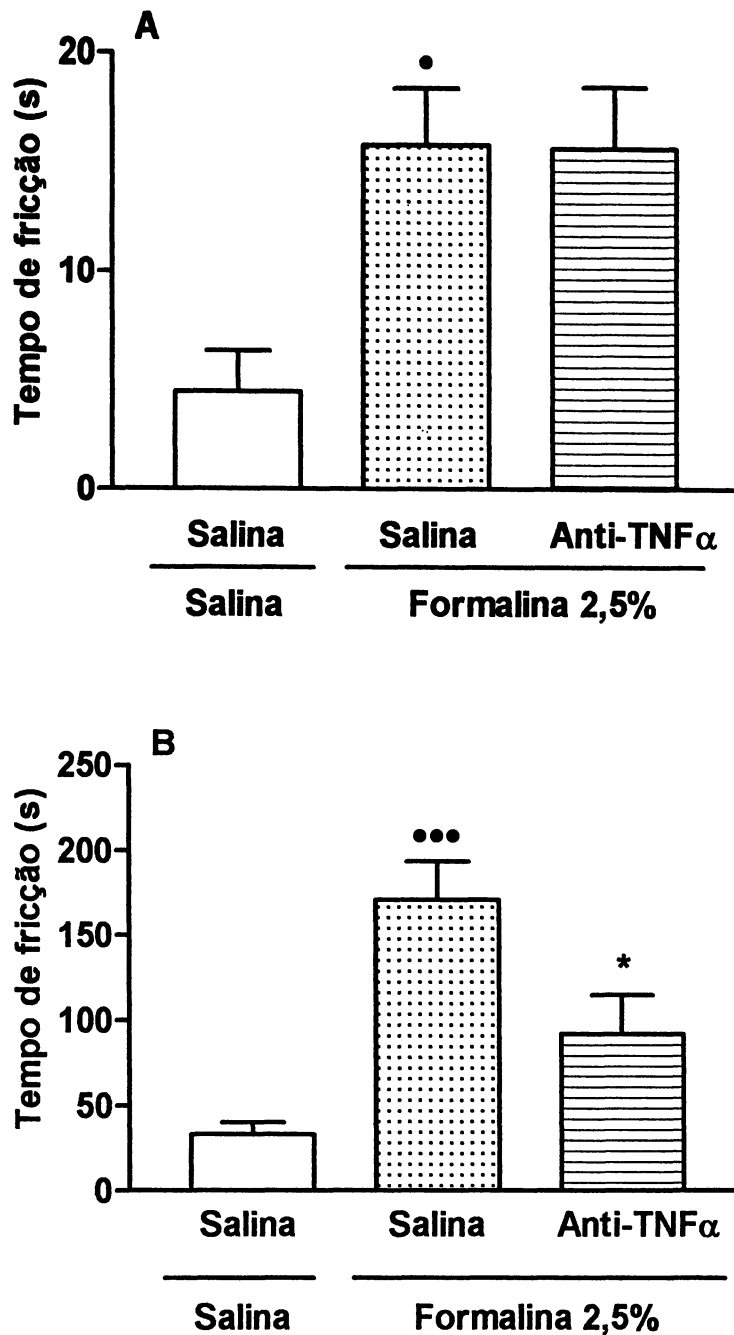
A administração de  $\text{IL-6}$  na dose de 2,0 ng, previamente à administração de salina, não promoveu uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais que receberam somente salina. O pré-tratamento local com  $\text{IL-6}$  nas doses de 1,0 e 1,5 ng, 2 hs antes da injeção de formalina 0,625%, também não modificou a fase I da resposta à formalina. No entanto, a dose de 2,0 ng causou um aumento de 83,6% na fase II da resposta (n=10) (figura 30). O tratamento local dos animais com antisoro anti- $\text{IL-6}$ , 1 h antes da injeção local de formalina 2,5%, não modificou a fase I da resposta à formalina, mas reduziu a fase II em 46,7% (n=6) (figura 31).

A  $\text{IL-8}$  administrada localmente na dose de 200 pg previamente à administração de salina não induziu uma resposta nociceptiva significativamente

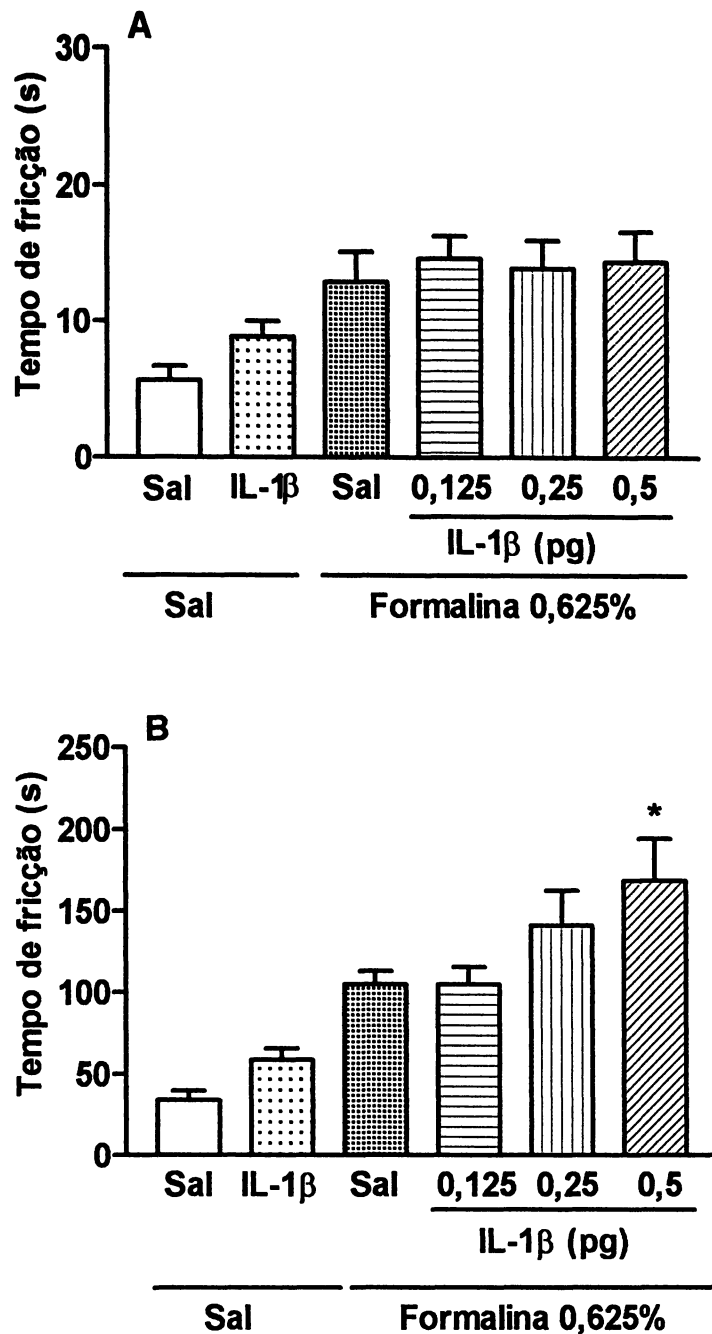
diferente dos animais que receberam somente salina. A administração local de IL-8 nas doses de 100 e 200 pg, 2 hs antes da injeção de formalina 0,625%, não modificou a fase I da resposta à formalina. No entanto, a dose de 200 pg causou um aumento de 70,2% na fase II da resposta (n=10) (figura 32). Quando foi realizado o tratamento local com antisoro anti-IL-8, 1 h antes da injeção de formalina 2,5%, não foi observada redução na fase I da resposta à formalina, mas a fase II foi reduzida em 42,9% em relação ao controle (n=6) (figura 33).



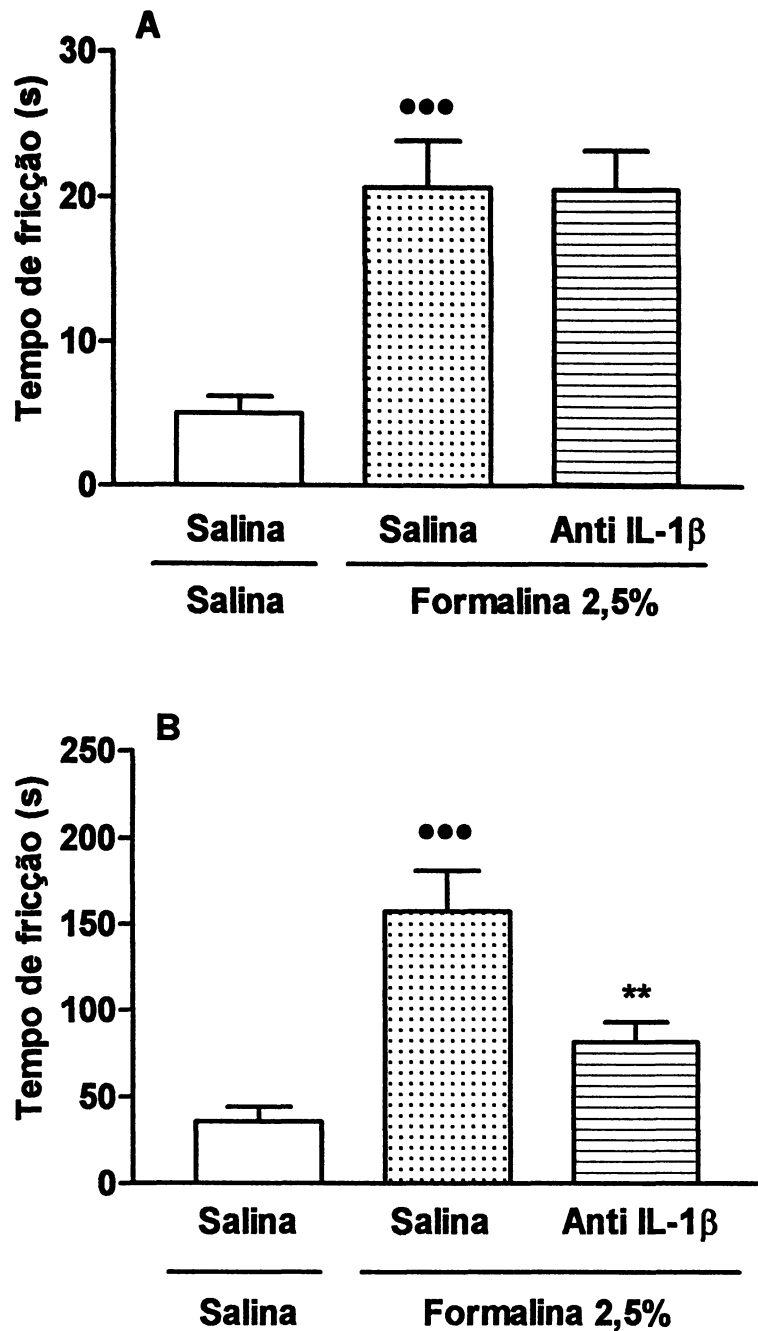
**Figura 26: Efeito do TNF $\alpha$  administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou TNF $\alpha$  (1,25; 2,5 e 5,0 pg/50  $\mu$ l, s.c.), 2 h antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 4,499 e F=7,610, respectivamente.



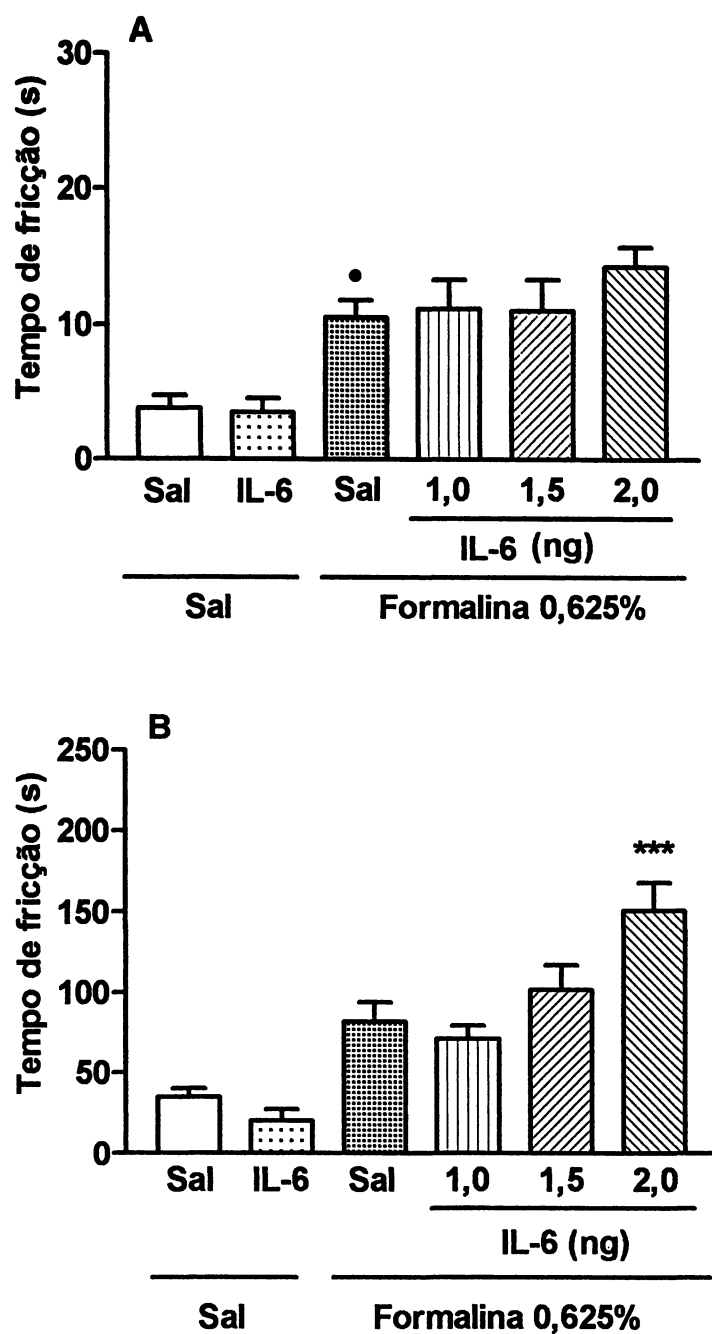
**Figura 27: Efeito do anticorpo anti-TNF $\alpha$  administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (50  $\mu$ l, s.c.) ou anti - TNF $\alpha$  (25 pg/50  $\mu$ l, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (2,5 %, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 7,037 e F=13,53, respectivamente.



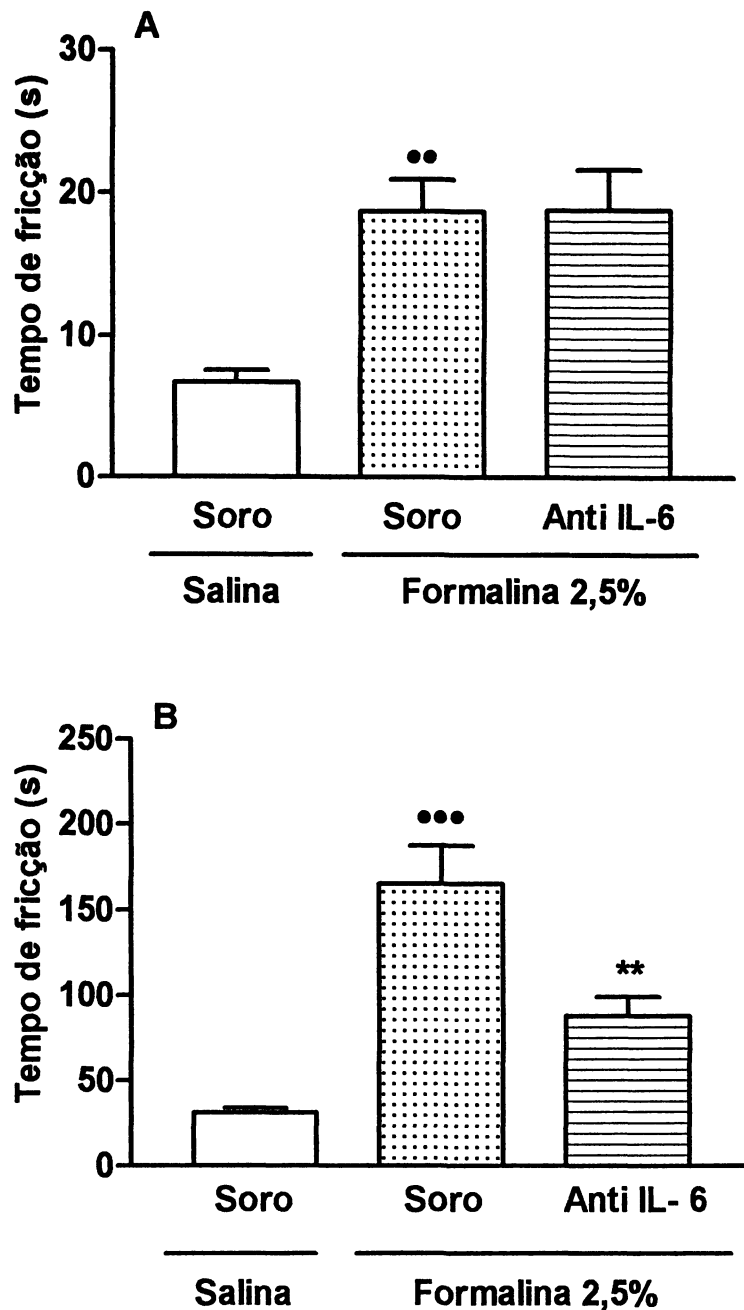
**Figura 28: Efeito da IL-1 $\beta$  administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou IL-1 $\beta$  (0,125; 0,25 e 0,5 pg/50 $\mu$ l, s.c.), 2 h antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F=3,890 e F=10,12, respectivamente.



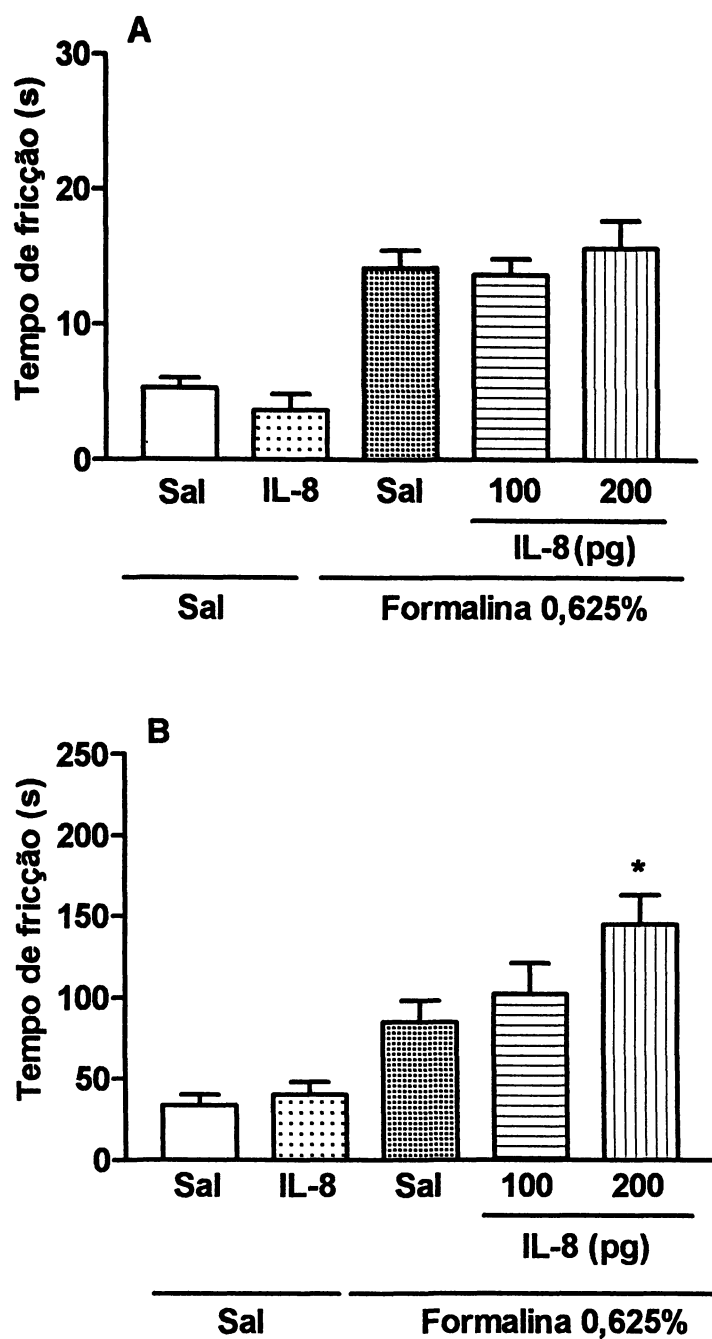
**Figura 29: Efeito do antisoro anti- IL-1 $\beta$  administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (50  $\mu$ l, s.c.) ou anti - IL-1 $\beta$  (diluído 1:5 em salina, 50  $\mu$ l, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (2,5 %, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina <sup>\*\*\*</sup>P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina <sup>\*\*</sup>P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 15,06 e F=12,99, respectivamente.



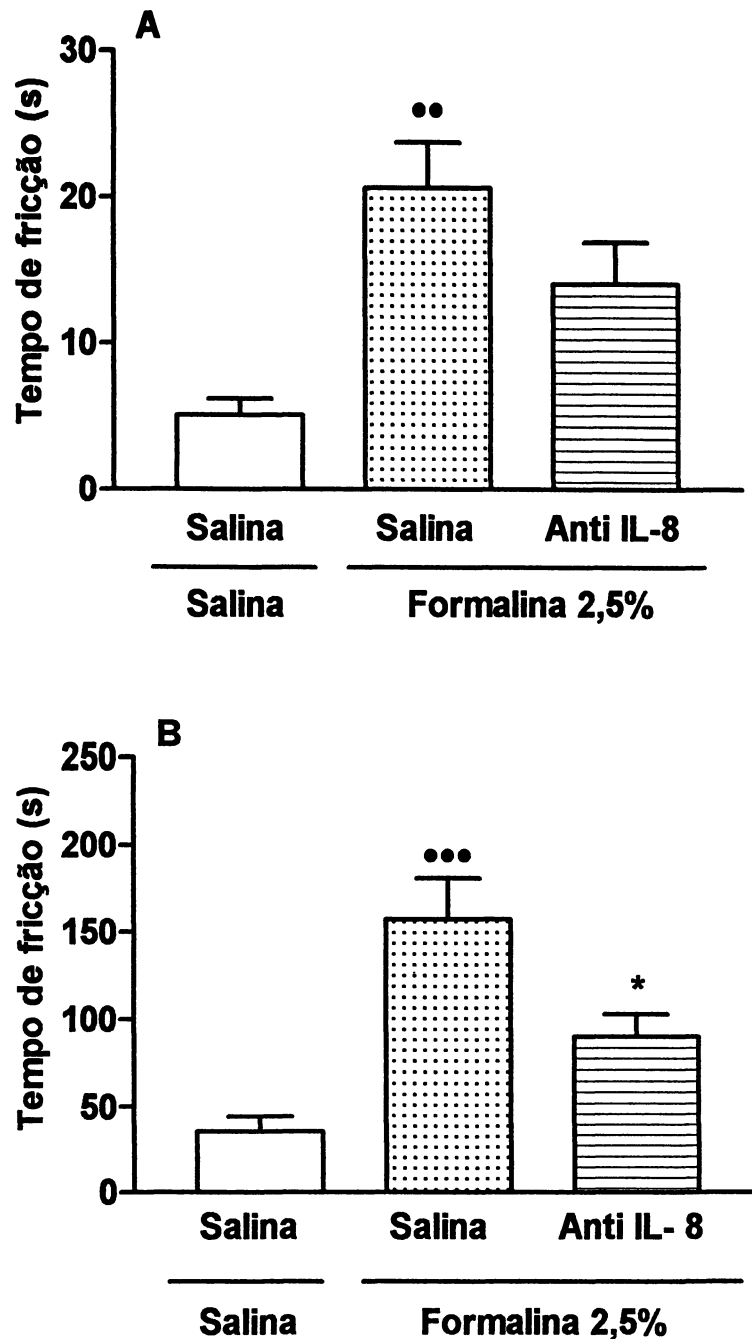
**Figura 30: Efeito da IL-6 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou IL-6 (1,0; 1,5 e 2,0 ng/50  $\mu$ l, s.c.), 2 hs antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística mínima em relação ao grupo Salina + Salina \*P<0,05, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 8,8 e F=14,87, respectivamente.



**Figura 31: Efeito do antisoro anti-IL-6 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com soro pré-imune (50  $\mu$ l, s.c.) ou anti - IL-6 (50  $\mu$ l, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=10). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina \*P<0,05 e \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 5,7 e F=10,5, respectivamente.



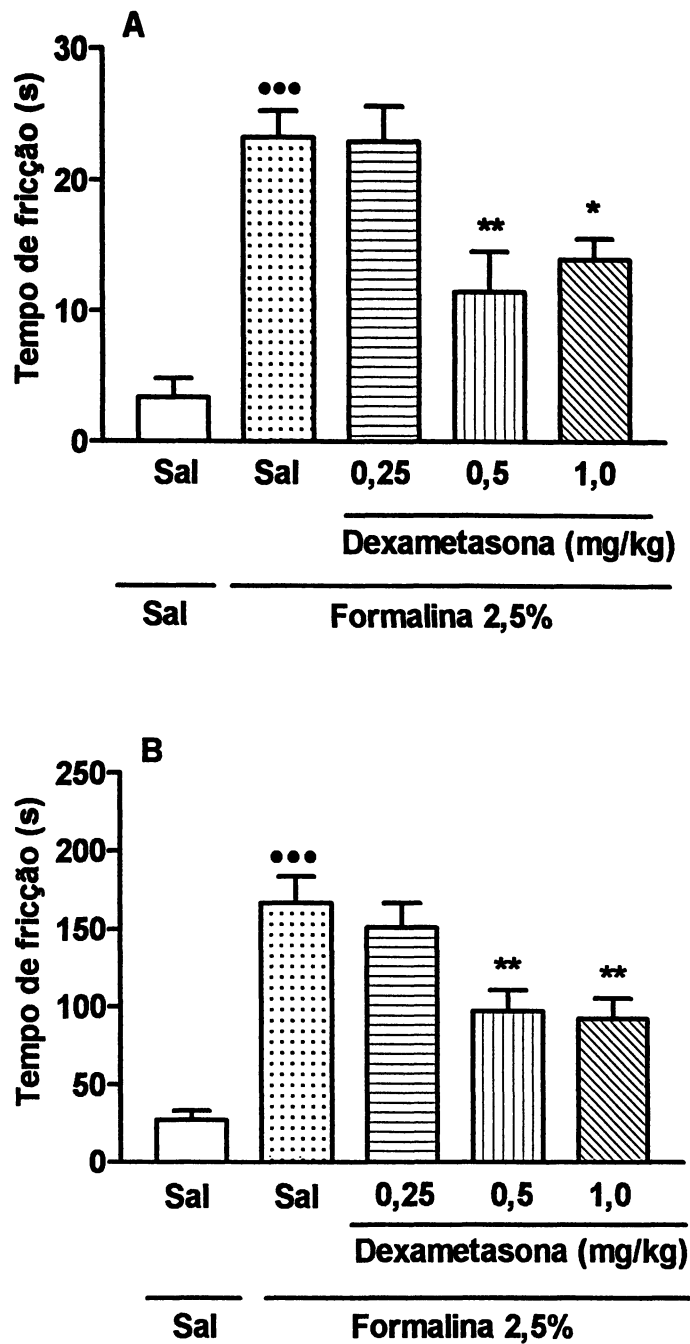
**Figura 32: Efeito da IL-8 administrada localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.) ou IL-8 (100 e 200 pg/50 $\mu$ l, s.c.), 2 h antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 11,11 e F=7,949, respectivamente.



**Figura 33: Efeito do antisoro anti-IL-8 na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (50  $\mu$ l, s.c.) ou anti-IL-8 (diluído 1:5 em salina, 50  $\mu$ l, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*P<0,05. Os valores de F para as fases I e II são: F= 9,376 e F=14,17, respectivamente.

### 3.9 EFEITO DO TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM DEXAMETASONA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

O pré-tratamento sistêmico com dexametasona nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg, 1 h antes da administração local de formalina 2,5%, reduziu a fase I da resposta à formalina em 50,6 e 39,9%, respectivamente. Com relação à fase II da resposta nociceptiva induzida por formalina, as doses de 0,5 e 1,0 mg/kg ocasionaram reduções de 42 e 44,8%, respectivamente, em relação ao grupo controle. A administração de dexametasona na dose de 0,25 mg/kg não modificou a resposta à formalina (n = 6) (figura 34).



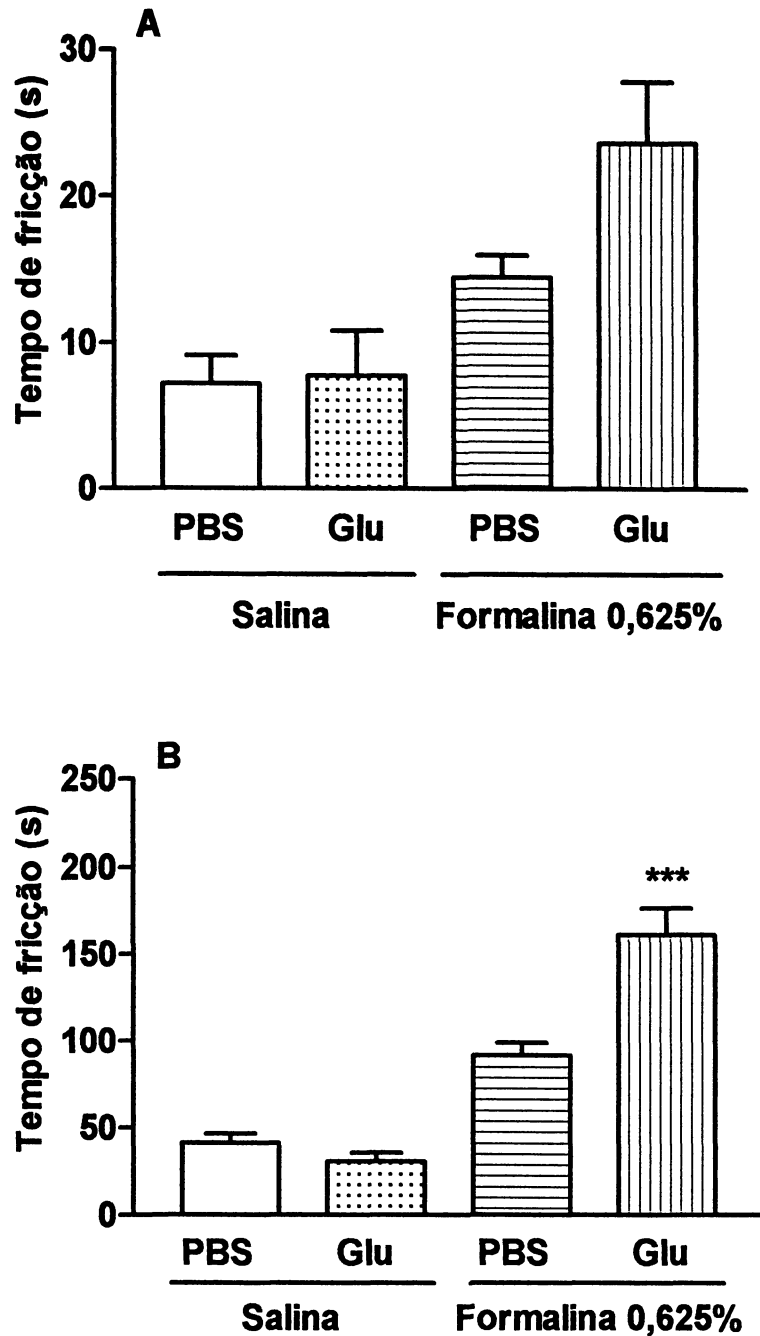
**Figura 34: Efeito da dexametasona administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com salina (sal, 1 ml/kg, s.c.) ou dexametasona (0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg, s.c.), 1 h antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.) Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Sal + Formalina \*P<0,05 e \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 16,0 e F=17,13, respectivamente.

### 3.10 PARTICIPAÇÃO DO GLUTAMATO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

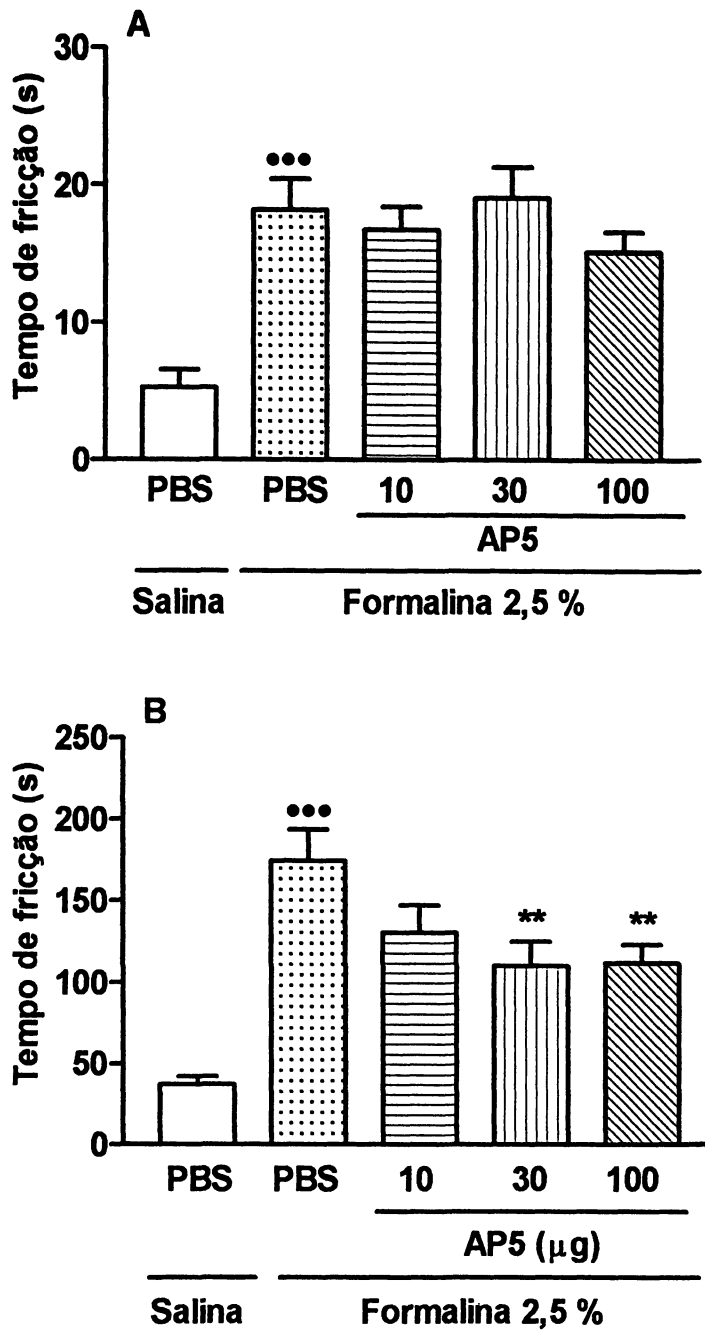
A administração local de glutamato na dose de 100 nmol previamente a administração de salina não promoveu uma resposta nociceptiva significativamente diferente dos animais que receberam somente salina. O glutamato administrado localmente nesta dose 30 minutos antes da injeção local de formalina 0,625%, também não modificou a fase I da resposta à formalina, no entanto causou um aumento de 76,2% na fase II da resposta (n=6) (figura 35).

O pré-tratamento local com o antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (AP-5) nas doses de 10, 30 e 100 µg, 30 min antes da administração de formalina 2,5% não modificou a fase I da resposta, no entanto as mesmas doses reduziram a fase II em 36,7; 35,8 e 45,6 %, respectivamente (n= 10) (figura 36).

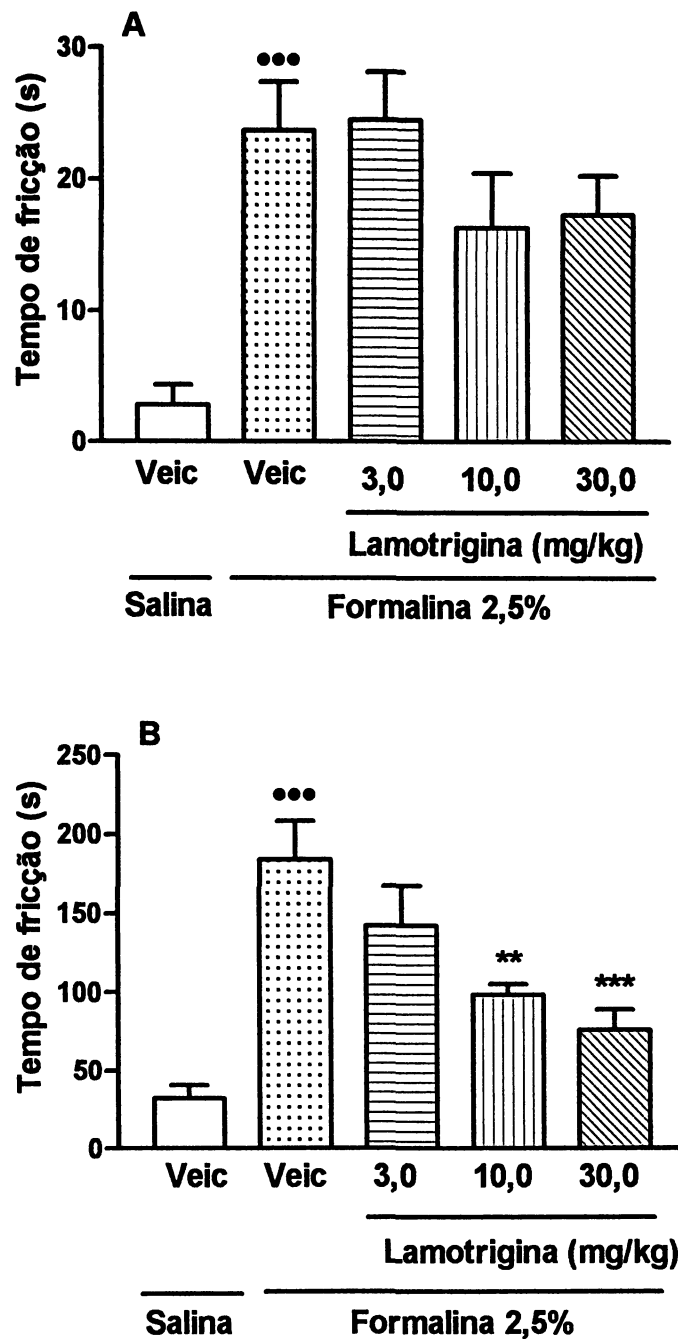
O pré-tratamento sistêmico dos animais com lamotrigina também não modificou a fase I da resposta à formalina, no entanto as doses de 10 e 30 mg/kg reduziram significativamente a fase II em 46,6 e 58,9%, respectivamente (n=6) (figura 37).



**Figura 35: Efeito do glutamato administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina .** Os animais foram tratados com PBS (50  $\mu$ l, s.c.) ou glutamato (100 nmol/50 $\mu$ l, s.c.), 30 min antes da injeção local de formalina (0,625%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min)(n=6). Significância estatística em relação ao grupo PBS + Formalina \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 7,25 e F=36,8, respectivamente.



**Figura 36: Efeito do AP-5 administrado localmente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com PBS (50 µl s.c.) ou AP-5 (10; 30 e 100 µg, s.c.), 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50 µl, s.c.). Animais controle receberam salina (Sal, 50 µl, s.c.). Os dados mostram a média ± EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=10). Significância estatística em relação ao grupo Sal + Sal \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Sal + Formalina \*\*P<0,01. Os valores de F para as fases I e II são: F= 9,6 e F=14,3, respectivamente.



**Figura 37: Efeito da lamotrigina administrada sistemicamente na resposta nociceptiva induzida por formalina.** Os animais foram tratados com veículo (1 ml/Kg, i.p.) ou lamotrigina (3,0; 10,0 e 30,0 mg/kg, i.p.) 30 min antes da injeção local de formalina (2,5%, 50  $\mu$ l, s.c.). Animais controle receberam salina (50  $\mu$ l, s.c.). Os dados mostram a média  $\pm$  EPM do tempo de fricção no local na fase I (painel A: 0-3 min) e na fase II (painel B: 12-30 min) (n=6). Significância estatística em relação ao grupo Salina + Salina, \*\*\*P<0,001, e em relação ao grupo Salina + Formalina \*\*P<0,01 e \*\*\*P<0,001. Os valores de F para as fases I e II são: F= 6,7 e F=11,4, respectivamente.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 CURVA DOSE-RESPOSTA DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

A dor inflamatória está associada à presença de mediadores que ativam ou sensibilizam as vias aferentes primárias (FERREIRA, 1983). Um dos modelos amplamente utilizados para o estudo da dor inflamatória é o teste de formalina. Existem várias evidências indicando que diferentes processos estão envolvidos na primeira e na segunda fase de resposta à formalina (TJOLSEN et al., 1992). Enquanto a primeira fase é devido a irritação química direta da formalina no nociceptor, a segunda fase é considerada um modelo de dor aguda associado com injúria tecidual e inflamação (TJOLSEN et al., 1992; FRANKLIN e ABBOTT, 1989).

Em nosso estudo, a administração subcutânea de formalina no lábio superior dos animais nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 3,75 e 5% induziu uma resposta de fricção do local injetado que se mostrou mais intensa nos 3 primeiros minutos após a injeção. Este período foi considerado a fase I da resposta à formalina. Estes dados estão de acordo com CLAVELOU et al. (1995), que demonstraram que a injeção de formalina no lábio nas concentrações entre 0,2 a 10% induziram uma resposta inicial cuja duração não excedia 3 minutos após a injeção. Nos estudos de CLAVELOU et al. (1995), a concentração de 1,5% de formalina promoveu a amplitude máxima de resposta nesta primeira fase, porém sem diferença significativa entre as concentrações. Em nosso estudo, observamos que na primeira fase a concentração de formalina de 2,5% induziu uma resposta nociceptiva que não apresentou diferença significativa das respostas induzidas por concentrações maiores (3,75 e 5%). ROSLAND et al. (1990) observaram que a fase I da resposta nociceptiva à formalina administrada na pata de camundongos aumentou de maneira dose-dependente até a concentração de 1,5%. Com a utilização de concentrações superiores a esta os animais apresentaram uma redução da resposta nociceptiva. Em ratos, WHEELER-ACETO e COWAN (1993) observaram uma diminuição do tempo de lambida da pata durante a fase I com concentrações superiores a 1,5% e até mesmo ausência da atividade com a utilização de concentrações maiores (15%). Durante a fase I, a utilização de altas concentrações

de formalina administrada tanto lábio superior quanto na pata parece induzir outros comportamentos, como por exemplo longos períodos de imobilidade, que se sobrepõe aos comportamentos de fricção da face, ou lambida e elevação da pata (CLAVELOU et al., 1995; WHEELER-ACETO e COWAN, 1993).

Após o intervalo de tempo determinado como fase I, os animais apresentaram um período de relativa inatividade. A partir de 12 minutos, observou-se o início de um novo pico de resposta que se estendeu até 30 minutos, sendo este período considerado a fase II da resposta à formalina. Mesmo prolongando a observação dos animais até os 45 minutos, após 30 minutos era observada uma diminuição na resposta nociceptiva. Na fase II da resposta, as menores concentrações utilizadas (0,625 e 1,25%) não mostraram-se confiáveis para o uso em experimentos posteriores para avaliação do efeito antinociceptivo das drogas por não apresentarem diferença significativa em relação ao grupo de animais tratados apenas com salina. No entanto, por apresentar esta característica, o uso da concentração de 0,625% de formalina foi estabelecido em experimentos que visassem avaliar o efeito de drogas que pudessem levar a um aumento da resposta nociceptiva, o qual poderia ser um indicativo de que a presença de determinado mediador poderia ser importante nesta resposta. As concentrações superiores a 2,5% pareciam induzir outras reações comportamentais, como por exemplo longos períodos de imobilidade, como descrito anteriormente para a fase I.

De maneira similar, os estudos de CLAVELOU et al. (1995), demonstraram que, na fase II, a resposta à formalina orofacial aumentava de maneira concentração-dependente, até atingir a amplitude máxima na concentração de 2,5%. A administração de concentrações mais altas (5 e 10%) estavam associadas com a diminuição da fricção do local. De maneira similar, FANSELOW e BAACKES (1982) descreveram que altas concentrações de formalina induzem reações comportamentais raramente vistas com a utilização de concentrações mais baixas, as quais podem interferir com o comportamento primário.

Assim como no teste de formalina orofacial, no teste de formalina na pata também foi observada esta relação entre a concentração de formalina utilizada e o tempo de lambida da pata injetada em ratos e camundongos (ROSLAND et al. 1990; WHEELER-ACETO e COWAN, 1993). Deste modo, a administração de concentrações mais elevadas de formalina (5 a 15%) também eram associadas com

uma diminuição do tempo de lambida ou do tempo de elevação da pata injetada (WHEELER-ACETO e COWAN, 1993; CODERRE, et al., 1993).

Podem ser citados ainda outros fatores que dão suporte à utilização de concentrações de formalina variando entre 1,5 a 2,5 %, dentre eles o fato de que a utilização de altas concentrações de formalina podem ocasionar uma diminuição no grau de dor que poderá não ser suficiente para demonstrar o efeito antinociceptivo da droga testada (CLAVELOU et al. 1995). Outro argumento contra o uso de altas concentrações de formalina é baseado em dados histológicos, que mostram que com a utilização de concentrações entre 2,5 a 10 %, a cicatrização do tecido ainda não está completa 10 dias após a injeção, indicando dano persistente (ROSLAND et al. 1990). Além disso, concentrações menores de formalina induzem menos sofrimento aos animais.

A concentração de formalina de 2,5% foi selecionada para experimentos posteriores por induzir uma resposta nociceptiva em ambas as fases, sem atingir a amplitude máxima de resposta na fase I, e por ser a menor dose capaz de causar uma resposta significativa na fase II.

Após a padronização da metodologia e estabelecimento das doses de formalina que seriam utilizadas nos próximos experimentos, nosso objetivo foi avaliar a participação dos derivados do ácido araquidônico e das aminas simpatomiméticas na resposta à formalina orofacial, pois estes mediadores são considerados os dois principais componentes da hiperalgesia inflamatória.

#### 4.2 PARTICIPAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Diversos estudos, utilizando a metodologia de formalina na pata ou outras metodologias de dor inflamatória, têm demonstrado que a administração de PGs leva à sensibilização dos nociceptores (RAMWELL et al., 1966; FERREIRA, 1983; THOMAZZI et al., 1997). A maior parte destes estudos utiliza AINE para avaliar a participação das PGs, e dentre estas drogas a indometacina é a mais utilizada. Neste estudo a participação das PGs foi inicialmente avaliada através da administração local ou sistêmica de indometacina.

A indometacina pertence a classe de AINE que causam inibição reversível da enzima COX por competir com o substrato, ácido araquidônico, pelo sítio ativo da enzima. A indometacina causa inibição das enzimas COX-1 e COX-2 quase que igualmente, portanto é considerado um AINE não seletivo (VANE e BOTTING, 1996). Inicialmente, observamos que o tratamento local com indometacina não reduziu a resposta nociceptiva à formalina. Para investigar se o próprio tratamento local com indometacina, por se tratar de uma droga ácida, não estaria induzindo por si um dano tecidual e possivelmente hiperalgesia, e impedindo a observação de uma redução na resposta nociceptiva à formalina, avaliamos o efeito do tratamento sistêmico dos animais com este antiinflamatório. Este tratamento nos permitiria ainda avaliar a possibilidade da participação das PGs em outros locais da via nociceptiva, como por exemplo na medula espinhal. No entanto, o tratamento sistêmico com indometacina também não reduziu a resposta à formalina, descartando as duas hipóteses que haviam sido levantadas. Ao contrário do que observamos na metodologia da formalina orofacial, o tratamento sistêmico com indometacina reduziu ambas as fases da resposta à formalina na pata, corroborando com os resultados de MALMBERG e YAKSH (1995 a, b), e comprovando dessa maneira, que o protocolo utilizado estava sendo efetivo. Todos estes dados nos levaram a questionar a relevância da participação das PGs na resposta nociceptiva à formalina orofacial.

Como a indometacina é considerada um AINE mais seletivo para inibir a enzima COX-1 (CRYER e FELDMAN, 1998), se houvesse predomínio de PGs geradas via COX-2 na resposta à formalina, o efeito da inibição da síntese de PGs geradas por esta enzima seria melhor avaliado com a utilização de AINE mais seletivos para COX-2. Entretanto, a COX-2 é uma enzima induzida, o que sugere que sua participação não seja importante em respostas de curta duração, como a resposta induzida pela formalina. Mesmo assim, avaliamos o efeito de inibidores mais seletivos para a enzima COX-2 neste modelo. Para isso, os animais foram tratados com meloxicam, administrado sistemicamente, ou celecoxibe, administrado local ou sistemicamente. Surpreendentemente, observamos que o tratamento sistêmico dos animais com meloxicam e celecoxibe causava redução da resposta na fase II da nocicepção induzida por formalina.

O tratamento sistêmico com inibidores seletivos de COX-2 poderia estar inibindo a síntese de PGs tanto na medula espinhal assim como no local do estímulo. Com relação à colaboração da COX-2 espinhal para uma síntese rápida de PGs, existem discrepâncias nos resultados dos estudos que avaliam a presença constitutiva desta enzima na medula espinhal. Alguns autores descrevem que ambas as enzimas, COX-1 e COX-2, apresentam-se constitutivamente expressas na medula espinhal, sendo que a isoforma predominante em ratos seria a COX-2 (BEICHE et al., 1996, 1998; VANE et al., 1998). Sugere-se que a COX-2 está localizada principalmente no corno dorsal superficial (lâminas I e II) da substância cinzenta da medula espinhal (WILLINGALE et al., 1997). Em contraste, alguns estudos demonstram que a COX-2 estaria expressa constitutivamente nos neurônios do corno ventral e não no corno dorsal da medula (MAIHÖFNER et al., 2000), ou ainda, que não existiria expressão constitutiva de COX-2 na medula espinhal (ICHITANI et al., 1997). Apesar destas discrepâncias, que podem ser atribuídas às diferentes sensibilidades das técnicas utilizadas para detecção da enzima (como por exemplo, RT-PCR, hibridização "in situ" e imunohistoquímica), sabe-se que a resposta inflamatória periférica induz o aumento da expressão de COX-2 no corno dorsal da medula (BEICHE et al., 1996). Entretanto, o aumento do RNAm da COX-2 espinhal parece ocorrer apenas 2 a 6 horas após a aplicação do estímulo inflamatório (BEICHE et al., 1996; SEIBERT et al., 1994; ICHITANI et al., 1997). Então, a curta duração do teste de formalina não permitiria a formação desta enzima. Além disso, foi demonstrado anteriormente que a liberação de PGE<sub>2</sub> no corno dorsal da medula espinhal é rapidamente aumentada após estimulação com formalina na pata traseira de ratos e a enzima que parece estar envolvida neste processo é a COX-1 e não a COX-2, uma vez que a resposta nociceptiva típica, associada a este aumento da liberação de PGE<sub>2</sub> na medula, é inibida pela administração intratecal de AINE não seletivos (MALMBERG e YAKSH, 1995a).

Quanto aos inibidores seletivos da enzima COX-2, resultados discrepantes são observados com a utilização destas drogas no teste de formalina na pata. YAMAMOTO e NOZAKI-TAGUCHI (1996), demonstraram que inibidores seletivos de COX-2 inibiram ambas as fases da resposta à formalina. Por outro lado, DIRIG et al. (1997) não observaram redução em nenhuma das fases e nem mesmo redução na liberação espinhal de PGE<sub>2</sub>. Em adição, a utilização de um inibidor seletivo de COX-

1 apresentou potente efeito analgésico na fase II da resposta à formalina (OCHI et al., 2000). Além disso, estudos demonstram que a enzima COX-1 apresenta-se constitutivamente expressa nas células da glia do corno dorsal (MAIHÖFNER et al., 2000), e que a administração intratecal de agentes que impedem a função glial bloqueiam a nocicepção induzida por formalina (WATKINS et al., 1997).

Considerando estas observações em conjunto, pode-se sugerir que a liberação espinhal inicial de PGs, após a aplicação periférica de um estímulo nociceptivo, como a formalina, pode ser mediada via COX-1 das células gliais.

A partir destas informações decidimos investigar a outra possibilidade do efeito antinociceptivo dos inibidores seletivos de COX-2, que consiste na inibição da síntese de PGs no local do estímulo. Para avaliar esta possibilidade nós realizamos o tratamento local dos animais com celecoxibe e observamos uma redução da fase II da resposta à formalina semelhante àquela observada com a administração sistêmica deste antiinflamatório. Estes resultados sugerem que a síntese de PGs na nocicepção orofacial poderia ocorrer, via COX-2, que poderia estar expressa constitutivamente ou ser rapidamente induzida no local do estímulo.

A observação de que o tratamento com indometacina foi efetivo apenas na resposta à formalina injetada na pata dos animais pode sugerir que diferentes processos participem da resposta observada após a estimulação periférica com formalina na pata ou na região orofacial. Estas diferenças poderiam explicar porque as dores de origem trigeminal, muitas vezes, não conseguem ser aliviadas clinicamente com a utilização de drogas que apresentam-se efetivas em outras situações. Estudos utilizando modelos de constrição nervosa identificaram diversas diferenças fisiológicas e neuroanatômicas nos efeitos da injúria aos nervos trigeminais e espinhais (BENOLIEL et al., 2001; BENOIST et al., 1999; BONGENHIELM, et al., 1999; IMAMURA et al., 1997; VOS e STRASSMAN, 1995). Estas diferenças podem ser responsáveis pela necessidade de intervenções clínicas diferenciadas para o tratamento da dor neuropática trigeminal ou espinhal. Na dor inflamatória a existência destas diferenças precisa ser melhor avaliada.

Na tentativa de melhor avaliar a participação das PGs em nosso modelo, administramos PGE<sub>2</sub> localmente, previamente à administração de uma dose mais baixa de formalina (0,625%). A administração local de PGE<sub>2</sub> em uma dose insuficiente para induzir uma resposta nociceptiva, causou o aumento significativo da

fase II. Este resultado, juntamente com os resultados obtidos com os inibidores de COX-2, sugerem que PGs geradas via COX-2 participam da dor induzida por formalina orofacial.

Apesar deste último dado apresentado, que indica a presença de receptores para PGE<sub>2</sub> nos aferentes primários trigeminais e que a presença deste mediador aumenta a resposta nociceptiva induzida por formalina, seria necessária a realização de experimentos mais específicos que demonstrassem a presença e/ou indução da enzima COX-2 no local do estímulo para comprovar nossa hipótese. Como estes estudos ainda não foram realizados, uma outra possibilidade que deve ser considerada é a existência de mecanismos de ação adicionais dos inibidores seletivos de COX-2, que não estão relacionados com a inibição da síntese de PGs. Existem evidências de que o celecoxibe pode atuar como imunossupressor, inibindo síntese de citocinas, através da inibição da ativação ou função de fatores de transcrição (IÑIGUEZ et al., 1999). Em adição, os dados apresentados por CUZZOCREA et al. (2002) demonstram que a administração de celecoxibe reduziu os níveis de COX-2 e citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ) no esudato pleural de ratos com inflamação pulmonar induzida por carragenina.

Qualquer que seja o mecanismo envolvido, devemos considerar que os AINE são drogas amplamente utilizadas clinicamente, e a efetividade dos inibidores de COX-2 em reduzir a dor orofacial combinada à sua baixa toxicidade torna estas drogas extremamente importantes no controle deste processo.

#### 4.3 PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Além das PGs, os leucotrienos também são formados a partir da metabolização do ácido araquidônico, mas neste caso a enzima envolvida na síntese é a lipoxigenase. A injeção subcutânea de leucotrienos produz hiperalgesia em animais (RACKHAM e FORD-HUTCHINSON, 1983; LEVINE et al., 1984) e humanos (SOTER et al., 1983). A síntese de leucotrienos pode ser estimulada pelo TNF $\alpha$ , e isto contribuiria para as ações hiperalgésicas desta citocina (HUBER et al., 1984).

No entanto, tem sido demonstrado que os modelos de hiperalgisia inflamatória aguda geralmente são insensíveis à inibição da síntese de leucotrienos (HIGGS et al., 1988; GRISWOLD et al., 1991; MULLER-PEDDINNGHAUS et al., 1993; AMANN et al., 1996).

A participação dos leucotrienos na resposta à formalina orofacial foi avaliada através do tratamento dos animais com MK 886, um inibidor da enzima 5-lipoxigenase. Em nosso estudo, o tratamento dos animais com MK 886, nas doses de 0,3, 1,0 e 3,0 mg/kg, não modificou nenhuma das fases de resposta à formalina. Em um modelo de incapacitação articular induzida por carragenina, o pré-tratamento com MK-886 (3mg/kg), 2 horas antes da injeção de carragenina, não foi capaz de inibir o pico máximo da resposta, mas reduziu a incapacitação 4 horas após a aplicação do estímulo (TONUSSI e FERREIRA, 1999). Este efeito do MK 886 só foi observado em animais que receberam uma reestimulação da incapacitação com TNF $\alpha$  ou carragenina 72 horas após o primeiro desafio. Este resultado poderia ser explicado por estudos que demonstram que macrófagos retirados de tecidos cronicamente inflamados exibem, após estimulação, uma produção aumentada de leucotrienos e produção diminuída de PGs, quando comparado aos tecidos normais (BEUSENBERG et al., 1994). Estes dados sugerem que os leucotrienos seriam importantes mediadores em respostas inflamatórias crônicas, portanto de maior duração que a resposta induzida pela formalina.

#### 4.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Além do componente PG, o sistema nervoso simpático é considerado um dos principais componentes da hiperalgisia inflamatória (NAKAMURA e FERREIRA, 1987, DUARTE et al., 1988).

Em nosso estudo, procuramos avaliar a participação do sistema nervoso simpático na dor orofacial através do tratamento dos animais com atenolol, guanetidina ou tiramina.

A administração local de atenolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico) resultou na diminuição da nocicepção induzida por formalina na fase II do teste. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de CODERRE et al. (1984), que

demonstraram, utilizando o teste de formalina na pata, que tratamentos com agentes depletos aminérgicos periféricos (FLA63 e guanetidina, 6-hidroxidopamina) são efetivos no alívio da dor associada com inflamação e dano tecidual, por prevenir a estimulação e sensibilização dos aferentes primários. Estes mesmos autores demonstraram que estes tratamentos também reduzem a nocicepção de animais testados no teste de retirada da cauda, metodologia onde não ocorre dano tecidual, sugerindo que o limiar de ativação dos nociceptores nos tecidos não inflamados é reduzido na presença de transmissores adrenérgicos. Este resultado poderia explicar a redução observada na fase I da resposta à formalina com a utilização da dose mais alta de atenolol.

O efeito antinociceptivo observado com a utilização do atenolol foi confirmado com os resultados obtidos através da utilização de guanetidina. O tratamento com guanetidina inicialmente causa um bloqueio da transmissão adrenérgica por prevenir a liberação de noradrenalina em resposta a um potencial de ação. Entretanto, quando administrada durante 3 dias também causa a depleção das reservas de noradrenalina dos terminais nervosos (CHANG et al., 1965). Assim, nós demonstramos que animais tratados com guanetidina apresentaram uma menor resposta nociceptiva à formalina. A guanetidina normalmente não cruza a barreira hemato-encefálica em ratos adultos (CAS et al., 1960), e além disso, esta droga não afeta a função da glândula adrenal (CHANG et al., 1965), sugerindo que as injeções subcutâneas desta droga afetam o sistema adrenérgico periférico e não central. Deste modo, a diminuição dos escores da nocicepção orofacial em nosso experimento sugerem que a redução da função adrenérgica resulta na diminuição na sensibilidade dos nociceptores.

Corroborando estes dados, demonstramos também que a administração de tiramina, um agente que promove a liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos, promoveu um aumento da resposta nociceptiva. Em nosso estudo, a administração de formalina na concentração de 0,625% não induziu uma resposta nos animais significativamente diferente do grupo controle (salina). No entanto, quando os animais receberam uma injeção local de tiramina, 2 horas antes do estímulo, esta resposta foi significativamente maior que o controle. Estes dados sugerem que a tiramina promove a liberação de noradrenalina, que atua sobre os aferentes primários, sensibilizando-os e quando se aplica formalina na fibra já

sensibilizada é observado um aumento da resposta nociceptiva. Em animais onde os terminais simpáticos foram depletados pelo tratamento prévio com guanetidina, este aumento da resposta nociceptiva por tiramina não é observada.

A possibilidade de que o tratamento com agentes simpatolíticos estaria afetando o fluxo sangüíneo periférico e conseqüentemente afetando as respostas inflamatória e nociceptiva foi investigada em um estudo realizado por FUCHS et al. (1999). Neste estudo, a resposta à formalina aplicada na pata foi avaliada em animais controle ou que sofreram simpatectomia cirúrgica após o pré-tratamento local com vasodilatadores ou vasoconstritores não adrenérgicos. A simpatectomia causou redução da resposta à formalina na fase II, e este efeito não foi afetado por nenhum dos pré-tratamentos realizados. Estes dados indicam que o efeito dos agentes simpatolíticos no teste de formalina não seria decorrente de efeitos inespecíficos sobre o fluxo sanguíneo local.

Excluindo esta possibilidade, sugerimos que o sistema nervoso simpático tem importante participação na nocicepção induzida por formalina orofacial. A ativação do sistema nervoso simpático tem sido associada com a liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 1991) e PGs (DRAY e PERKINS, 1993; GONZALES et al., 1989), e ambos são mediadores capazes de causar hiperalgesia. Segundo DRAY e PERKINS (1993), a BK estimularia fibras nervosas simpáticas a induzirem a produção de prostanóides em vários tecidos. Em adição, os resultados apresentados por GONZALES et al. (1989) sugerem que a hiperalgesia induzida por ácido araquidônico é prevenida pela simpatectomia dos animais, sugerindo que neurônios pós-ganglionares simpáticos estariam envolvidos na indução da síntese de PGs. Outra possível contribuição do sistema nervoso simpático na dor inflamatória foi demonstrada em um estudo recente realizado por SAFIEH GARABEDIAN et al. (2001). Neste estudo, o tratamento com agentes simpatolíticos reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica, e o aumento na concentração local de NGF, IL-6 e TNF $\alpha$  induzido pela injeção intraplantar de endotoxina bacteriana .

As evidências da participação das PGs e aminas simpatomiméticas na resposta à formalina orofacial, nos levaram a avaliar a participação da BK, já que sua contribuição para a hiperalgesia inflamatória é resultante da liberação de PGs e aminas simpatomiméticas (FERREIRA et al., 1993).

#### 4.5 PARTICIPAÇÃO DA BRADICININA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

A BK, atuando via ativação de receptores B<sub>2</sub>, representa uma das mais potentes substâncias álgicas endógenas. Este peptídeo tem importante participação na transmissão da dor, diretamente, pela ativação das fibras A $\delta$  e C e indiretamente, através da liberação de um grande número de mediadores inflamatórios, como PGs, óxido nítrico e neuropeptídeos que contribuem para a amplificação desta resposta. Além disso, a BK também está envolvida na sensibilização dos nociceptores através de interações com mediadores inflamatórios, como PGs e citocinas (revisado por CALIXTO et al., 2000).

Existem várias evidências do envolvimento dos receptores B<sub>2</sub> na ativação aguda e na sensibilização dos nociceptores. Estudos anteriores demonstraram os efeitos antinociceptivos de antagonistas B<sub>2</sub> na nocicepção induzida por BK, nas contorções induzidas por ácido acético, na resposta nociceptiva dos animais à formalina e à capsaicina e em modelos de hiperalgesia inflamatória e incapacitação articular (ASANO et al., 1997; GRIESBACHER et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; FERREIRA et al., 1993; POOLE et al., 1999; TONUSSI e FERREIRA, 1997).

Em nosso estudo, avaliamos a participação da BK via ativação de receptores B<sub>2</sub> através do tratamento sistêmico dos animais com HOE-140, um potente antagonista destes receptores.

O tratamento dos animais com HOE 140 na dose de 1,0 mg/kg reduziu a fase I da resposta à formalina. Este resultado sugere que a BK pode estar causando ativação direta dos nociceptores via receptores B<sub>2</sub>. O HOE 140 nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg também reduziu significativamente a fase II da resposta à formalina, sugerindo o envolvimento da BK via ativação de receptores B<sub>2</sub> na dor inflamatória induzida pela formalina, possivelmente através da indução da liberação de outros mediadores que vão contribuir com esta resposta. Com a utilização de doses mais altas do HOE 140, seu efeito antinociceptivo não foi observado em ambas as fases. CORREA e CALIXTO (1993), utilizando a metodologia de formalina na pata, demonstraram que o tratamento sistêmico ou local dos animais com HOE 140 reduziu ambas as fases da resposta à formalina, mas que doses mais altas também não eram efetivas.

Ao contrário do que ocorre com os receptores B<sub>2</sub>, a ativação dos receptores B<sub>1</sub> não parece resultar na ativação direta dos nociceptores (CALIXTO et al., 2000). Em um estudo recente realizado por PESQUERO et al. (2000) com camundongos knockout para o gene do receptor B<sub>1</sub>, foi demonstrado que esses receptores não participam da sensibilidade térmica aguda, mas sua ativação na medula espinhal pode causar a facilitação do reflexo nociceptivo. Estes camundongos, avaliados no teste de formalina na pata, apresentaram redução na resposta nociceptiva em ambas as fases e ainda redução no tempo de lambida da pata induzido por capsaicina. Estes dois agentes, formalina e capsaicina, são capazes de ativar os nociceptores e, segundo estes autores, a redução na resposta nociceptiva dos animais seria resultado de uma redução na sensibilização espinhal devido a ausência dos receptores B<sub>1</sub>. Corroborando com os resultados de PESQUERO et al. (2000), WOTHERSPOON e WINTER (2000) demonstraram que os receptores B<sub>1</sub> apresentam-se constitutivamente expressos na medula espinhal e portanto poderiam ser importantes na modulação da plasticidade espinhal.

Em respostas inflamatórias, os receptores B<sub>1</sub> também podem ser induzidos no local da injúria por mediadores inflamatórios como as citocinas. Isto foi demonstrado em modelos de hiperalgesia mecânica e térmica, onde a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$  foi inibida através do tratamento dos animais com um antagonista do receptor B<sub>1</sub> (DALBK) (DAVIS e PERKINS, 1994; PERKINS e KELLY, 1994, PERKINS et al., 1995).

Existem várias evidências dos efeitos antinociceptivos do DALBK. POOLE et al. (1999) demonstraram, em um modelo de hiperalgesia mecânica, que o tratamento dos animais com DALBK foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo agonista B<sub>1</sub>, além de reduzir as respostas hiperalgésicas à BK, calidina e carragenina. Em adição, CORREA e CALIXTO (1993) demonstraram que o tratamento dos animais com DALBK foi capaz de reduzir ambas as fases da resposta à formalina administrada na pata de camundongos.

Em nosso estudo, avaliamos a participação da BK via ativação de receptores B<sub>1</sub> através da administração local de DALBK. Nossos resultados mostram que o tratamento dos animais com DALBK não modificou a fase I da resposta à formalina, no entanto reduziu significativamente a fase II. Estes dados sugerem que a ativação dos receptores B<sub>1</sub> não participa da ativação dos nociceptores que ocorre na fase

inicial da resposta à formalina. Uma possibilidade que pode ser considerada é que estes receptores sejam induzidos no local do estímulo, por citocinas como a IL-1 $\beta$  ou outros mediadores, e dessa forma participar da fase II da resposta à formalina. A possibilidade de um efeito na modulação espinhal parece menos provável, pois o DALBK foi administrado no local do estímulo.

Outra evidência da participação da BK na resposta à formalina orofacial foi demonstrada através do aumento significativo de ambas as fases da resposta pelo captopril. O captopril é um inibidor da cininase II, enzima responsável pela inativação da BK (FERREIRA e ROCHA e SILVA, 1965).

Nossos dados em conjunto sugerem que a BK participa do estabelecimento de ambas as fases da resposta à formalina orofacial, através da ativação de receptores B<sub>2</sub> na fase I e dos dois subtipos, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, na fase II.

Na hiperalgesia inflamatória, foi proposto que a BK induz a liberação de PGs e aminas simpatomiméticas via liberação de citocinas inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (FERREIRA et al., 1993). No entanto, antes de investigarmos a participação destas citocinas na resposta induzida por formalina orofacial, avaliamos o envolvimento das endotelinas e da histamina. Alguns estudos demonstraram que estes mediadores têm importante participação em ambas as fases da resposta à formalina na pata, e esta metodologia possui várias características comuns com a metodologia que nós utilizamos.

#### 4.6 PARTICIPAÇÃO DAS ENDOTELINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Diversos estudos têm demonstrado a participação das endotelinas na dor inflamatória em modelos animais (FERREIRA et al., 1989; RAFFA e JACOBY, 1991; RAFFA et al., 1996) e em humanos (DAHLOF et al., 1990). No teste de formalina na pata, a administração de ET-1 causou um aumento de ambas as fases da resposta nociceptiva e do edema causado pela formalina. Estes efeitos foram bloqueados com o tratamento dos animais com bosentam, um antagonista misto dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. O efeito das endotelinas no aumento da fase I da resposta à formalina na pata de camundongos parece ser resultado de uma ação direta destes peptídeos nos aferentes sensoriais primários (PIOVESAN et al., 1997).

Em nosso estudo, avaliamos inicialmente a participação das endotelinas através do pré-tratamento dos animais com ET-1. Assim como nos resultados obtidos no teste de formalina na pata (PIOVESAN et al., 1997), a administração de ET-1 aumentou significativamente ambas as fases da resposta à formalina orofacial na dose de 0,625%. Diversos fatores podem contribuir para a hiperalgesia induzida por ET-1, dentre eles, estimulação da síntese de prostanóides (HYSLOP e De NUCCI, 1992), liberação de citocinas (KLEMM et al., 1995), degranulação de mastócitos (YAMAMURA et al., 1994) e vasoconstrição (WEBB, 1997). Com relação à vasoconstrição, estudos anteriores demonstraram que aplicação direta de ET-1 no nervo ciático de ratos induziu uma resposta nociceptiva que era revertida pela administração de morfina. Este efeito não era observado com a aplicação local de um vasoconstritor, indicando que a resposta nociceptiva induzida por ET-1 era resultado de uma ação específica no aferente primário e não do seu efeito vasoconstritor (DAVAR et al., 1998).

Existe uma ampla variedade de células capazes de sintetizar e liberar a ET-1. Durante uma resposta inflamatória pulmonar em ratos, macrófagos sintetizam e liberam ET-1. A síntese e liberação de ET-1 também é induzida com o tratamento de macrófagos humanos com lipopolissacarídeo (FINSNES et al., 1998; EHRENREICH et al., 1990). Os neurônios sensoriais também constituem uma importante fonte de ET-1, que pode atuar de maneira autócrina ou parácrina para ativar estes neurônios. As observações que demonstram a presença de RNAm de ET-1 em neurônios sensoriais que expressam SP e CGRP (GIAID et al., 1989), e a habilidade da ET-1 de potencializar a liberação de CGRP induzida por capsaicina (DYMSHITZ e VASKO, 1994), em conjunto com as observações que mostram que neurônios sensoriais que expressam CGRP frequentemente expressam receptores ET<sub>A</sub>, sugerem uma participação destes receptores nos neurônios sensoriais como auto-receptores. Estas informações podem ser especialmente importantes na inflamação neurogênica, um processo dependente da liberação de peptídeos, como SP, das fibras aferentes primárias (LEMBECK e HOLZER, 1979; BOZZIC et al., 1996). Como a ET-1 possui alta afinidade pelos receptores ET<sub>A</sub> (MASAKI et al., 1992), poderia se sugerir que estes receptores estariam envolvidos na resposta à formalina.

A participação das endotelinas via ativação dos receptores ET<sub>A</sub> na resposta à formalina foi avaliada através do tratamento local com BQ 123, um antagonista

seletivo destes receptores. Todas as doses testadas do BQ 123 (1,0; 3,0 e 10,0 nmol) causaram uma redução significativa da fase I da resposta. Com relação a fase II, com exceção da menor dose, todas as outras reduziram significativamente a resposta à formalina. Estes dados sugerem a participação da ET-1, atuando através de receptores ET<sub>A</sub>, tanto na ativação dos nociceptores, como na resposta inflamatória induzida pela formalina orofacial.

As isoformas ET-1 e ET-3 possuem afinidade igual para o receptor ET<sub>B</sub> (MASAKI et al., 1992). Apesar de não termos avaliado o efeito da ET-3 na resposta à formalina orofacial outros autores demonstraram que ambas as fases da resposta à formalina na pata de camundongos também podem ser aumentadas pela administração da ET-3. (PIOVESAN et al., 1997) Os receptores ET<sub>B</sub> também parecem participar periféricamente da dor inflamatória. Embora a aplicação de agonistas dos receptores ET<sub>B</sub> isoladamente não sejam capazes de induzir respostas nociceptivas, eles são capazes de potencializar tais respostas quando administrados localmente após a injeção intraplantar de formalina ou da injeção intraarticular de carragenina ou lipopolissacarídeo bacteriano (PIOVESAN et al., 1997; DE MELO et al., 1998).

Desta forma, também avaliamos a participação das endotelinas na resposta à formalina orofacial via ativação de receptores ET<sub>B</sub>, através do tratamento local com o antagonista seletivo destes receptores, BQ 788. As doses testadas (3,0 e 10,0 nmol) de BQ 788 não modificaram a resposta à formalina na fase I ou na fase II do teste. No entanto, Fabricio et al. (2002), utilizando o mesmo lote deste peptídeo, observaram uma redução da resposta febril induzida pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) e pelo fator pirogênico pré-formado (PFPP), demonstrando desta maneira sua efetividade em outra metodologia.

Uma das explicações para a ausência do efeito antinociceptivo do BQ 788 em relação ao BQ123 poderia ser a maior afinidade da ET-1. pelos receptores ET<sub>A</sub>. Outra possibilidade é a demonstração da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> em diferentes tipos celulares. Enquanto os receptores ET<sub>A</sub> estão expressos nas fibras aferentes primárias e parecem mediar as ações diretas das endotelinas liberadas periféricamente, os receptores ET<sub>B</sub> estão expressos em células satélite do gânglio da raiz dorsal e outros subtipos de células da glia (POMONIS et al., 2001). Estes dados, juntamente com as observações de que os receptores ET<sub>B</sub> participam

periféricamente da dor, sugerem a participação de células periféricas da glia na transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso periférico.

#### 4.7 PARTICIPAÇÃO DA HISTAMINA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Grande parte dos neurônios do gânglio trigeminal são responsivos à aplicação de histamina exógena (HUTCHEON et al., 1993). Corroborando estes dados, em nosso estudo a administração local de histamina aumentou significativamente a fase II da resposta à formalina orofacial, demonstrando que os aferentes trigeminais primários são responsivos a este mediador.

Os receptores histaminérgicos estão divididos em três tipos: H1, H2 e H3, sendo este último considerado um autorreceptor (ARRANG, 1994; SCHWARTZ et al., 1991). Cerca de 15% dos neurônios do gânglio trigeminal, que originam as fibras C, expressam RNAm para o receptor histaminérgico H1 (KASHIBA et al., 1999). Os efeitos antinociceptivos de antagonistas dos receptores H1 em outros modelos tem sido descritos tanto em animais, como em humanos (OLUYOMI e HART, 1991). PARADA et al. (2001) demonstraram que o antagonista H2, cimetidina, causou antinocicepção no teste de formalina na pata apenas com doses elevadas e em menor grau quando comparado a antagonistas H1. Estes autores sugerem que os receptores H1 seriam mais importantes do que os receptores H2 no comportamento nociceptivo induzido pela formalina. Em humanos, HAGERMARK et al. (1979) demonstraram que antagonistas H2 são menos efetivos em reduzir o prurido induzido por injeções intradérmicas de histamina quando comparados aos antagonistas H1. Em adição, um estudo utilizando camundongos *knockout* para o receptor H1 demonstrou que estes animais apresentam resposta nociceptiva diminuída em relação aos camundongos normais (MOBARAKEH et al., 2000).

Em nosso estudo, avaliamos a participação da histamina na resposta à formalina através do tratamento dos animais com meclisina, um antagonista seletivo do receptor H1. O tratamento local com meclisina causou uma redução significativa da fase II da resposta à formalina orofacial. PARADA et al. (2001) observaram redução de ambas as fases de resposta à formalina na pata em animais tratados com meclisina. Tem sido descrito que os agentes anti-histamínicos podem causar

antinocicepção através de mecanismos centrais ou periféricos (HOUGH et al., 1997; LAMBERTI et al., 1996; RUMORE e SCHLICHTING, 1985). No estudo de PARADA et al. (2001) a possibilidade de um efeito central foi descartada através da observação de que estas drogas não apresentavam efeitos quando administradas na pata contralateral. Em nosso estudo esta questão não foi avaliada, mas por se tratar de um tratamento local pode-se sugerir que a histamina participe da resposta à formalina via ativação de receptores H1 no local do estímulo.

#### 4.8 PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

A sensibilização dos nociceptores é o denominador comum de todos os tipos de dor que possuem um componente inflamatório. Embora os autores considerem que os mediadores finais da hiperalgesia inflamatória são as PGs e as aminas simpatomiméticas, a liberação destes agentes parece ser precedida pela ativação e liberação das citocinas inflamatórias (CUNHA et al, 1992).

O TNF $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que em condições fisiológicas está expresso predominantemente nos mastócitos (ACKERMANN e HARVIMA, 1998). Durante uma resposta imune ou inflamatória, o TNF $\alpha$  passa a ser sintetizado e liberado por uma variedade de tipos celulares incluindo queratinócitos (CORSINI e GALLI, 1998) fibroblastos (FUGISAWA et al., 1997), macrófagos e neutrófilos (YOSHIDA et al. , 1998). Nos nervos periféricos, as células de Schwann também produzem TNF $\alpha$  após uma injúria (WAGNER et al., 1998). A injeção intraplantar de TNF $\alpha$  produz hiperalgesia mecânica (CUNHA et al., 1992; WOOLF et al., 1997) e térmica (PERKINS e KELLY, 1994, WOOLF et al., 1997) em ratos acordados, e ainda induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) e ativação da síntese de PGs (CUNHA et al., 1992., WATKINS et al., 1995). Outra importante característica do TNF $\alpha$  que contribui para as suas ações hiperalgésicas é o seu efeito estimulatório sobre a formação de leucotrienos (HUBER et al., 1984).

Em nosso estudo, o tratamento local com TNF $\alpha$  resultou no aumento da resposta induzida por formalina na concentração de 0,625%. Em adição, nós

observamos que o pré-tratamento local com um anticorpo anti-TNF $\alpha$  reduziu significativamente a fase II da resposta à formalina (2,5%). Estes dados em conjunto sugerem que o TNF $\alpha$  participa da resposta nociceptiva induzida por formalina orofacial.

De acordo com um estudo realizado por JUNGER e SORKIN (2000), o TNF $\alpha$  é capaz de causar sensibilização aguda das fibras C que pode ser observada 30 minutos após a injeção. Estes autores sugerem que a sensibilização aguda seria devido a mecanismos rápidos como por exemplo, ligação do TNF $\alpha$  em receptores presentes nas fibras C ou ativação da forma constitutiva da enzima ciclooxigenase, levando à síntese de eicosanóides. Esta sensibilização aguda representaria apenas o início de um processo, que subsequente envolveria a síntese de outras citocinas e desenvolvimento de hiperalgesia persistente. O papel do TNF $\alpha$  como citocina pivô na cascata de liberação de mediadores da hiperalgesia inflamatória foi demonstrado anteriormente por Cunha et al. (1992).

Uma importante citocina pró- inflamatória que pode ter sua síntese induzida pelo TNF $\alpha$  é a IL-1 $\beta$ . A IL-1 $\beta$  é capaz de induzir hiperalgesia (FERREIRA et al., 1988) através de vários mecanismos, como por exemplo: indução da síntese de PGs (FOLLENFANT et al., 1989; CRESTANI et al., 1991; WATKINS, et al., 1995), indução de receptores B<sub>1</sub> de BK (PERKINS e KELLY, 1994), como resultado da ativação direta dos nociceptores (FUKUOKA et al., 1994), ou ainda através da ativação do NGF (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1997). FUKUOKA et al. (1994) descrevem que a administração intraplantar de IL-1 é capaz de causar uma sensibilização rápida dos receptores polimodais semelhante àquela produzida pela aplicação de TNF $\alpha$ . Em estudos que utilizam a metodologia de formalina na pata, SWEITZER et al. (1999) demonstraram que após a administração intraplantar de formalina é observado um aumento da expressão de IL-1 $\beta$  espinhal. Esse resultado corrobora com o estudo de WATKINS et al (1997) que demonstrou que a administração intratecal de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  é capaz de bloquear a hiperalgesia induzida por formalina.

Em nosso estudo, a administração local de IL-1 $\beta$  causou um aumento significativo da resposta à formalina na concentração de 0,625%, enquanto que o tratamento dos animais com um anti-soro anti-IL-1 $\beta$  reduziu significativamente a

resposta à formalina (2,5%). Estes dados em conjunto sugerem que a IL-1 $\beta$  participa da resposta nociceptiva induzida por formalina orofacial. Entretanto, não é possível afirmar qual é o principal mecanismo pelo qual a IL-1 $\beta$  está modificando a resposta à formalina.

A IL-6, juntamente com a IL-1 $\beta$  e o TNF $\alpha$ , é geralmente considerada uma citocina pró-inflamatória. Sua síntese é rapidamente aumentada durante traumas, infecções, doenças auto-imunes e desenvolvimento de tumores (revisado por KISHIMOTO et al., 1995). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar IL-6 após um estímulo, como por exemplo, monócitos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (KIRNBAUER et al., 1989; NEUNER et al., 1991). No sistema nervoso central e periférico, neurônios e células da glia constituem importantes fontes de IL-6 (GADIENT e OTTEN, 1996; MARZ et al., 1999).

Existem várias evidências da participação da IL-6 em respostas nociceptivas e na hiperalgesia inflamatória (CUNHA et al., 1992; OKA et al., 1995; WARKINS e MAIER, 1999). Corroborando estes dados, alguns autores demonstraram que camundongos knockout para IL-6 apresentavam redução na sensibilidade térmica no teste da placa quente e redução na hiperalgesia após inflamação com carragenina ou após constrição nervosa (ZHONG et al., 1999; XU et al., 1997; MURPHY et al., 1999).

Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que a administração local de IL-6 induziu um aumento do tempo de fricção na fase II da resposta à uma dose mais baixa de formalina (0,625%). Em adição, a administração local de um antisoro anti-IL-6 reduziu a resposta induzida por formalina 2,5%. Estes dados indicam a participação da IL-6 na fase inflamatória da resposta nociceptiva induzida por formalina orofacial.

Um outro grupo de citocinas que tem sido associado com a dor inflamatória e hiperalgesia é a família das quimiocinas (CUNHA et al., 1991; OH et al., 2001; SERHAN et al., 2001). As quimiocinas, juntamente com as moléculas de adesão celular, tem importante participação na reorientação e migração de leucócitos para o foco inflamatório. As quimiocinas são classificadas de acordo com a presença e posição de resíduos de cisteína. A subfamília CXC ou  $\alpha$ -quimiocinas são

quimiotáticas para neutrófilos e linfócitos, e os membros desta família incluem IL-8 e CINC (fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocinas). A subfamília CC, ou  $\beta$  quimiocinas, são quimiotáticas para monócitos e células T, e inclui membros como MIP-1 $\alpha$  (proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$ ) e RANTES (fator regulado pela ativação de células T normais, expresso e secretado) (revisado por DELEO e YEZIERSKI, 2001)

O envolvimento das quimiocinas na patogênese da dor pode ser em parte devido à sua ação quimiotática, mas também parece resultar de um envolvimento direto na transdução do sinal nociceptivo (revisado por BODDEKE, 2001). Um dos primeiros estudos demonstrando o envolvimento de quimiocinas na hiperalgesia inflamatória foi realizado por CUNHA et al. (1991). Estes autores demonstraram que a administração de IL-8 era capaz de causar hiperalgesia no teste de pressão na pata, e que este efeito era bloqueado por um antisoro específico para IL-8, antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos e dopaminérgicos, mas era resistente à administração de indometacina. Estes dados sugeriram o envolvimento do sistema nervoso simpático na hiperalgesia induzida por IL-8, e que este mecanismo era independente da síntese de PGs.

Em nosso estudo a administração local de IL-8 causou um aumento da resposta à formalina na concentração de 0,625%. Quando os animais foram tratados com um antisoro anti-IL-8 previamente à administração de formalina 2,5% foi observada uma redução significativa nesta resposta. Estes dados em conjunto sugerem que a IL-8 participa do estabelecimento da nocicepção orofacial induzida por formalina. Embora ratos não sejam capazes de produzir IL-8, as funções da IL-8 neste animais parecem ser mediadas pelo CINC (GUEx et al., 1996; AYAKO et al., 1998). Deste modo, a injeção de IL-8 humana na pata de ratos induz hiperalgesia mecânica que é mediada pela ativação de um componente simpático (CUNHA et al., 1991). Esta observação poderia ser explicada pelo fato de que IL-8 e CINC partilham o mesmo receptor (CXCR2) (WUYTS et al., 1998; SHIBATA et al., 2000). Este receptor foi identificado tanto em humanos, onde apresenta alta afinidade para a IL-8, como em ratos, onde representa o receptor comum para os três tipos de CINC (CINC-1, 2 e 3) (SHIBATA et al., 2000).

Segundo CUNHA et al. (1991) a IL-8 seria capaz de ativar o componente simpático da hiperalgesia. Nossos resultados além de demonstrarem a participação

da IL-8 na resposta à formalina orofacial, também demonstraram uma importante participação do sistema nervoso simpático nesta resposta. No entanto, até o momento, não podemos afirmar que a ativação do componente simpático seja induzida pela IL-8 nesta metodologia.

Apesar de termos demonstrado que BK, PGs, aminas simpatomiméticas e citocinas participam da cascata da hiperalgisia inflamatória proposta por CUNHA et al., 1992 também participam da resposta à formalina orofacial, não podemos afirmar, até o momento, que a seqüência da ativação destes mediadores seja a mesma na dor orofacial, embora esta possibilidade deva ser considerada.

#### 4.9 EFEITO DA DEXAMETASONA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

Os potentes efeitos anti-inflamatório e imunossupressor dos glicocorticóides parecem ser devido à inibição da atividade de fatores de transcrição que estão envolvidos na ativação de genes pró-inflamatórios. Além disso, os glicocorticóides interferem com as funções de células endoteliais, leucócitos e fibroblastos e inibem a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (CATO e WADE, 1996).

Com relação às citocinas, foi descrito anteriormente que os glicocorticóides são capazes de inibir a transcrição de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6, e das quimiocinas IL-8, RANTES e MIP-1 $\alpha$ , entre outras (BARNES, 1996).

Os glicocorticóides também podem inibir a síntese de vários mediadores inflamatórios através de um efeito inibitório na ação de enzimas que catalizam a síntese desses mediadores. Isto ocorre, por exemplo, com as enzimas NO sintase, responsável pela produção de óxido nítrico, e as formas induzidas de COX e fosfolipase A<sub>2</sub>, envolvidas na síntese de prostanóides (XIE et al., 1994; ADCOCK et al., 1994; MITCHELL et al., 1994; NEWTON et al., 1995).

Foi demonstrado ainda, que os glicocorticóides são capazes de diminuir a transcrição de genes para certos receptores. O receptor NK1, que medeia os efeitos inflamatórios da Substância P, tem sua expressão aumentada durante a asma. Este receptor pode ser inibido pelos glicocorticóides através de uma interação com o fator de transcrição AP-1 (ADCOCK et al., 1994; BARNES, 1996).

Diante desta ampla gama de efeitos, era esperado que os glicocorticóides inibissem totalmente a resposta à formalina orofacial. No entanto, nossos resultados mostram que o tratamento dos animais com dexametasona 1 hora antes da formalina causou apenas um bloqueio parcial da resposta em ambas as fases da resposta à formalina.

Como discutido anteriormente, os glicocorticóides exercem seus efeitos controlando a síntese de proteínas regulatórias. Isto explica a necessidade de um intervalo de tempo maior para que estas drogas possam ter efeito em algumas metodologias (NAKAMURA et al., 1985; TSURUFUJI et al., 1980). Deste modo, realizamos o tratamento dos animais com dexametasona 2 horas antes da aplicação da formalina, porém não foi observado efeito inibitório adicional nesta resposta (dados não mostrados). Este resultado corrobora com o estudo de HUNSKAAR e HOLE (1987), onde o tratamento dos animais com dexametasona 3 horas antes da aplicação de formalina na pata não induz a um aumento significativo no seu efeito, mesmo com a alta dose utilizada por estes autores (10 mg/kg).

Estes dados mostram o efeito antinociceptivo da dexametasona na dor orofacial. O bloqueio parcial da resposta pela dexametasona pode ser consequência da participação de mediadores não responsivos aos efeitos inibitórios dos glicocorticóides.

#### 4.10 PARTICIPAÇÃO DO GLUTAMATO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Existem várias evidências que indicam que receptores glutamatérgicos do tipo NMDA têm importante participação na transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal (AANONSEN e WILCOX, 1987; MJELLEM et al., 1991). Entretanto, estudos têm demonstrado que a injeção intraplantar de glutamato produz hiperalgesia mecânica em ratos (CARLTON et al., 1995; FOLLENFANT e NAKAMURA-CRAIG, 1992) e induz resposta nociceptivas em camundongos (BERITH et al., 2001) indicando o seu envolvimento na transdução dos impulsos nociceptivos na periferia (CARLTON, 2001). Corroborando estes dados, em nosso estudo a administração

local de glutamato resultou no aumento do tempo de fricção na fase II da nocicepção induzida por formalina orofacial.

Estudos subseqüentes demonstraram que a injeção intraplantar de agonistas dos receptores de glutamato NMDA, AMPA ou kainato resultavam em hiperalgesia mecânica e alodinia que poderia ser bloqueada com antagonistas apropriados (ZHOU et al., 1996). Em adição, injeções de antagonistas de receptores NMDA juntamente com a injeção de formalina na pata era capaz de suprimir a expressão de c-fos na medula espinhal, confirmando o envolvimento de receptores NMDA periféricos na transdução da informação nociceptiva (WANG et al., 1997).

A estimulação nociceptiva dos aferentes primários resulta na liberação de glutamato tanto central como periféricamente (GROOT et al., 2000; OMOTE et al., 1998). As reservas de glutamato para a ativação destes receptores periféricos são numerosas, dentre elas, pode-se destacar as próprias células do DGR, já que seus processos centrais e periféricos contém aminoácidos excitatórios (principalmente glutamato e aspartato), e os eferentes pós-ganglionares simpáticos. Estudos em animais sugerem que, o glutamato poderia ativar seus receptores periféricos resultando na liberação de noradrenalina, assim como outras substâncias presentes nos eferentes pós-ganglionares simpáticos. Desta forma ocorreria a modulação da informação nociceptiva periférica e também o controle local de alterações vasculares (CARLTON et al., 1998; CARLTON, 2001).

No teste de formalina na pata, a co-administração de formalina com antagonistas de receptores NMDA ou não-NMDA causou uma redução significativa da fase II da resposta (DAVIDSON et al., 1997; DAVIDSON e CARLTON, 1998). Com relação a dor orofacial, a administração de antagonistas de receptores NMDA no Sp5C reduziu a atividade neuronal aumentada e a hipersensibilidade induzida pela inflamação da polpa dental (CHIANG et al., 1998). Em nosso estudo, a administração do antagonista de receptores NMDA (AP-5) previamente à formalina reduziu significativamente a fase II da resposta, sugerindo o envolvimento do glutamato periférico atuando através de receptores NMDA neste processo.

Alguns antagonistas de receptores NMDA como quetamina, dextrorfano e memantina são atualmente utilizados em humanos. Estas drogas têm demonstrado efeito antinociceptivo em animais quando administradas sistemicamente (CARLTON e HARGETT, 1995; TAL e BENETT, 1994) ou localmente (DAVIDSON e CARLTON,

1998). No entanto, o uso da quetamina como analgésico em humanos está associado com importantes efeitos colaterais (EIDE et al., 1995). A evidência da existência de receptores NMDA na periferia e sua participação na dor orofacial pode indicar um potencial terapêutico para estas drogas aplicadas localmente, o que reduziria os efeitos colaterais observados com a administração sistêmica

Atualmente, uma droga que tem se mostrado efetiva clinicamente para o tratamento da neuralgia trigeminal, é a lamotrigina (CANAVERO et al., 1995; DEVULDER e LAAT, 2000, LUNARDI et al., 1997). Seus potentes efeitos analgésicos estão associados, ao menos em parte, à inibição da liberação de glutamato (LEACH et al., 1986; CHEUNG et al., 1992).

Em modelos de dor neuropática que envolvem constrição do nervo ciático ou indução de neuropatia diabética têm sido demonstrado que a administração sistêmica ou intratecal de lamotrigina reduz a hiperalgesia mecânica na pata de ratos (BOYCE et al., 1999; KLAMT, 1998; NAKAMURA-CRAIG e FOLLENFANT, 1995).

Em nosso estudo a administração sistêmica de lamotrigina causou uma redução significativa da fase II da resposta nociceptiva à formalina. As doses utilizadas que apresentaram efeito antinociceptivo não causaram déficit motor em animais testados no rotarod (CHRISTENSEN et al., 2001, BLACKBURN-MUNRO et al., 2002). O efeito antinociceptivo da lamotrigina também foi observado na fase II do teste de formalina injetada na pata de animais (BLACKBURN-MUNRO et al., 2002).

A demonstração do efeito antinociceptivo da lamotrigina associado às observações da participação do glutamato e de receptores NMDA periféricos, pode contribuir para a investigação de novas drogas eficazes no tratamento das dores de origem trigeminal.

## 5 CONCLUSÕES

A realização de curvas dose-resposta de formalina orofacial nos permitiram padronizar as condições experimentais e as concentrações de formalina (0,625 e 2,5%) a serem utilizadas em nossos experimentos. Nessas condições, os dados obtidos sugerem as seguintes propostas:

- Existem evidências da participação de PGs geradas via COX-2 na dor orofacial induzida por formalina pois o tratamento sistêmico com meloxicam e celecoxibe ou local com celecoxibe reduziu a fase II da resposta à formalina. Em adição, a administração local de PGE<sub>2</sub> causou uma potenciação da resposta à uma dose mais baixa de formalina. Por outro lado, a participação de PGs geradas via COX-1 parece pouco provável, visto que o tratamento local ou sistêmico com indometacina não modificou nenhuma das fases da resposta à formalina.
- Os leucotrienos não desempenham papel relevante no estabelecimento da dor orofacial induzida por formalina pois o tratamento sistêmico com MK 886 não modificou a resposta à formalina em nenhuma das fases avaliadas.
- Nossos dados sugerem a participação do sistema nervoso simpático na dor orofacial induzida por formalina pois o tratamento com agentes simpatolíticos, atenolol e guanetidina, reduziu significativamente a fase II da resposta induzida por formalina. Ainda, o tratamento local com tiramina resultou na potenciação da resposta nociceptiva induzida por uma baixa dose de formalina. Este efeito foi abolido nos animais tratados previamente com guanetidina, demonstrando que a potenciação da resposta era dependente da liberação de aminas simpatomiméticas.
- A BK participa da dor orofacial induzida por formalina, pois o tratamento dos animais com captopril causou uma potenciação de ambas as fases da resposta à formalina. Ainda, o tratamento sistêmico com HOE 140 reduziu ambas as fases da resposta à formalina, enquanto que o tratamento local com DALBK reduziu apenas a fase II, indicando que a BK participa desta resposta através da ativação de receptores B2 em ambas as fases, e através da ativação de receptores B1 na fase II da resposta.
- As endotelinas participam da dor orofacial induzida por formalina, visto que o tratamento dos animais com ET-1 potencializou a resposta induzida pela menor dose de formalina. Nossos dados sugerem que as endotelinas atuam via ativação de

receptores ET<sub>A</sub>, pois o tratamento local com BQ 123 reduziu as fases I e II da resposta à formalina. Por outro lado, o tratamento dos animais com BQ 788 não modificou nenhuma das fases avaliadas.

- A histamina participa da fase II da resposta à formalina orofacial através da ativação de receptores H1 pois o tratamento local dos animais com meclisina não modificou a fase I da resposta à formalina, mas reduziu significativamente a fase II.
- As citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 participam da fase II da nocicepção induzida por formalina pois a administração local destas citocinas causou a potenciação da fase II da resposta à uma baixa dose de formalina, e ainda, o tratamento local com um anticorpo anti-TNF $\alpha$  e antisoros anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 e anti-IL-8 reduziu a fase II da resposta à formalina.
- Pode-se sugerir a participação de mediadores não responsivos aos efeitos inibitórios dos glicocorticóides na resposta à formalina orofacial, pois o tratamento sistêmico dos animais com dexametasona reduziu apenas parcialmente ambas as fases da resposta à formalina.
- O glutamato participa, via ativação de receptores NMDA, da transmissão da informação nociceptiva periférica, pois o tratamento dos animais com AP5 reduziu significativamente a fase II da resposta à formalina orofacial.
- Nossos dados demonstram que uma combinação de mediadores são liberados após a estimulação periférica com formalina. Alguns destes mediadores são responsáveis tanto pela ativação (fase I), como pela manutenção desta resposta (fase II), no entanto a grande maioria está envolvida apenas na dor inflamatória (fase II). Além dos mediadores que nós identificamos é bastante provável que outras substâncias, cuja participação já foi demonstrada em outras metodologias para o estudo da dor, participem deste processo. A seqüência da liberação destes mediadores na dor orofacial ainda não está esclarecida. A definição de um mediador responsável pela iniciação desta cascata de liberação de mediadores poderia ser importante para o desenvolvimento de drogas mais efetivas para o tratamento de dores de origem trigeminal.

Os resultados obtidos neste estudo estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 – resultados obtidos nas fases I e II do teste de formalina orofacial

	fase I	fase II
<b>Participação dos metabólitos do ácido araquidônico</b>		
Indometacina (inibidor não seletivo da COX)***	↔	↔
Meloxicam (inibidor da COX-2)**	↔	↓
Celecoxibe (inibidor da COX-2)***	↔	↓
Prostaglandina E <sub>2</sub> *	↔	↑
MK886 sistêmico (inibidor da 5-lipoxigenase) **	↔	↔
<b>Participação das aminas simpatomiméticas</b>		
Atenolol (bloqueador β-adrenérgico) *	↓	↓
Guanetidina (depletor dos terminais noradrenérgicos) **	↔	↓
Tiramina (amina indireta) *	↔	↑
<b>Participação da bradicinina</b>		
Captopril (inibidor da cininase II) **	↑	↑
HOE 140 (antagonista de receptores B <sub>2</sub> ) **	↓	↓
DALBK (antagonista de receptores B <sub>1</sub> ) *	↔	↓
<b>Participação das endotelinas</b>		
Endotelina-1 *	↑	↑
BQ123 (antagonista de receptores ET <sub>A</sub> ) *	↓	↓
BQ788 (antagonista de receptores ET <sub>B</sub> ) *	↔	↔
<b>Participação da histamina</b>		
Histamina *	↔	↑
Meclisina (antagonista de receptores H1) *	↔	↓
<b>Participação das citocinas</b>		
TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 *	↔	↑
Anticorpo anti- TNF $\alpha$ e antisoros anti- IL-1 $\beta$ , anti-IL-6 e anti-IL-8 *	↔	↓
Dexametasona **	↓	↓
<b>Participação do glutamato</b>		
Glutamato *	↔	↑
AP-5 local (antagonista de receptores NMDA) *	↔	↓
Lamotrigina **	↔	↓

↔ sem efeito, ↓ redução da resposta nociceptiva, ↑ aumento da resposta nociceptiva

\* administração local, \*\* administração sistêmica, \*\*\* local e sistêmica.

## REFERÊNCIAS

- AANONSEN, L. M.; WILCOX, G. L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 9-19, 1987.
- ABBOTT, F. V.; HONG, Y.; BLIER, P. Activation of 5HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 1, p. 99-110, 1996.
- ABBOTT, F. V. BONDER, M. Options for management of acute pain in the rat. **Veterinary Record**, v.140, p. 553-557, 1997.
- ACKERMANN, L.; HARVIMA, I.T. Mast cells of psoriatic and atopic dermatitis skin are positive for TNF $\alpha$  and their degranulation is associated with expression of ICAM-1 in the epidermis. **Archives of Dermatological Research**, v. 290, p. 353-359, 1998.
- ADCOCK, I. M.; BROWN, C. R.; KWON, O. J.; BARNES, P. J.; Oxidative stress induces NF $\kappa$ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 199, p.1518-1524, 1994.
- ALMEIDA, F.R.C. Efeito da canulação intratecal crônica sobre a resposta nociceptiva em ratos . Ribeirão Preto, **Tese de Doutorado em Farmacologia**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1996.
- ALREJA, M.; MUTALIK, P.; NAYAR, U.; MANCHANDA, S. K. The formalin test: a tonic model in the primate. **Pain**, v. 20, p. 97-105, 1984.
- AMANN, R. ; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; PESKAR, B.A. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 306, p. 89-91, 1996.
- AMIR, S.; AMIT, Z. The pituitary gland mediates acute and chronic pain responsiveness in stressed and non-stressed rats. **Life Sciences**, v. 24, p. 439-448, 1979.
- ARRANG, J. M.; GARBAG, M.; LANCELOT, J. C.; LECOMTE, J. M.; POLLARD, H.; ROBBA, M.; SCHUNACK, W.; SCHWARTZ, J. C. Highly potent and selective ligands for histamine H<sub>3</sub> receptors. **Nature**, v. 327, p. 117-123, 1987.
- ARRANG, J.M. Pharmacological properties of histamine receptor subtypes. **Cellular and Molecular Biology**, v. 40, p. 273-279, 1994.

ASANO, M.; HATOTI, C.; INAMURA, N.; SAWAI, H.; HIROSUMI, J.; FUJIWARA, T.; NAKAHARA, K. Effects of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR167344, on different in vivo animal models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 1436-1440, 1997.

ASH, A. S. F.; SCHILD H. O. Receptors mediating some actions of histamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 27, p. 427-439, 1966.

AUPHAN, N.; DIDONATO, J. A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. **Science**, v. 270, p. 286-290, 1995.

AXELROD, J.; BURCH, R.M.; JELSEMA, C.L. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **Trends in Neurosciences**, v. 11, p. 117-123, 1988.

AYAKO, Y.; YOSHIDA, S.; HATA, Y.; KHALIL, A. K.; ISHIBASHI, T.; INOMATA, H. The role of NF $\kappa$ B in the retinal neovascularization in the rat: possible involvement of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC), a member of interleukin-8 family. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 429-436, 1998.

BARANIUK, J. N. Molecular actions of glucocorticoids: an introduction. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 141-142, 1996.

BARNES, P. J. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 159-168, 1996.

BARTON, B. E.; JAKAWAY, J. P.; SMITH, S.R.; SIEGEL, M.I. Cytokine inhibition by a novel steroid, mometasone furoate. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 13, p. 251-261, 1991.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control system: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 7, p. 309-338, 1984.

BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. In: **Principles of Neuroscience**. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T.M. (Ed.). 3 ed. New York: McGraw-Hill, , p. 472-491, 2000.

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

BEICHE, F.; SCHEUERER, S. ; BRUNE, K.; GEISLINGER, G.; GOPPEL-STUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **FEBS Letters**, v. 390, p. 165-169, 1996.

BEICHE, F.; KLEIN, T.; NÜSING, R.; NEUHUBER, W.; GOPPELT-STRUEBE, M. Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. **Journal of Neuroimmunology**, v. 89, p. 26-34, 1998.

BENOIST, J. M.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G. Experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve: changes in neuronal activities in the somatosensory cortices corresponding to the infraorbital nerve. **Experimental Brain Research**, v. 126, p. 383-398, 1999.

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

BERGSTRÖM S.; SAMUELSSON, B. The prostaglandins. **Endeavour**, v. 27, p. 109-113, 1968.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 67-185, 1987.

BEUSENBERG, F. D.; HOOGSTENDEN, H. C.; BONTA, I. L.; VAN AMSTERDAN, J. G. AMP enhancing drugs modulate eicosanoid release from human alveolar macrophages. **Life Science**, v. 54, p. 1269-1274, 1994.

BEVAN, M.A. In: **Pharmacology of Histamine Receptors**. Ganelin, C.R., Parsons, M.E. Wright, Bristo, p. 103-145, 1982.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacological Reviews**, v. 44, p. 1-80, 1992.

BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J. K.; Leukotriene B produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, v. 30, p. 791-797, 1985.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> receptors. **Nature**, v. 236, p. 385-390, 1972.

BLACKWELL, G. J.; CARNUCCIO, R.; DIROSA, M.; FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; PERISCO, P. Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoid drugs. **Nature**, v. 187, p. 147-149, 1980.

BLEY, K. R.; HUNTER, J. C.; EGLIN, R. M.; SMITH, J. A. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, V. 19, p. 141-147, 1998.

BODDEKE, E. W. G. M. Involvement of chemokines in pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 115-119, 2001.

BONGENHIELM, U.; BOISSONADE, F. M.; WESTERMARK, A.; ROBINSON, P. P.; FRIED, K. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. **Pain**, v. 82, n. 3, p. 283-288, 1999.

BOSSCHER, K. D.; BERGHE, W. V.; HAEGEMAN, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 16-22, 2000.

BOZZIC, C. R.; LU, B.; HOPKEN, U. E.; GERARD, C.; GERARD, N. P. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. **Science**, v. 273, p. 1722-1725, 1996.

BRODAL, A. **Neurological anatomy in relation to clinical medicine**, 3 ed, Oxford University Press, New York, 1981.

BUCKLEY, T. L.; BRAIN, S.D.; COLLINS, P.D.; WILLIAMS, T. J. Inflammatory edema induced by interactions between Il-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. **Journal of Immunology**, v. 146, n.10, p. 3424-3430, 1991a.

BUCKLEY, T. L.; BRAIN, S.D.; RAMPART, M.; WILLIAMS, T. J. Time dependent synergistic interactions between the vasodilator neuropeptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, n. 2, p. 1515-1519, 1991b.

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

BURGESS, P. R.; PERL, E.R. Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. In IGGO, A. **Handbook of Sensory Physiology, Somatosensory system**, v. 2, Springer, Berlin, 1973, p. 271-314.

BYRON, C.; FELDMAN, M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 104, p. 413-412, 1998.

CADET, R.; AIGOUY, L.; WODA, A. Enhanced nociceptive behaviour following conditioning injection of formalin in the perioral area of the rat. **Brain Research**, v. 676, p. 189-195, 1995.

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

CAMPBELL, J. N. et al. Responses to heat of C-fiber nociceptors in monkey are altered by injury in the receptive field but not by adjacent injury. **Pain**, v. 32, p.327-332, 1988.

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

CAMPOS, R.O. P.; ALVES, R. V.; FERREIRA, J.; KYLE, D. J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B. J.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884 a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 360, p. 78-286, 1999.

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.; 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.; CHUNG, K.; DING, Z.; COGGESHALL, R. E. Glutamate receptors on postganglionic sympathetic axons. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 601-605, 1998.  
CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 52-56, 2001.

CARSTENS, E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamina, capsaicin, and other irritants. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, p. 2499-2514, 1997.

CAS, R.; KUNTZMUN, R.; BRODIE, B. B. Norepinephrine depletion as a possible mechanism of guanetidine, a new hypotensive agent. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 103, p. 871-872, 1960.

CATO, A. C.; WADE, E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory actions of glucocorticoids. **BioEssays**, v. 18, p. 371-378, 1996.

CHANARIN, N.; JOHNSTON, S.L. Leukotrienes as a target in asthma therapy. **Drugs**, v. 47, p. 12-24, 1994.

CHANG, C.C.; COSTA, E. ; BRODIE, B.B. Interaction of guanetidine with adrenergic neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 147, p. 303-312, 1965.

CHANG, J.; GILMAN, S.C.; LEWIS, A. J. Interleukin-1 activates phospholipase A2 in rabbit chondrocytes: a possible signal for IL-1 action. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 1283-1287, 1986.

CHAPMAN, V.; DICKENSON, A. H. The effect of intrathecal administration of RP 67580, a potent neurokinin 1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 157, p. 149-152, 1993.

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

CHIANG, C. Y.; PARK, S.J.; KWAN, C. L. NMDA receptor mechanism contribute to neuroplasticity induced in caudalis nociceptive neurons by tooth pulp stimulation. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, p. 2621-2631, 1998.

CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 103, p. 349-353, 1989.

CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A.; RABOISSON, P. The orofacial formalin test in rats : effects of different formalin concentrations. **Pain**, v. 62, p. 295-301, 1995.

CODERRE, T. J.; ABOTT, F. V., MELZACK, R. Effects of peripheral anti-sympathetic treatments in the tail-flick, formalin and autotomy tests. **Pain**, v.18, p. 13, 1984a.

CODERRE, T. J.; ABOTT, F. V., MELZACK, R. Behavioral evidence for a peptidergic-noradrenergic interaction in cutaneous sensory function. **Neuroscience Letters**, v. 47, p. 113, 1984b.

CODERRE, T. J.; VACCARINO, A. L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Research**, v. 535, p. 155-158, 1990.

CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v. 52, p. 259-285, 1993.

COLLIER, H. O. J.; ROY, A. C. Hypothesis: inhibition of E prostaglandin-sensitive adenylyl cyclase as the mechanism of morphine analgesia. **Prostaglandin**, v. 7, p. 361-370, 1974.

CORRÊA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 193-198, 1993.

CORSINI, E. ; GALLI, C. L. Cytokines and irritant contact dermatitis. **Toxicology Letters**, v. 102, p. 277-283, 1998.

CRESTANI, F.; SEGUY, F.; DANTZER, R. Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. **Brain Research**, v. 542, p. 330-335, 1991.

CRISSMAN, R.S. et al. Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 169-183, 1996.

CUELLO, A.C.; RIBEIRO DA SILVA, A.; MA, W.; DEKONINCK, Y. HENRY, J. L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regulatory Peptides** v. 46, p. 155-164, 1993.

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. 765-67, 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SAUTEBIN, L.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; CAPUTI, A. P. Protective effects of Celecoxib on lung injury and red blood cells modification induced by carragenan in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 7098, p. 1-11, 2002.

DAHLÉN, S.E.; BJORK, J.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K.E.; HAMMARSTROM, S.; LINDGREN, J. A.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary vessels: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 78, p. 3887-3891, 1981.

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

DALLEL, R. RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M.; WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, v. 61, p. 11-16, 1995.

DALLEL, R. et al. Properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis of the rat. **Brain Research**, v. 521, p. 95-106, 1990.

DARIAN-SMITH, I. The trigeminal system. In: Iggo, A. **Hanbook of Sensory Physiology, Somatosensory system**, v. 2, Springer, Berlin, 1973, p. 271-314.

DAVAR, G.; HANS, G.; FAREED, M.U.; SINNOTT, C.; STRICHARTZ, G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. **Neuroreport**, v.9, p.2279-2283, 1998.

DAVIDSON, E. M.; COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport**, v.8, p. 941-946, 1997.

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, A. M. The trigeminal system: na advantageous experimentla model for studying neuronal development. **Development**, v. 103 , p. 175-183, 1988.

DAVIS , A. J.; PERKINS, M. N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.113, p. 63-68, 1994a.

DAVIS, K. D.; TREEDE, R. D.; RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. **Pain**, v. 47, n.3, p. 309-317, 1991.

DELEO, J. A.; YEZIERSKI, R. P. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. **Pain**, v. 90, p. 1-6, 2001.

DE MELO, J. D.; TONUSSI, C. R.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; RAE, G. A. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. **Pain**, V. 77, p. 261-269, 1998.

DEVULDER, J.; LAAT, M. Lamotrigine in the treatment of chronic refractory neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 19, n. 5, p. 398-403, 2000.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre simulation. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 1235-1238, 1987a.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to intrathecal opiate pre or post-formalin. **Pain**, v. 30, p. 349-360, 1987b.

DINARELLO, C. A.; IKEJIMA, T.; WARNER, S. J. C.; ORENCOLE, S. F.; LONNEMANN, G.; CANNON, J. G.; LIBBY, P. Interleukin-1 induces interleukin-1. Induction of circulating interleukin-1 in rabbits *in vivo* and in humans mononuclear cells *in vitro*. **Journal of Immunology**, v. 139, p. 1902-1910, 1997.

DIRIG, D. M.; KONIN, G. P.; ISAKSON, P. C.; YAKSH, T. L. Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and *in vitro* prostaglandin E<sub>2</sub> release. **European Journal of Pharmacology**, v. 331, p. 155-160, 1997.

DIVINETZ ROMERO, S.; CHYATTE, D.; BYER, D. E.; ROMERO, J.C.; YAKSH, T. L. Measurement of prostaglandins in the cerebrospinal fluid in cat, dog and man. **Journal of Neurochemistry**, v. 43, p. 1642-1649, 1984.

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

DUALE, C.; LUCCARINI, P.; CADET, R.; WODA, A. Effects of morphine microinjections into the trigeminal sensory complex on the formalin test in the rat. **Experimental Neurology**, v.142, p. 331-339, 1996.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, n. 2, p. 341-343, 1988.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation on the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 289-293, 1990.

DUBNER, R.; SUMINO, R.; WOOD, D. A peripheral cold fiber population responsive to innocuous and noxious thermal stimuli applied to monkey's face. **Journal of Neurophysiology**, v. 38, p. 1373-1389, 1975.

DUBNER, R.; SESSLE, B.; STOREY, A. **The neural basis of oral and facial function**. Plenum Press, London, p. 1-56, 1978.

DUBNER, R.; BENNET, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, p. 381-418, 1983.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 164-174, 1977.

DYMSHITZ, J.; VASKO, M. R. Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 167, p. 128-132, 1994.

EHRENREICH, H.; ANDERSON, R. W.; FOX, C. H.; RIECKMANN, P.; HOFFMAN, G. S.; TRAVIS, W. D.; COLIGAN, J. E.; KEHRL, J. H.; FAUCI, A.S. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, p. 1741-1748, 1990.

EIDE, P. K.; STUBHAUG, H.; OYE, I.; BRIEVIK, H. Continuous subcutaneous administration of NMDA receptor antagonist ketamine in the treatment of postherpetic neuralgia. **Pain**, v. 61, p. 221-228, 1995.

EISENBERG, E. ; VOS, B. P. ; STRASSMAN, A. M. The peripheral antinociceptive effect of morphine in a rat model of facial pain. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 519-525, 1996.

ENGLAND, S. ; BEVAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP-protein kinase cascade. **Journal of Physiology**, v. 495, p. 429-440, 1996.

EULER, U. S. VON. Some aspects of the actions of prostaglandins. The first Heymans Memorial Lecture. **Archives of Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 202, suppl, p. 295-307, 1973.

FABRICIO, A. S. C.; ZAMPRONIO, A. R.; ORLÉAN-JUSTE, P. D.; RAE, G. A.; SOUZA, G. E. P. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1 dependent fever induced by pre-formed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. Trabalho submetido ao **British Journal of Pharmacology**, 2002.

FANSELOW, M.S.; BAACHES, M. P. Conditioned fear induced opiate analgesia on the formalin test: evidence for two aversive motivational systems. **Learning and Motivation**, v. 13, p. 200-221, 1982.

FARMER, S.G.; BURCH, R. M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 511-536, 1992.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, n. 6; p. 347-349, 1965.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin like drugs and analgesia. **Nature New Biology**, v. 240, n. 102, p. 200-203, 1972.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B; CORREA, F. M. A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin like drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 39-48, 1978a.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. **Prostaglandins**, v.16, n.1, p. 31-37, 1978b.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I-Prostaglandin hyperalgesia: a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p. 179-190, 1979.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents and Actions**, v.10, p. 229-30, 1980.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins: peripheral and central analgesia. **Advances in Pain Research Therapy**, v. 5, p. 627-634, 1983.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonised by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin -1 participation in overt and inflammatory pain. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 13, n .5, p. 220-222, 1989.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, p. 365-371, 1990.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 1993.

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

FILEP, J.G.; FOURNIER, A.; FOLDES-FILEP, E. Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea pig lung: involvement of ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, p. 227-236, 1995.

FINSNES, F.; CHRISTENSEN, G.; LYBERG, T.; SEJERSTED, O.M.; SKJONBERG, O. H. Increased synthesis and release of endothelin-1 during the initial phase of airway inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, p. 1600-1606, 1998.

FISHER, K.; CODERRE, T. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGLURs) to formalin-induced nociception. **Pain**, v. 68, p. 255-263, 1996.

FLOWER, R. J.; BLACKWELL, G. J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 270, p. 456-459, 1979.

FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1 : cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 71-76, 1994.

FOLLENFANT, R. L.; NAKAMURA-CRAIG, M.; HENDERSON, B.; HIGGS, G. A. Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 $\beta$ -induced prostaglandin-independent hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.98, p. 41-43, 1989.

FOLLENFANT, R. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Glutamate induces hyperalgesia in the rat hind paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 49, 1992.

FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. H. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v. 286, p. 264-265, 1980.

FORD-HUTCHINSON, A.W. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. **Federation Proceedings**, v. 44, p. 25-29, 1985.

FRANKLIN, K. B. J.; ABBOTT, F.V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In : **Neuromethods**, v. 13, p. 145, 1989.

FU, J.Y. MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and supression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (ciclooxigenase) in human monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 16737-16740, 1990.

FUCHS, P.N.; RINGKAMP, M.; SHIOTANI, M.; RAJA, S. N. Sympathectomy decreases formalin-induced nociceptive responses independent of changes in peripheral blood flow. **Experimental Neurology**, v. 155,p. 95-102, 1999.

FUGISAWA, H.; WANG, B.; KONDO, S.; SHIVJI, G. M.; SAUDER, D. N. Costimulation with ultraviolet B and interleukin-1 $\alpha$  dramatically increase TNF $\alpha$  production in humam dermal fibroblasts. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 17, p. 307-313, 1997.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMITSU, T.; TAKESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of of interleukin-1 $\beta$  in the rat. **Brain Research**, v. 657, p.133-1140, 1994.

GADIENT, R. A.; OTTEN, U. Postnatal expressionof interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia. **Brain Research**, v. 724, p. 41-46, 1996.

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

GARRET, C.; CARRUETE, A.; FARDIN, V.; MOUSSAOUI, S.; PEYRONEL, J. F.; BLANCHARD, J. C.; LADURON, P. M. Pharmacological properties of a potent and selective non-peptide substance P antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 88, p. 10208-10212, 1991.

GHOSTINE , S. Y.; COMIAR, Y. G.; TURNER, D. M.; KASSEL, N. F.; AZAR, C. G. Phenoxybenzamine in the treatment of causalgia. Report of 40 cases. **Journal of Neurosurgery**, v. 60, p. 1263, 1984.

GIAID, A.; GIBSON, S. J.; IBRAHIM, B.N.; LEGON, S.; BLOOM, S. R.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T.; VARNDELL, I. M.; POLAK, J.M. Endothelin-1 , na endothelium derived peptide , is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 86, p. 7634-7638, 1989.

GILBERT, S. D.; CLARK, T. M.; FLORES, C. M. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. **Pain**, v. 89, p. 159-165, 2001.

GOEDERT, M.; STOECKEL, K.; OTTEN, U. Biological importance of the retrograde axonal transport of nerve grow factor in sensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 78, p. 5895-5898, 1981.

GOLD, M. S.; LEVINE, J. D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R Ina by PKC and PKA and their role in PGE2 induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 10345-10355, 1998.

GONZALES, R.; GOLDYNE, M. E.; TAYWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Production of hyperalgesic prostaglandins by postganglionic sympathetic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 53, n. 5, p. 1595-1598, 1989.

GRANADOS-SOTO, V.; FLORES-MURRIETA, F. J.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Evidence for the involvement of nitric-oxide in the antinociceptive effect of Ketorolac in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, p. 281-284, 1995.

GRAZIANO, F. M. Mast cells and mast cells products. **Methods in Enzymology**, v.162, p. 501-522, 1988.

GRIESBACHER, T.; AMANN, R.; SAMETZ, W.; DIETHART, S.; JUAN, H. The nonpeptide B2 receptor antagonist FR173657: inhibition of effects of bradykinin related to its role in nociception. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1328-1334, 1998.

GRISWOLD, D. E.; MARSHALL, P.; MARTIN, L.; WEBB, E. F.; ZABKOPOTAPOVICH, B. Analgesic activity of SK and F105809, a dual inhibitor of arachidonic acid metabolism. **Agents and Actions**, v. 32, p. 113-117, 1991.

GRISWOLD, D. E.; DOUGLAS, S. A.; MARTIN, L. D.; DAVIS, T. G.; DAVIS, L. AO, Z.; LUTTMANN, M. A.; PULLEN, M.; NAMBI, P.; HAY, D. W.; OHLSTEIN, E. H. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p. 807-812, 1999.

GROOT, J. F.; ZHOU, S.; CARLTON, S. M. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. **Neuroreport**, v. 11, p. 497-502, 2000.

GUEX, C. Y.; WITTEWER, A.J.; ROBERGE, F. G. Intraocular production of a cytokine (CINC) responsible for neutrophil infiltration in endotoxin induced uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 80, p. 649-653, 1996.

HAGERMARK, O.; STRANDBERG, K.; GRONNEBERG, R. Effects of histamine receptor antagonists on histamine induced responses in human skin. **Acta Dermato - Venereologica**, v. 59, p. 297-300, 1979.

HALL, J.M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 56, p. 131-190, 1982.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. Thromboxane: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 72, p. 2994-2998, 1975.

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

HANDWERKER, H. O. Electrophysiological mechanisms in inflammatory pain. **Agents and Actions**, v. 32, p. 91-99, 1991.

HANDWERKER, H. O.; REEH, P. W. Pain and inflammation. In: BOND et al. **Proceedings of the VIth World Congress on Pain**.1991, p. 56-70.

HANNINGTON-KIFF, J. G. Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. **Lancet**, v. 1, p. 1019, 1974.

HAWKEY, C. J. COX-2 inhibitors. **Lancet**, v. 353, p. 307-314, 1999.

HELKE, C. J.; KRAUSE, J. E.; MANTHY, P. W.; COUTURE, R.; BANON, M.J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons : multiple peptides , receptors and regulatory mechanisms, **FASEB Journal**, v. 4, p. 1606-1615, 1990.

HIRATA, F.; SCHIFFMANN, E.; VENKATASUBAMANIAN,K.; SALOMON, D.; AXELROD, J. A phospholipase A2 inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 77, p. 2533-2536, 1980.

HIGGS, G. A.; FOLLENFANT, R.L.; GARLAND, L. G. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids : effects on acute inflammatory responses. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 547-551, 1988.

HILL, S.J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacology**, v. 42, p. 45-83, 1990.

HILL, H. E.; KORNETSKY, H. G.;FLANARY, A.; WIKLER,A. Effects of anxiety and morphine on discrimination of intensities of painful stimuli. **Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p. 473-480, 1952.

HONG, Y.; ABBOTT, F. V. Contribution of peripheral  $\alpha_{1A}$  adrenoceptors to pain induced by formalin or by  $\alpha$ -metil-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 301, p. 41-48, 1996.

HORIZOE, T.; NAGAKURA, N.; CHIBA, K.; SHIROTA, H.; SHINODA, M.; KOBAYASHI, M.; NUMATA, H.; OKAMOTO, Y.; KOBAYASHI, S. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid -induced ear inflammation model. **Inflammation Research**, v. 47, p.375-383, 1998.

HOUGH, L. B.; NALWALK, J. W.; LI, B. Y.; LEURS, R.; MENGE, W. M.; TIMMERMAN, H.; CARLILE, M. E.; CIOFFI, C.; WENTLAND, M. Novel qualitative structure-activity relationships for the antinociceptive actions of H2 antagonists and H3 antagonists and derivatives. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.283, p. 1534-1543, 1997.

HUA, X. Y.; YAKSH, T. L. Pharmacology of the effects of bradykinin, serotonin and histamine on the release of calcitonin gene-related peptide from C-fiber terminals in the rat trachea. **Journal of Neuroscience**, v.13, n.5, p. 1947-1953, 1993.

HUBER, M.; BEUTLER, B.; KEPPLER, D. Role of peptide leukotrienes and their hepatobiliary elimination in endotoxin action. **Circ. Shock**, v. 14, p. 233-235, 1984.

HUTCHEON, B.; PUIL, E.; SPIGELMAN, I. Histamine actions and comparison with substance P effects in trigeminal neurons. **Neuroscience**, v. 55, p. 521-529, 1993.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Vasoactive mediators release by endothelins. **Pharmacological Research**, v. 26, p. 223-242, 1992.

ICHITANI, Y.; SHI, T.; HAEGGSTROM, J. Z.; SAMELSSON, B.; HÖKFELT, T. Increased levels of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord after peripheral inflammation: *in situ* hybridization study. **Neuroreport**, v.8, p. 2325-2329, 1997.

IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Experimental Brain Research**, v. 116, p. 97-103, 1997.

INAGAKI, M.; TSURI, T.; JYOYAMA, H.; ONO, T.; YAMADA, K.; KOBAYASHI, M.; HORI, Y.; ARIMURA, A.; YASUI, K.; OHNO, S.; KAKUDO, S.; KOIZUMI, K.; SUZUKI, R.; KAWAI, S.; KATO, M.; MATSUMOTO, S. Novel antiarthritic agents with 1,2-isothiazolidine -1,1dioxide skeleton: cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2040-2048, 2000.

IÑIGUEZ, M. A.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: Regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 111-119, 1999.

INOUE, A.; IKOMA, K.; MORIOKA, N.; KUMAGAI, K.; HASHIMOTO, T.; NAKATA, Y. Interleukin-1 induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase -2 system. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 2206-2213, 1999.

ISHIDA, K.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptideformyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 496-500, 1990.

JESSEL, T. M.; KELLY, D. D. Pain and analgesia. In: KANDEL, E. R.; SCHARWITZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. Prentice Hall do Brasil, Rio de Janeiro, 1991, p. 385-399.

JUNGER, H.; SORKIN, L. S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF $\alpha$ . **Pain**, v. 85, p. 145-151, 2000.

KASHIBA, H.; FUKUI, H.; MORIKAWA, Y.; SENBA, E. Gene expression of histamine H<sub>1</sub> receptor in guinea pig primary sensory neurons: a relationship between H<sub>1</sub> receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. **Molecular Brain Research**, v. 66, p. 24-34, 1999.

KINDGEN-MILLES, D.; KLEMENT, W. Pain and inflammation evoked in human skin by bradykinin receptors antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 218, p. 183-185, 1992.

KIRNBAUER, R.; KÖCK, A.; SCHWARZ, T.; URBANSKI, A.; KRUTMANN, J.; BORTH, W.; DAMM, D.; SHIPLEY, G.; ANSEL, J. C. IFN-beta 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. **Journal of Immunology**, v. 142, n. 6, p. 1922-1928, 1989.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NAZARAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. **Blood**, v. 86, p. 1243-1254, 1995.

KLEMM, P.; WARNER, T. D.; HOHLFELD, T.; CORDER, R.; VANE, J.R. Endothelin-1 mediates *ex vivo* coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 92, p. 2691-2695, 1995.

KRUGER, L.; YOUNG, R. F. Specialised features of the trigeminal nerve and its central connections. In: SAMII, M.; JANETA, P. J. **The cranial nerves**. Springer, Berlim, 1981, p. 273-301.

KUNOS, G.; MOSQUEDA-GARCIA, R.; MASTRIANNI, J. A.; ABBOTT, F. V. Endorphinergic mechanism in the central cardiovascular and analgesic effects of clonidine. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, p. 1624, 1987.

LAMBERTI, C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.; MALMBERG-AIELLO, P. Investigation into the role of histamine receptors in rodent antinociception. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, p. 567-574, 1996.

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

LAWSON, S. N. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In: SCOTT, S. A. **Sensory neurons, diversity, development and plasticity**. Oxford University Press, New York, 1992, p. 27-59.

LAZAROV, N. E. The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**, v. 153, p. 1-103, 2000.

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, 1986.

LEMBECK, F.; HOLZER, P. Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 310, p. 175-183, 1979.

LEVINE, J. D.; LAU, W. ; KWIAT, G.; GOETZL, E. J. Leukotriene B<sub>4</sub> produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, p. 743-745, 1984.

LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. O.; COLLINS, S. D.; TAM, J. K. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 323, p. 158, 1986.

LEWIS, T. Blood vessels of the human skin and their responses. **Shaw & Sons**, London, 1927.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 645-655, 1990.

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

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S.H. Prostaglandins hyperalgesia: a AMPc/Ca<sup>++</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p. 179-190, 1981.

LUKÁŠ, Z.; CZECH, S.; BURIÁNEK, P. Cholinesterase and biogenic amines in ganglion semilunare (Gasseri). **Histochemie**, v. 22, p. 163-168, 1970.

LUNARDI, G.; LEANDRI, M.; ALBANO, C.; CULTRERA, S.; FRACASSI, M.; RUBINO, V.; FAVALE, E. Clinical effectiveness of lamotrigine and plasma levels in essential and symptomatic trigeminal neuralgia. **Neurology**, v. 48, n. 6, p. 1714-1717, 1997.

MADISON, S.; WHITSEL, E. A.; SUAREZ-ROCA, H.; MAIXNER, W. Sensitizing effects of leukotriene b<sub>4</sub> on intradental primary afferents. **Pain**, v. 49, p. 99-104, 1992.

MACCUMBER, M.W., ROSS, C.A., SNYDER, S.H. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 87, p. 2359-2363, 1990.

MACMAHON, S. B. Novel class of nociceptors: beyond Sherrington. **TINS**, v. 13, 199-201, 1990.

MAIHÖFNER, C.; TEGEDER, I.; EUCHENHOFER, C.; de WITT, D.; BRUNE, K.; BANG, R.; NEUHUBER, W.; GEISLINGER, G. Localization and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. **Neuroscience**, v.101, n. 4, p. 1093-1108, 2000.

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

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

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 1069-1075, 1995b.

MARFURT, C. F. The somatotopical organization of the cat trigeminal ganglion as determined by horseradish peroxidase technique. **Anatomical Record**, v. 201, p. 105-118, 1981.

MARKSTEINER, J.; SPERK, G.; KRAUSE, J. E. Distribution of neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Comparative Neurology**, v. 317, p. 341-356, 1992.

MARTIN, H. BASBAUM, A. ; KWIAT, G.; GOETZL, E.; LEVINE, J. Leukotriene and prostaglandins sensitization of cutaneous high threshold-C and A delta mechanonociceptors in hairy skin of rat hind limbs. **Neuroscience**, v. 22, p. 651-659, 1987.

MARTLING, C. R.; SARIA, A.; FISCHER, J.A.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J.M. Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. **Regulatory Peptides**, v.20, n. 2, p. 125-139, 1988.

MARZ, P. OTTEN, U.; ROSE-JONH, S. Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2995-3004, 1999.

MASAKI, T.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K. Physiology and pharmacology of endothelins. **Medicinal Research Reviews**, v. 12, p. 391-421, 1992.

MASTRIANNI, J.A.; ABBOTT, F. V.; KUNOS, G. Activation of central  $\mu$ -opioid receptors is involved in clonidine analgesia in rats. **Brain Research**, v. 479, p. 283, 1989.

McMAHON, S.B. Mechanisms of sympathetic pain. **British Medical Bulletin**, v. 47, p. 584, 1991.

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C. L. GEBHART, G. F. Acute mechanical hyperalgesia is produced by coactivation of AMPA and metabotropic glutamate receptors. **Neuroreport**, v. 4, p. 879-882, 1993.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Nitric Oxide and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms : a new teory. **Science**, v. 150, p. 971-979, 1965.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthetist**, v. 46, n. 2, p. 142-153, 1997.

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

MITCHELL, J. A.; BEIVISI, M. G.; AKARASCREEMOM, P. Induction of cicloxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 1008-1014, 1994.

MIZEL, S. B.; DAYER, J. M.; KRANE, S. M.; MERGENHAGEN, S. E. Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (Interleukin-1). **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 78, p. 2474-2477, 1983.

MJELLEM-JOLY, N.; LUND, A.; BERGE, O. G.; HOLE, K. Potentiation of a behavioural response in mice by spinal coadministration of substance P and excitatory amino acid agonists. **Neuroscience Letters**, v. 133, n. 1, p. 121-124, 1991.

MOBARAKEH, J. I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMA, S.; KUTSUWA, M.; KURAMASU, A.; LIN, Z. Y.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, Y.; WATANABE, T.; YANAI, K. Role of histamine H1 receptor in pain perception : a study of the receptor gene knockout mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 391, p. 81-89, 2000.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated form arteries transforms prostaglandins endoperoxides to na unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663-665, 1976.

MORITA, M.; HOSOBUCHI, Y. Descending trigeminal tractotomy for trigeminal neuralgia affect surgical failure, stereotactic funct. **Neurosurgery**, v. 59, p. 52-55, 1992.

MULLER-PEDDINGHAUS, R.; KOHLSDORFER, C.; THEISEN-POPP, P.; FRUCHTMANN, R.; PERZBORN, E.; BECKERMANN, B.; BUHNER, K.; AHR, H.J.; MOHRS, K.H. Bay X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis : in vivo inflammation pharmacology and pharmacokinetics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, p. 51-57, 1993.

MURPHY, P. G.; BORTHWICK, L. S.; RICHARDSON, P. M. Nature of the retrograde signal from injured nerves that induce interleukin-6 mRNA in neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 3791-3800, 1999.

MUTH-SELBACH, U. S.; TEGEDER, I.; BRUNE, K.; GEISLINGER, G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E<sub>2</sub> release after peripheral noxious stimulation. **Anesthesiology**, v. 91, p. 231-239, 1999.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 250-260, 1987.

NAKAMURA, H.; MIZUSHIMA, Y.; SETO, Y.; MOTOYOSHI, S.; KADOKAWA, T. Dexamethasone fails to produce antipyretic and analgesic actions in experimental animals. **Agents and Actions**, v. 16, p. 542-547, 1985.

NEUNER, P.; URBANSKI, A.; TRAUTINGER, F.; MOLLER, A. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 27-33, 1991.

NEWTON, R. ; ADCOCK, I.M.; BARNES, P.J. Stimulation of COX-2 message by cytokines or phorbol ester is preceded by a massive and rapid induction of NF $\kappa$ B binding activity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, p. A 165, 1995.

NICOL, G. D.; KLINGBERG, D. K.; VASKO, M. R. Prostaglandin E<sub>2</sub> increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 1917-1927, 1992.

NICOL, G. D.; VASKO, M. R.; EVANS, A.R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, p. 167-176, 1997.

NISHIHARA, I.; MINAMI, T.; WATANABE, Y.; ITO, S.; HAYAISHI, O. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates glutamate release from synaptosomes of rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 196, p. 57-60, 1995.

NISHISHO, T.; TONAI, T.; TAMURA, Y.; IKATA, T. Experimental and clinical studies of eicosanoids in cerebrospinal fluid after spinal cord injury. **Neurosurgery**, v. 39, p. 950-957, 1996.

OCHI, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. The analgesic profile of FR 122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **European Journal of Pharmacology**, v. 391, p. 49-54, 2000.

OH, S. B.; TRAN, P. B.; GILLARD, S. E.; HURLEY, R. W.; HAMMOND, D. L.; MILLER, R. J. Chemokines and glycoprotein 120 produce pain and hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 5027-5035, 2001.

OKA, T.; OKA, K.; HOSOI, M.; HORI, T. Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. **Brain Research**, v. 692, p. 123-128, 1995.

OLUYOMI, A.O.; HART, S.L. Involvement of histamine in naloxone-resistant and naloxone-sensitive models of swim stress induced antinociception in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 30, p. 1021-1027, 1991.

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

PAGE, C. P. Platelets as inflammatory cells. **Immunopharmacology**, v. 17, p. 51-59, 1989.

PAJOT, J.; PELISSIER, T.; SIERRALTA, F.; RABOISSON, P.; DALLEL, R. Differential effects of trigeminal tractotomy on A $\delta$ - and C-fiber-mediated nociceptive responses. **Brain Research**, v. 863, p. 289-292, 2000.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The Major Role of Peripheral Release of Histamine and 5-Hydroxytryptamine in Formalin-Induced Nociception. **Neuroscience**, v.102, n.4, p. 937-944, 2001.

PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E.; DRAY, A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, desArg<sup>9</sup>, [Leu<sup>8</sup>]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 53, p. 191-197, 1993.

PERKINS, M.N.; KELLY, D. Interleukin-1b induced-desArg<sup>9</sup> bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 657-660, 1994.

PERKINS, M.N.; KELLY, D.; DAVIS, A. J. Bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 832-836, 1995.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S. M.; PESQUERO, J. L.; PAIVA, A. C. M.; CALIXTO, J. B.; LEWIN, G. R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **PNAS**, v. 97, n. 14, p. 8140-8145, 2000.

PETROVAARA, A. Antinociception induced by alpha-2-adrenoceptor agonists with especial emphasis on medetomidine studies. **Progress in Neurobiology**, v. 40, p. 691, 1993.

PFALLER, K.; ARVIDSSON, J. Central distribution of trigeminal and upper cervical primary afferents in the rat studied by anterograde transport of horseradish peroxidase conjugated to wheat germ agglutinin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 268, p. 91-108, 1988.

PIMENTA, F. J. G. S.; DUARTE, I. D. G.; FRANCISCHI, J. N.; TATSUO, M. A. K. Peripheral antinociceptive effect induced by dipirone as detected by the orofacial model. **Anais do XVI Congresso Latino Americano de Farmacologia**, p. 352-353, 2000.

PIOVESAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C. R.; RAE, G. A. Endothelins potentiate formalin induced nociception and paw edema in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 75, p. 596-600, 1997.

PIOVESAN, A. P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; TONUSSI, C. R.; RAE, G. A. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 351, p. 15-22, 1998.

POMONIS, J. D.; ROGERS, S. D.; PETERS, C. M.; GHILARDI, J. R.; MANTYH, P. W. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 999-1006, 2001.

POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor  $\alpha$  and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 649-656, 1999.

PROCTER, M. J.; HOUGHTON, A. K.; FABER, E. S. Actions of kainate and AMPA selective glutamate receptor ligands on nociceptive processing in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 1287-1297, 1998.

RABOISSON, P.; BOURDIOL, P.; DALLEL, R.; CLAVELOU, P.; WODA, A. Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 125, p. 179-182, 1991.

RACKHAM, A.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Inflammation and pain sensitivity: effects of leukotrienes D4, B4 and prostaglandin E1 in the rat paw. **Prostaglandins**, v.25, n. 2, p. 193-201, 1983.

RAFFA, R.B.; JACOBY, H.I. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit a abdominal constriction response in mice. **Life Sciences**, v. 48, p. 85-90, 1991.

RAFFA, R.B.; SCHUPSKY, J.J.; JACOBY, H.I. Endothelin-induced nociception in mice: mediation by ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 276, p. 647-651, 1996.

RAJA, S.N.; CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. **Brain**, v. 107, p. 1179-1188, 1984.

RAJA, S.N.; TREEDE, R. D.; DAVIS, K. D.; CAMPBELL, J. N. Systemic alpha adrenergic blockade with phentolamine: a diagnostic test for sympathetically maintained pain. **Anesthesiology**, v. 74, p. 691, 1991.

RAJAONA, J.; DALLEL, R.; WODA, A. Is electrical stimulation of the rat incisor an appropriate experimental nociceptive stimulus? **Experimental Neurology**, v. 93, p. 291-199, 1986.

RAMWELL, P.W.; SHAW, J.E.; JESSUP, R. Spontaneous release of prostaglandins from frog spinal cord. **American Journal of Physiology**, p. 998-1004, 1966.

RANG, H. P.; BEVAN, S. J.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **British Medical Bulletin**, v. 47, p. 534-548, 1991.

REGOLI, D. et al. Conversion of kinins and their antagonists into B1 receptor activators and blockers in isolated vessels. **European Journal of Pharmacology**, v. 17, p. 219-224, 1986.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261-273, 1949.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 110-114, 2000.

ROSENFELD, J. P.; BROTON, J.G.; CLAVIER, R.M. A reliable facial nociception device for unrestrained awake animals: effects of morphine and trigeminal complex lesions. **Physiology & Behavior**, v. 21, p. 287-290, 1978.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: Effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

ROSSI, V.; BREVIARIO, F. D.; GHEZZI, P.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A. Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. **Science**, v. 229, p. 174-176, 1985.

RUMORE, M. M.; SCHLICHTING, D. A. Analgesic effects of antihistaminics. **Life Sciences**, v. 36, p. 403-416, 1985.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; KANAAN, S. A.; JALAKHIAN, R. H.; JABBUR, S. J.; SAADE, N. E. Involvement of interleukin-1 $\beta$ , nerve growth factor, and prostaglandin E<sub>2</sub> in the hyperalgesia induced by intraplantar injections of low doses of thymulin. **Brain Behavior and Immunity**, v. 11, p. 185-200, 1997.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; HADDAD, J. J.; MASSAAD, C. A.; JABBUR, S. J.; SAADÉ, N. E. The role of sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. **Neuropharmacology**, 2001.

SAMUELSSOM, B. Biosynthesis of prostaglandins. **Federation Proceedings.**, v. 31, p. 1442-1460, 1972.

SAMUELSSOM, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, p. 568-575, 1983.

SANTINI, M. Adrenergic fibres in the feline Gasserian ganglion. **Life Sciences**, v. 5, p. 283-287, 1996.

SCHAIBLE, H. G.; SCHIMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **Journal of Neurophysiology**, v. 60, n. 6, p. 2180-2195, 1988.

SCHEINMAN, R. I.; COGSWELL, P. C.; LOFQUIST, A. K.; BALDWIN JR., A. R. Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, p. 283-286, 1995.

SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBAG, M.; POLLARD, H.; RUAT, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 1-51, 1991.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SERHAN, C. N.; FIERRO, I. M.; CHIANG, N.; POULIOT, M. Nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A<sub>4</sub>. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 3650-3654, 2001.

SESSLE, B.J. Mechanisms of trigeminal and occipital pain. **Pain**, v. 3, p. 91-116, 1996.

SHERRINGTON, C. S. The Integrative Action of the Nervous System. **Scribner**, 1906.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCS). **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1368-1373, 2000.

SHIMADA, S. G.; OTTERNESS, I. G.; STITT, J.T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents and Actions**, v. 41, p. 188-192, 1994.

SOTER, N. A.; LEWIS, R. A.; COREY, E. J.; AUSTEN, K. F. Local effects of synthetic leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, and LTB<sub>4</sub>) in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 2, p. 115-119, 1983.

STANKOVA, J.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. ET-1 induces interleukin-6 gene expression in human umbilical vein endothelial cells : synergistic effect of interleukin-1. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1073-C1078, 1996.

STEIN, B.; BALDWIN, A. S.; BALLARD, D. W.; GREENE, W. C.; ANGEL, P.; HERRLICH, P. Cross-coupling of the NF $\kappa$ B p65 and Fos-Jun transcription factors produces potentiated biological functions. **EMBO Journal**, v. 12, p. 3879-3891, 1993.

STERANKA, L. R.; MANNING, D.C.; DEHAAS, C. J.; FERKANY, J. W.; BOROSKI, 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 of USA**, v. 85, p. 3245-3249, 1988.

STREITER, R. M.; KUNKEL, S. L.; SHOWELL, H. J.; REMICK, D. G.; PHAN, S. H.; WARD, P. A.; MARKS, R. M. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- $\alpha$ , LPS and IL-1 $\beta$ . **Science**, v. 243, p. 1467-1469, 1989.

SUFKA, K. J.; ROACH, J. T. Stimulus properties and antinociceptive effects of selective bradykinin B1 and B2 receptor antagonists in rats. **Pain**, v. 66, n. 1, p. 99-103, 1996.

SUGIMOTO, T.; TAKEMURA, T.; SAKAI, A.; ISHIMARU, M. Cell size analysis of trigeminal primary afferent neurons comprising individual peripheral branches of the rat mandibular nerve. **Experimental Neurology**, v. 93, p. 565-573, 1986.

SUH, H. H.; FUJIMOTO, J. M.; TSENG, L. F. Differential mechanisms mediating  $\beta$  endorphin and morphine-induced analgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 168, p. 61-70, 1989.

SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H. H.; HAN, S. S.; KEUM, Y. S.; PARK, K. K.; LEE, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF $\kappa$ B activation. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 243-268, 2001.

SWEITZER, S. M.; COLBURN, R. W.; RUTKOWSKI, M.; DELEO, J. A. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 $\beta$  expression that correlates with pain behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 22, p. 209-221, 1999.

TAL, M.; BENNET, G. J. Neuropathic pain sensations are differentially sensitive to dextrophan. **Neuroreport**, v. 5, p. 1438-1440, 1994.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5, 1992.

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

TONAI, 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.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 326, p. 61-65, 1997.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates carragenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, v. 82, p. 81-87, 1999.

TREEDE, R. D.; DAVIS, K. D.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, S.N. The plasticity of cutaneous hyperalgesia during sympathetic ganglion blockade in patients with neuropathic pain. **Brain**, v. 115, p. 607, 1992.

TSURUFUJI, S.; SUGIO, K.; TAKEMASA, F.; YOSHIZAWA, S. Blockade by antiglucocorticoids, actinomycin D and cycloheximide of anti-inflammatory action of dexamethasone against bradykinin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 212, p. 225-231, 1980.

USUNOFF, K. G.; MARANI, E.; SCHOEN, J. H. R. The trigeminal system in man. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**, v. 136, p. 1-126, 1997.

VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G.; SIMPSON, R. J.; RUBIRA, M. R. CAYPHAS, S.; VINK, A.; BILLIAU, A.; VAN SNICK, J. Identification of human 26-KD protein; interferon  $\beta_2$  (INF- $\beta_2$ ), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, p. 914-919, 1987.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol**, v. 231, p. 232-235, 1971.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

- VANE, J.R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 102, p. 9-21, 1996.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 327-363, 2001.
- VASKO, M.R. Prostaglandin induced neuropeptide release from spinal cord. **Progress in Brain Research**, v. 104, p. 367-380, 1995.
- VLASKOVSKA, M.; SURCHEVA, S.; OVCHAROV, R. Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metamizole) and verapamil. **Farmakologiya i Toksikologiya**, v. 52, p. 25-29, 1989.
- VOOGD, J.; NIEUWENHUYIS, R.; VAN DONGEN, P. A. M.; TEN DONKELAAR, H. J. Mammals. In: NIEUWENHUYIS, R.; TEN DONKELAAR, H. J.; NICHOLSON, C. **The central nervous system of vertebrates**, v. 3, Springer, Berlin, 1998, p. 1637-2098.
- 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.
- XIE, Q.; KASHIWARBARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4705-4708, 1994.
- XU, X. J.; HAO, J. X.; ANDELL-JONSSON, S.; POLI, V.; BARTFAI, T.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. **Cytokine**, v. 9, p. 1028-1033, 1997.
- WAGNER, R.; JANJIGIAN, M.; MYERS, R. R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment and endoneurial TNF- $\alpha$  expression. **Pain**, v.74, p. 35-42, 1998.
- WALLACE, J. L. Distribution and expression of cyclooxygenase isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **American Journal of Medicine**, v. 107, n. 6, p. 11S-17S, 1999.
- WALKER, K. PERKINS, M. DRAY, A. Kinins and kinin receptor in the nervous system. **Neurochemical International**, v. 26, p. 1-16, 1995.
- WANG, H.; LIU, R. I.; 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, C. Y.; WANG, Y. W.; ZHAO, Z. Q. Peripheral NMDA and non-NMDA receptors contribute to nociception: An electrophysiological study. **Brain Research Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 31-34, 2000.

- WARKINS, L. R.; MAIER, S. F. Cytokines and pain. Basel : **Birkhäuser**, 1999.
- WATKINS, L. R.; WIERTELAK, E. P.; OOEHLE, L. E.; SMITH, K. P.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**, v. 654, p. 15-26, 1994.
- WATKINS, L. R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor- $\alpha$  hyperalgesia. **Brain Research**, v. 692, p. 244-250, 1995.
- WATKINS, L. R.; MARTIN, D.; ULRICH, P.; TRACEY, K.J. ; MAIER, S. F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 71, p. 225-235, 1997.
- WEAVER, D. L. Normal inflammatory response to injury. In: **Inflammation I**, Singapore, ed. Thornborough, 1995. p. 13-68.
- WEBB, M.L., MEEK, T.D. Inhibitors of endothelin. **Medicinal Research Reviews**, v. 17, n. 1, p. 17-67, 1997.
- WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardisation of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 35-44, 1991.
- WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 236, p. 193-199, 1993.
- WILLINGALE, H. L. ; GARDINER, N. J.; McLYMONT, N. ; GIBLETT, S.; GRUBB, B. D. Prostanoids synthesized by cyclooxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 1593-1604, 1997.
- WILLIS, W. D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 308, p.253-268, 1985.
- WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain: prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**, v. 47, n. 5, p. 1-9, 1994.
- WOOLF, C.J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines , nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia : the contribution of tumor necrosis factor - $\alpha$ . **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 417-424, 1997.
- WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal Plasticity: increasing the gain in pain. **Neuroscience**, v. 288, 2000.
- WOTHERSPOON, G.; WINTER, J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in rat sensory nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 294, p. 175-178, 2000.

WUITS, A.; PROOST, P.; LENAERTS, J. P.; BEM-BARUCH, A.; VAN DAMME, J.; WANG, J. M. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8 , granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. **European Journal of Biochemistry**, v. 225, p. 63-67, 1998.

YAMAMOTO, T.; TAGUSHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Research**, v. 739, p. 104-110, 1996.

YAMAMURA, H.; NABE, T.; KOHNO, S.; OHATA, K. Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritonela mast cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 265, p. 9-15, 1994.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 322, p. 411-415, 1988.

YOSHIDA, S.; YASUDA, K.; DOSTROVSKY, J. o.; BAE, Y. C.; TAKEMURA, M.; SHIGENAGA, Y.; SESSLE, B. J. Two major types of premotoneurons in the feline trigeminal nucleus oralis as demonstrated by intracellular staining with horseradish peroxidase. **Journal of Comparative Neurology**, v. 347, p. 495-514, 1994.

YOSHIDA, S.; OKA, H. Membrane properties of dissociated trigeminal mesencephalic neurons of the adult rat. **Neuroscience Research**, v. 30, p. 227-234, 1998.

YOSHIDA, T.; HORIUCHI, T.; SAKAMOTO, H.; INOUE, H.; TAKAYANAGI, H.; NISHIKAWA, T.; YAMAMOTO, S.; KOSHIHARA, Y. Production of parathyroid hormone-related peptide by synovial fibroblasts in human osteoarthritis. **FEBS Letters**, V. 433, N. 3, P. 331-334, 1998.

YOUNG, R.F.; OLESON, T.D.; PERRYMAN, K.M. Effect of trigeminal tractotomy on behavioral response to dental pulp stimulation in the monkey. **Journal of Neurosurgery**, v. 55, p. 420-430, 1981.

ZHONG, J.; DIETZEL, I. D.; WHALE, P.; KOPF, M.; HEUMMANN, R. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 4305-4313, 1999.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behavior in rats. **Neuroreport**, v. 7, p. 895-900, 1996.