

GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA

**DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA 1 β , SUBSTÂNCIA P E
FATORES NEUOTRÓFICOS EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA DO
NERVO TRIGÊMEO.**

**Belo Horizonte
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG**

FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA 1 β , SUBSTÂNCIA P E
FATORES NEUOTRÓFICOS EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA DO
NERVO TRIGÊMEO.**

**Belo Horizonte
2015**

GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA

**DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA 1 β , SUBSTÂNCIA P E
FATORES NEUROTÓFICOS EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA DO
NERVO TRIGÊMEO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Experimental

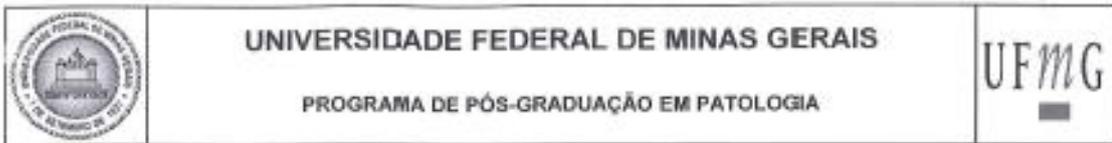
Orientador: Profa. Dra. Camila Megale de Almeida Leite

**Belo Horizonte
2015**

Costa, Grazielle Mara Ferreira.
C837d Desmielinização e expressão de interleucina 1 β , substância P e fatores neutróficos em modelo de dor neuropática do nervo trigêmeo [manuscrito]. / Grazielle Mara Ferreira Costa. - - Belo Horizonte: 2015.
91f.: il.
Orientador: Camila Megale de Almeida Leite.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neuralgia do Trigêmeo. 2. Nervo Trigêmeo. 3. Neuropeptídeos. 4. Fatores Neurotróficos Derivados de Linhagem de Célula Glial. 5. Interleucina -1beta. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Leite, Camila Megale de Almeida. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WL 330



FOLHA DE APROVAÇÃO

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS, DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA CITOCINA INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β), DO NEUROPEPTÍDEO SUBSTÂNCIA P (SP) E DOS FATORES NEUROTRÓFICOS FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF) E FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DA GLIA (GDNF) AO LONGO DO TEMPO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA DO NERVO TRIGÊMEO.

GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



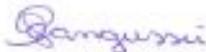
Prof(a). Camila Megale de Almeida Leite - Orientador

UFMG



Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid

UFMG



Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu
UFOP

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015.

**“O professor se liga à eternidade;
ele nunca sabe onde cessa a sua influencia”**
Henry Adams

DEDICATÓRIA

Ao que eu tenho de mais puro e verdadeiro,
o amor à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que me tem dado;

A toda minha família, a minha mãe Elenice e aos meus irmãos Juliane, Wendell e Luara. Obrigada pelo apoio incondicional, paciência e pelo amor que me dedicam sempre;

A minha orientadora Professora Camila, um grande exemplo profissional, por ter acreditado no meu trabalho, pelo total apoio, incentivo, disponibilidade e incentivo. Obrigada pela oportunidade de fazer parte da sua equipe!

Aos colegas e professoras do laboratório Prof^a Conceição Machado, Erika, Rose, Reinaldo, Patricia, Renan, Bruna, Sara, Mateus. Obrigada pela amizade, auxílio e pelos momentos de distração no laboratório;

Aos colegas e professoras do NIPE, Chris, Bell, Joana, Bruna, Maria e Professora Rosa. Obrigada pela amizade, auxílio e por tornarem meus dias de trabalho tão agradáveis;

A equipe da professora Camila, Bruna, Jessica, Ana Luisa, Debora e Roberta. Obrigada pela ajuda e amizade;

Ao técnico Carlos, pela presteza em ajudar-me sempre que precisei;

Ao CNPq pela bolsa de estudos, à FAPEMIG e à PRPq/UFMG pelo apoio financeiro;

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

Minha sincera gratidão!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Dor.....	15
1.2 Neuralgia trigeminal.....	16
1.3 Diagnóstico e tratamento.....	18
1.4 Neuralgia trigeminal e modelos experimentais.....	19
1.5 Etiologia e Fisiopatologia.....	19
2 - JUSTIFICATIVA.....	23
3 - OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Animais.....	25
4.2 Cirurgia - Injúria crônica por constrição (CCI) do nervo infra-orbitário.....	25
4.3 Avaliação comportamental espontânea.....	25
4.4 Avaliação comportamental evocada.....	26
4.5 Eutanásia e obtenção dos tecidos.....	28
4.6 Processamento dos tecidos para microscopia.....	29
4.6.1 Microscopia óptica.....	29
4.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	29
4.7 Colorações para análise morfológica à microscopia óptica.....	30
4.7.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).....	30
4.7.2 Coloração Luxol Fast Blue.....	30
4.7.3 Caracterização imuno-histoquímica.....	31
4.8 Análise morfológica e morfométrica.....	32
4.8.1 Microscopia óptica.....	32
4.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	33
4.9 Dosagem de fatores neurotróficos.....	34
4.10 Análise estatística.....	36

4.11 Delineamento experimental	37
5 - RESULTADOS.....	38
5.1 Avaliação comportamental espontânea	38
5.2 Avaliação comportamental evocada	39
5.3 Análise morfológica à microscopia óptica	41
5.4 Análise morfométrica da celularidade	44
5.5 Análise qualitativa das fibras mielínicas e amielínicas	46
5.6 Análise quantitativa da desmielinização	50
5.7 Análise quantitativa de fibras amielínicas	52
5.8 Expressão da citocina IL-1 β e do neuropeptídeo SP	54
5.9 Dosagem do fator de crescimento nervoso (NGF)	58
5.10 Dosagem do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).....	59
6 - DISCUSSÃO.....	61
7 - CONCLUSÕES	71
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	72
9 - ANEXOS	82
Anexo 1 - Certificado do CETEA	82
Anexo 2 - Declaração de aprovação	84
Anexo 3 - Ata da defesa	86
Anexo 4 - Comprovante de submissão do Artigo	88
Anexo 5 – Artigo submetido.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Áreas de inervação e os ramos do nervo trigêmeo (Fried <i>et al.</i> , 2001).	Pág. 17
FIGURA 2: Cirurgia em torno do nervo infra-orbitário (A). Tipos de <i>grooming</i> facial (B) adaptado de Imamura <i>et al.</i> , 1997 (A) e Vos <i>et al.</i> , 1994 (B).	27
FIGURA 3: Subdivisão do nervo trigêmeo em porções distal e proximal.	29
FIGURA 4: Delineamento experimental.	37
FIGURA 5: Avaliação comportamental evocada por filamentos de von Frey.	40
FIGURA 6: Análise histopatológica da porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham.	42
FIGURA 7: Análise histopatológica da porção proximal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham.	43
FIGURA 8: Semiquantificação das lesões do nervo trigêmeo em animais efetivos e sham ao longo do tempo.	44
FIGURA 9: Avaliação morfométrica do número de células por área de fascículo nervoso ao longo do tempo nas porções distal e proximal em nervos de animais efetivos e sham.	45
FIGURA 10: Imunopositividade para GFAP e S100 em animais efetivos e sham.	46
FIGURA 11: Desmielinização na porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham. Coloração Luxol Fast Blue.	47
FIGURA 12: Desmielinização na porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham. Coloração Azul de Toluidina.	48

- FIGURA 13:** Microscopia eletrônica de transmissão do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham. 49
- FIGURA 14:** Avaliação morfométrica da desmielinização ao longo do tempo nas porções distal e proximal em nervos de animais efetivos e sham. 51
- FIGURA 15:** Avaliação morfométrica da desmielinização / remielinização nas porções distal e proximal de nervos de animais efetivos e sham. 52
- FIGURA 16:** Avaliação morfométrica das fibras amielínicas nas porções distal e proximal dos nervos de animais efetivos e sham. 53
- FIGURA 17:** Imunopositividade para IL-1 β nas porções distal e proximal de nervos trigêmeo de animais efetivos e sham. 55
- FIGURA 18:** Avaliação morfométrica da imunopositividade para IL-1 β nas porções distal e proximal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham ao longo do tempo. 56
- FIGURA 19:** Imunopositividade para SP nas porções distal e proximal de nervos trigêmeo de animais efetivos e sham. 57
- FIGURA 20:** Avaliação morfométrica da imunopositividade para SP nas porções distal e proximal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham ao longo do tempo. 58
- FIGURA 21:** Dosagem de NGF no soro e nas porções distal e proximal de nervos trigêmeo em animais sham e efetivos. 59
- FIGURA 22:** Dosagem de GDNF no soro e nas porções distal e proximal de nervos trigêmeo em animais sham e efetivos. 60

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Escore de resposta à estimulação mecânica por filamentos de Von Frey, adaptado de Vos <i>et al.</i> , 1994.	27
TABELA 2: Caracterização dos anticorpos primários, secundários e conjugados utilizados nas imuno-histoquímicas.	32
TABELA 3: Avaliação comportamental espontânea: <i>Groomings</i> faciais.	38
TABELA 4: Avaliação comportamental espontânea: Outros comportamentos.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CCI – Injúria crônica por constrição

CEBIO – Centro de Bioterismo do ICB / UFMG

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG

CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

d.p.o – Dias pós operatório

DN – Dor neuropática

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático).

GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia

GFAP – Proteína ácida fibililar da glia

IASP – *International Association for the Study of Pain* - Associação Internacional para o Estudo da Dor

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICH D-II - Classificação Internacional de Cefaleias

IHS – *International Headache Society* - Associação Internacional de Cefaleias

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Enzima óxido nítrico-sintase induzida

NGF – Fator de crescimento nervoso

NO – Óxido nítrico

NT – Neuralgia trigeminal

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

SP – Substância P

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

A neuralgia do trigêmeo (NT) é uma dor neuropática comum, com episódios de dor intensa em pequenas áreas da face. A injúria crônica por constrição (CCI) do nervo infra-orbitário é utilizada como modelo experimental da NT. O desenvolvimento da dor ocorre em consequência de alterações estruturais nervosas e da produção de mediadores inflamatórios e de fatores neurotróficos. Sendo assim, investigamos as alterações histopatológicas e ultraestruturais e a expressão do neuropeptídeo SP, da citocina IL-1 β , do fator de crescimento nervoso (NGF) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) no nervo trigêmeo e gânglio trigeminal ao longo do tempo com o intuito de correlacionar a cinética das alterações ao desenvolvimento da dor. Ratos Wistar foram submetidos à CCI (grupo efetivo) e animais submetidos apenas à cirurgia serviram como controle (grupo sham). O comportamento espontâneo e evocado por estímulo mecânico foi registrado aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós-operatório (d.p.o.), quando tecidos e soro foram coletados para análise morfológica à microscopia óptica e eletrônica, imuno-histoquímica e dosagem de NGF e GDNF por ELISA. Inicialmente, ratos efetivos apresentaram hiporresponsividade à estimulação mecânica e, posteriormente, houve aumento significativo da resposta, sugerindo desenvolvimento de alodínia mecânica. Lesões nervosas com comprometimento estrutural importante, desmielinização significativa e aumento da celularidade por proliferação de células da glia foram observadas ao longo do tempo em animais efetivos. Aos 6 dias de pós operatório (d.p.o.), as lesões axonais e a desmielinização foram mais intensas e, aos 15 d.p.o., a remielinização parcial foi observada. A imunoexpressão de IL-1 β foi evidente nos fascículos nervosos e no gânglio trigeminal de animais efetivos em ambas as semanas pós operatórias. O neuropeptídeo SP apresentou imunoexpressão mais significativa apenas nas regiões distais do nervo infra-orbitário de animais efetivos. Não foi detectada diferença nos níveis de NGF no soro ou nos tecidos de animais efetivos em relação aos sham em nenhum dos tempos estudados. Níveis séricos mais elevados de GDNF foram encontrados em animais sham aos 6 d.p.o., porém não foi observada diferença nos níveis teciduais desse mediador. Em conjunto, nossos resultados demonstram papel importante dos processos de desmielinização e remielinização, dos mediadores IL-1 β e SP e da disfunção na produção de GDNF no desenvolvimento da dor ao longo do tempo, contribuindo para o entendimento dos fenômenos teciduais que levam ao estabelecimento e à manutenção da dor neuropática do nervo trigêmeo. **Palavras-chaves:** dor neuropática, nervo trigêmeo, neuralgia do trigêmeo, neuropeptídeo, fator neurotrófico, desmielinização, neuroinflamação.

ABSTRACT

Trigeminal neuralgia (TN) is a common neuropathic pain and is characterized by episodes of severe pain in small areas of the face. Chronic constriction injury (CCI) of the infraorbital nerve (IoN) is used as an experimental model of TN. The development of neuropathic pain occurs as a result of structural changes in injured nerve and production of inflammatory mediators and neurotrophic factors. Thus, we investigated pathological and ultrastructural alterations, demyelination and expression of neuropeptide SP, cytokine IL-1 β , nerve growth factor (NGF) and the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) in trigeminal ganglion and nerve over time in CCI-IoN model in order to correlate kinetics of changes in the development of pain. Rats were submitted to CCI-IoN (IoN group) or sham surgery (SHM group). Spontaneous and evoked behavior was evaluated and recorded at 3, 6, 9, 12 and 15 days postoperatively (p.o.). At these times, tissues and serum were collected for morphological analysis by optical and electron microscopy, immunohistochemistry and protein levels of NGF and GDNF by ELISA. Initially, IoN rats showed hyporesponsiveness to mechanical stimulation and, subsequently, there was a significant increase in the response, suggesting development of mechanical allodynia. Nerve lesions with significant structural impairment, intense demyelination and glial cell proliferation was observed over time in IoN group. At day 6 days p.o., axonal damage and demyelination were more intense and at day 15 p.o., partial remyelination was observed. IL-1 β immunostaining was evident in nerve fascicles and in the trigeminal ganglion of IoN animals in both weeks p.o.. Neuropeptide SP showed greater immunoreactivity only in the distal regions of IoN rats animals. There was no difference in NGF levels in serum or tissues between groups in any of the studied times. Higher seric levels of GDNF were found in SHM animals at day 6 p.o., but no difference in tissue levels of this mediator was observed in any time studied. Taken together, our results demonstrate the important role of demyelination and remyelination processes, expression of IL-1 β and SP and dysfunction in GDNF production of in the development of pain over time which contributes to the understanding of mechanisms that lead to trigeminal neuropathic pain. **Keywords:** neuropathic pain, trigeminal nerve, trigeminal neuralgia, neuropeptide, neurotrophic factor, demyelination, neuroinflammation.

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 - DOR

A dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões” (IASP, 2011). A dor pode funcionar como um eficiente sistema de alerta contra possíveis danos teciduais ou elementos potencialmente prejudiciais ao organismo, possuindo, portanto, um importante papel protetor (MCNALLY, 1999). Entretanto, existem situações em que a dor se torna frequente e intensa, mesmo na ausência de estímulos prejudiciais, causando graves implicações ao indivíduo e a sociedade (MACFARLANE, *et al.*, 1997).

A dor é a maior causa de procura por atendimento médico (FONTES e JAQUES, 2008), podendo gerar inúmeros prejuízos sociais, psíquicos e econômicos ao indivíduo. Atualmente, a dor apresenta-se como um problema de saúde pública (RIBEIRO *et al.* 2011). A prevalência de dor na população em geral foi estimada entre 11,5% a 55,2%, embora a *International Association for the Study of Pain* (IASP) considere a prevalência média de 35,5%, sendo que este dado tende a crescer em função do aumento da expectativa de vida dos pacientes (HARSTALL e OSPINA, 2003).

A percepção da dor é resultante de um conjunto de fatores de diversas grandezas, como a extensão da lesão tecidual e os aspectos emocionais, sociais, culturais e ambientais do paciente (MERSKEY e BOGDUK, 1994). O limiar de dor varia de indivíduo para indivíduo e, um estímulo capaz de gerar dor em uma pessoa pode não ser suficiente para provocar dor em outra. Desse modo, a dor se configura como uma situação de difícil diagnóstico, tratamento e controle (SMITH *et al.* 2001).

Segundo a IASP a dor pode ser classificada quanto a sua duração em aguda ou crônica. A primeira manifesta-se durante um período curto de minutos a algumas semanas, está associada a lesões em tecidos ou órgãos ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. A segunda, por sua vez, tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos, e está quase sempre associada a um processo de doença crônica ou consequência de uma

lesão já previamente tratada, e que se repetem com frequência, mesmo sem estar associada a um processo específico (WOOLF, 2000; IASP, 2011).

A dor ainda pode ser classificada em dor nociceptiva ou neuropática, sendo que a primeira ocorre a partir da ativação de nociceptores periféricos e está relacionada à estímulos potencialmente prejudiciais ao indivíduo (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Já a dor neuropática (DN) é conceituada como a sensação dolorosa iniciada ou causada por lesões primárias ou por disfunções no sistema nervoso central (SNC) ou no sistema nervoso periférico (SNP) (IASP, 2011).

As dores neuropáticas apresentam-se como dores crônicas graves e persistentes, acarretam reduzida qualidade de vida dos pacientes que as manifestam (FRIED *et al.*, 2001) e ocasionam altos custos para os sistemas de saúde (MCDERMOTT *et al.*, 2006). Aproximadamente 8% da população em geral apresenta DN (BOUHASSIRA *et al.*, 2005). Grande parte dos levantamentos epidemiológicos foi realizada em países desenvolvidos e os dados a respeito da população brasileira não são vastamente conhecidos, estima-se que a nossa prevalência seja semelhante aos dos países desenvolvidos (ALMEIDA, 2008).

A DN é de etiopatologia complexa e envolve diversos mecanismos biológicos ainda não totalmente esclarecidos (KRAYCHETE *et al.*, 2008). Em função disso, o estudo da mesma e a abordagem do paciente são desafiadores para pesquisadores e clínicos. Os sintomas mais característicos das DN são a presença de dor espontânea, que surge sem um estímulo desencadeador, e a alodínia, que é a sensibilidade dolorosa mediada por estímulo não doloroso (TREEDE *et al.*, 2008). Uma das dores neuropáticas mais comumente observadas na região de cabeça e pescoço é a neuralgia do trigêmeo, uma doença altamente debilitante, com elevada incidência e prevalência e cujos mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (KATUSIC *et al.*, 1991; ESKANDAR, BARKER e RABINOV, 2006; MANZONI e TORELLI, 2005).

1.2 - NEURALGIA TRIGEMINAL

O nervo trigêmeo é um nervo misto com fibras aferentes (sensitivas) e eferentes (motoras) e é responsável pela sensibilidade geral (tato, pressão, dor e temperatura) da cabeça (**FIGURA 1**). Possui três ramos principais: o oftálmico, o maxilar e o mandibular, sendo que os ramos

oftálmico e maxilar são sensitivos e o mandibular possui um componente motor que atua na mastigação (FRIED *et al.*, 2001).

A neuralgia do trigêmeo (NT) manifesta-se como crises de choque ou queimação em intervalos não definidos, geralmente desencadeadas por estímulos não dolorosos na região da face (KATUSIC *et al.* 1991). As crises de dor características da NT são extremamente desconfortantes, uma vez que podem ser desencadeadas por atividades rotineiras como falar ou mastigar (FRIED *et al.*, 2001).

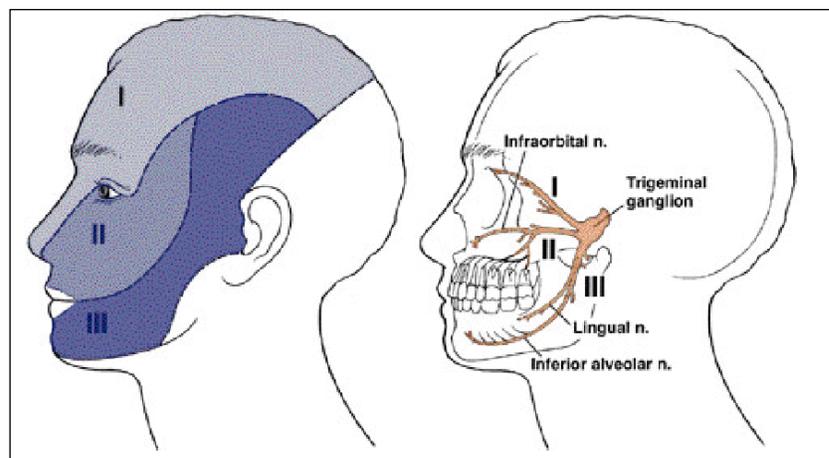


FIGURA 1: Nervo trigêmeo e suas respectivas áreas de inervação. **Fonte:** Fried *et al.* 2001.

A NT apresenta uma incidência de 4,3 casos para cada 100 mil habitantes (IBRAHIM, 2012), sendo geralmente unilateral, ou seja, acometendo apenas um lado da face. Sua frequência de acometimento entre os ramos do trigêmeo é de 35% no nervo maxilar, 30% no nervo mandibular, 4% no nervo oftálmico, 20% nos nervos maxilar e mandibular, 10% nos nervos oftálmico e maxilar e 1% nos três nervos (BENNETTO, 2007; KRAFFT, 2008).

Dados recentes mostram que 55% a 70% dos pacientes com NT são do sexo feminino, com idade entre 19 e 82 anos, com maior incidência entre 60 e 70 anos de idade (IBRAHIM, 2012). A NT familiar é uma condição extremamente rara, com poucos relatos na literatura e constitui menos de 1% de todos os casos de NT (EBNER *et al.*, 2010). Os surtos se tornam progressivamente mais frequentes e intensos ao longo do tempo nos pacientes com NT (LOVE e COAKHAM, 2001).

1.3 – DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da NT é essencialmente clínico, baseado no histórico do paciente e nos critérios diagnósticos da *International Headache Society* (IHS) e da IASP (IASP, 2011; IHS, 2004). Os ataques de dor são paroxísticos, ou seja, de início súbito, com duração de frações de segundos até dois minutos em um ou mais territórios de inervação do nervo trigêmeo e, obrigatoriamente, se enquadram nos seguintes critérios: 1 – dor intensa, aguda, superficial, semelhante a um choque elétrico ou queimação; 2 - início espontâneo na zona gatilho ou desencadeada por estímulos inócuos na zona gatilho.

As condutas terapêuticas aplicadas na NT se dividem em duas modalidades, a medicamentosa e a cirúrgica, de acordo com o caso (MATTOS *et al.*, 2005). Para o tratamento farmacológico, os anticonvulsivantes, como carbamazepina, gabapentina e oxycarbamazepina, são os medicamentos mais prescritos (GRONSETH *et al.*, 2008). Esses medicamentos bloqueiam a propagação do impulso nervoso através de alterações na condutância da fibra nervosa pelo bloqueio de canais iônicos, permitindo controle da excitabilidade neuronal e da atividade sináptica (CHESHIRE, 2007). A carbamazepina tem taxa de sucesso em até 70% dos casos e tem sido o mais prescrito (FRIZZO, HASSE e VERONESE, 2004). Antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação da serotonina também têm alcançado resultados satisfatórios na melhoria do quadro doloroso (MATTOS *et al.*, 2005).

O tratamento cirúrgico é indicado quando há detecção de compressão vascular ou quando os fármacos não apresentam bons resultados (FRIZZO, HASSE e VERONESE, 2004). Dentre as técnicas cirúrgicas utilizadas está a microdescompressão vascular, que consiste no afastamento e isolamento cirúrgico do vaso das proximidades do nervo. A alcoolização de ramos periféricos também é uma alternativa viável em casos refratários e consiste na injeção de álcool nos ramos periféricos do nervo trigêmeo. Nas últimas décadas, alguns outros procedimentos têm sido vastamente utilizados, como a eletrocoagulação percutânea e a termocoagulação por radiofrequência. Ambas provocam lesão ao nível do gânglio trigeminal, impedindo a passagem dos estímulos nociceptivos, porém, tais técnicas estão relacionadas com déficit sensitivo, sendo indicadas com prudência (FRIZZO, HASSE e VERONESE, 2004).

1.4 - NEURALGIA TRIGEMINAL E MODELOS EXPERIMENTAIS

Em função da dificuldade em se estudar as alterações anatomopatológicas em tecidos humanos, diversos estudos têm utilizado modelos experimentais em ratos, já bem estabelecidos na literatura para estudar aspectos morfológicos das dores neuropáticas. Um dos modelos mais difundido é o da injúria crônica por constrição (CCI), que consiste na exposição cirúrgica do nervo com colocação de duas ligaduras em torno do mesmo. Essa técnica mostra-se eficaz em gerar alterações comportamentais indicativas de distúrbios sensoriais graves, como alodínia e dor espontânea, sintomas classicamente relacionados à DN (BENNET e XIE *et al.*, 1988; VOS *et al.*, 1994). Para estudo da DN trigeminal, o nervo infra-orbitário, ramo mais extenso do nervo maxilar do nervo trigêmeo, é utilizado e as incisões são feitas dentro da cavidade oral, próximas ao primeiro molar superior direito (VOS *et al.*, 1994; IMAMURA e KAWAMOTO, 1997).

1.5 – ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Como já mencionado, a etiologia específica da DN não está bem estabelecida e diversos fatores e mecanismos fisiopatológicos contribuem para o seu estabelecimento e modulação, tanto no SNC quanto no SNP (MOALEM e TRACEY, 2006). A lesão nervosa leva a alterações celulares e moleculares específicas que, por sua vez, geram desenvolvimento de hiperexcitabilidade e respostas exacerbadas (RO e CHANG, 2005). A amplificação central e periférica é mediada pela expressão alterada de receptores e de genes relacionados à ativação de potencial elétrico, canais iônicos e neurotransmissores, aumento da excitabilidade neuronal, geração ectópica de potenciais de ação, interferências de terminações nervosas simpáticas, morte neuronal, facilitação da transmissão sináptica e alterações na organização dos circuitos neuronais nociceptivos centrais (MOALEM e TRACEY, 2006; AUSTIN e MOALEY-TAYLOR, 2010).

A sensibilização central consiste em ativação patológica e exacerbada de resposta em neurônios nociceptivos centrais por modificações nos controles modulatórios da transmissão de mensagens nociceptivas, reorganização anatômica (neuroplasticidade) e alterações nas propriedades eletrofisiológicas (MOALEM e TRACEY, 2006).

A sensibilização periférica envolve a diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores intactos ou lesados por ação de produtos de reações inflamatórias e imunológicas e resulta em

amplificação de respostas a estímulos inócuos ou lesivos (JULIUS e BASBAUM, 2001). Diversos estudos têm demonstrado que interações entre neurônios, células e mediadores inflamatórios, células da glia, e neurotrofinas estão relacionados à sensibilização periférica nas DN (LASKIN e PENDINO, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001; AYDINLI e KESKINBORA, 2004; MOALEM e TRACEY, 2006). Estudos têm evidenciado a importância das células da glia na DN em função de sua capacidade de se comunicar com os neurônios e de modular a sua atividade. Foi demonstrado que o aumento de junções gliais após a lesão nervosa está relacionado ao comportamento nociceptivo e estudos demonstraram que a inibição da ativação da glia atenuou o desenvolvimento de hipersensibilidade comportamental em modelo de dor neuropática em ratos, revelando, assim, as múltiplas funções desempenhadas pelas células da glia (MCMAHON e MALCANGIO, 2009; HANANI 2010; VIT *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2008; RAGHAVENDRA *et al.*, 2003). Além disso, a lesão nervosa pode levar fibras de neurônios sensitivos primários a iniciar a geração de impulsos aberrantes de locais ectópicos (anormais), o que pode resultar em sensações dolorosas persistentes e espontâneas (FRIED *et al.*, 2001).

O processo de desmielinização consiste na degeneração das bainha de mielina que envolve os axônios e a remielinização envolve a reconstrução das bainhas perdidas (BUNGE *et al.*, 1961). Quando ocorre a perda da mielina, a célula de Schwann se divide e inicia os fenômenos de remielinização, que pode ocorrer de forma errônea e promover a aposição de axônios com geração de alodínia, excitação cruzada e disparos espontâneos (MURRAY, 2005). Em alguns poucos estudos de biópsias de nervos de pacientes com NT (HILTON *et al.*, 1994; LOVE e COAKHAM, 2001) e em estudos experimentais de DN do nervo isquiático em ratos (BASBAUM *et al.*, 1991; GABAY e TAL, 2004), a desmielinização foi um achado histopatológico importante, sendo associado a mecanismos periféricos de desenvolvimento da dor, como a transmissão efática ou excitação cruzada de fibras nervosas, envolvendo a transmissão de potenciais de ação de fibras sensitivas periféricas aferentes lesionadas e hiperexcitáveis para fibras sensitivas adjacentes não estimuladas ou lesionadas, levando a uma expansão da área em que a dor é percebida (SUZUKI e DICKENSON, 2000). A desmielinização focal, favorecida pela lesão nervosa e pelo processo inflamatório tecidual (LASKIN e PENDINO, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001), leva à aposição de axônios desmielinizados com ausência de processos de células da glia entre eles, gerando impulsos nervosos ectópicos ou espontâneos,

assim como a excitação cruzada de fibras nervosas (RAMINSKY, 1978; SMITH e MCDONALD, 1980; LOVE e COAKHAM, 2001).

Em modelos animais de DN, foi demonstrado que as alterações inflamatórias após a injúria nervosa levam à desgranulação de mastócitos e ao recrutamento de macrófagos e neutrófilos (PERRY *et al.*, 1987; DAEMEN *et al.*, 1998). Em particular, as citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β e interleucina 6 (IL-6) têm sido implicadas na sensibilização periférica e central (AUSTIN E MOALEM-TAYLOR, 2010; VALLEJO *et al.*, 2010; XU e YAKSH, 2011). Paralelamente às citocinas, o óxido nítrico (NO) gerado durante a lesão nervosa causa alterações nos vasos sanguíneos, nos axônios e nas bainhas de mielina e contribui para o desenvolvimento da DN (ZOCHODNE e LEVY, 2005; KIM *et al.*, 2011). No sistema trigeminal, no entanto, não se sabe qual a cinética e a participação desses mediadores inflamatórios no desenvolvimento da dor.

A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina pró-inflamatória potente crucial para as respostas de defesa frente à infecção ou lesão (DINARELLO, 1996). É liberada principalmente por macrófagos e monócitos e dentre as suas ações estão a capacidade de aumentar a produção da Substancia P (SP) no nervo (COPRAY *et al.*, 2001; ZHANG e AN, 2007), além de atuar no hipotálamo como pirógeno endógeno (ROTHERWELL, 1991), produzir inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, tendo importante envolvimento com a instalação e manutenção da dor (RAEBURN *et al.*, 2002; ZHANG e AN, 2007; WOLF *et al.*, 2008).

A SP, por sua vez, é um neuropeptídeo capaz de regular a inflamação neural e a resposta imune, estando implicada também na percepção da dor e apresenta altas concentrações no gânglio da raiz dorsal da medula espinhal (HARRISON e GEPETTI, 2001). Em estudo recente, usando um modelo de hiperalgesia induzida em camundongos, o bloqueio do receptor de SP foi capaz de aliviar a dor (ZHENG *et al.*, 2013). A lesão nervosa de alguns ramos do nervo trigêmeo acarretou alterações na expressão de neuropeptídeos como SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), polipeptídeo vasoativo intestinal e neuropeptídeo Y no nervo trigêmeo e gânglio trigeminal (WAKISAKA *et al.*, 1995; DE CORATO *et al.*, 2011). É possível, portanto, que o acúmulo de neuropeptídeos no local da lesão possa estar relacionado ao desenvolvimento de atividade neural ectópica e ao desenvolvimento e à modulação da DN (BIRD *et al.* 2002), apesar

de correlações bem definidas com o desenvolvimento da dor ao longo do tempo não terem sido completamente evidenciadas.

Paralelamente aos mediadores inflamatórios e neuropeptídeos, os fatores neurotróficos, como o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), estão associados ao desenvolvimento de neuropatias periféricas, ao desenvolvimento, à sobrevivência e à plasticidade neuronais em resposta a injúrias, além de estarem envolvidos no reparo de lesões nervosas (NAGANO *et al.*, 2003; OSSIPOV, 2011). Os fatores neurotróficos auxiliam no processo regenerativo do sistema nervoso periférico (BOYD e GORDON, 2003), sendo que o NGF atua na proliferação e diferenciação de neurônios (PETRUSKA e MENDELL, 2004), promovendo o reparo e a recuperação funcional de nervos lesionados (APFEL *et al.*, 1998), e o GDNF é considerado o fator mais protetor para neurônios motores, sendo fundamental na formação desses, assim como no processo de regeneração de neurônios sensitivos (SCHERER e SALZER, 2001). Além disso, a diminuição na produção de fatores neurotróficos, dentre eles o GDNF, foi associada ao desenvolvimento de neuropatias periféricas do nervo ciático (NAGANO *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2011). Várias desordens dolorosas estão associadas com a desregulação do NGF, incluindo a dor neuropática, dor osteoartrítica e a hiperalgesia (EIBL *et al.*, 2012). Em função disso, os fatores neurotróficos têm sido alvo de investigações científicas como potenciais agentes terapêuticos na degeneração nervosa periférica e na diminuição dos sintomas da dor neuropática (MARTIN *et al.*, 2011).

2 - JUSTIFICATIVA

As interações neuro-imunes envolvendo a lesão nervosa, as células da glia, os fatores neurotróficos, as células e os mediadores inflamatórios, a desmielinização e as consequentes alterações eletrofisiológicas formam complexas interações que levam ao desenvolvimento e à manutenção da DN (GUO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2012; LEE e ZHANG, 2012). Embora muitos estudos tenham contribuído para a elucidação dos diversos mecanismos, ainda não há definições claras quanto ao seu estabelecimento e desenvolvimento, sobretudo com relação ao nervo trigêmeo, uma vez que a grande maioria dos trabalhos aborda o nervo ciático. O nervo trigêmeo apresenta diversas diferenças estruturais e funcionais em relação ao nervo ciático e os mecanismos patofisiológicos decorrentes de lesão desses nervos são distintos, levando a diferenças entre DN cefálica e a DN extracefálica (LATRÉMOLIÈRE *et al.*, 2008; HAMON *et al.*, 2008).

Alguns estudos abordaram a correlação entre alterações morfológicas e a expressão de mediadores químicos em modelos animais de neuropatia trigeminal (ANDERSON e RAO, 2001; BENOLIEL *et al.*, 2001; VIT *et al.*, 2006), no entanto, não há correlações definidas entre a desmielinização, as alterações ultra-estruturais do nervo e dos neurônios trigeminais, os níveis de fatores neurotróficos e de mediadores inflamatórios no nervo trigêmeo e no gânglio trigeminal e o desenvolvimento da dor ao longo do tempo.

Uma vez que as alterações fisiológicas podem ocorrer como resposta às alterações estruturais das fibras nervosas e/ou a alterações na produção de fatores neurotróficos e mediadores inflamatórios, a elucidação da cinética da lesão estrutural e dos sistemas de sinalização neuro-inflamatórios pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos eletrofisiológicos e moleculares que fundamentam as alterações funcionais e comportamentais presentes, além de fornecer possibilidades para o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos. Pelo exposto, objetivamos estudar as alterações morfológicas e a expressão dos mediadores IL1 β , SP, NGF e GDNF no nervo trigêmeo e no gânglio trigeminal de ratos submetidos ao modelo de CCI do nervo infra-orbitário, associando-as ao desenvolvimento da dor neuropática trigeminal ao longo do tempo.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Investigar, no modelo de dor neuropática trigeminal por CCI do nervo infra-orbitário em ratos, as alterações histopatológicas, a desmielinização, a expressão da citocina IL-1 β , do neuropeptídeo SP e dos fatores neurotróficos NGF e GDNF no nervo trigêmeo e gânglio trigeminal ao longo do tempo.

3.2 - Objetivos específicos

- Detectar, à microscopia óptica, alterações qualitativas e quantitativas nos nervos trigêmeo e gânglios trigeminais, nas células da glia e na bainha de mielina do nervo trigêmeo de animais submetidos à CCI;
- Detectar, à microscopia eletrônica, alterações qualitativas e quantitativas nas fibras mielínicas e amielínicas do nervo trigêmeo de animais submetidos à CCI;
- Investigar alterações na expressão da citocina IL-1 β e do neuropeptídeo SP nos nervos trigêmeos e nos gânglios trigeminais submetidos à CCI;
- Detectar os níveis dos fatores neurotróficos NGF e GDNF no nervo trigêmeo e no gânglio trigeminal de animais submetidos à CCI;
- Associar a cinética dos achados ao desenvolvimento da dor neuropática trigeminal.

4 - MATERIAL E MÉTODO:

4.1 - Animais:

Os animais utilizados foram ratos Wistar adultos machos (total de 66 animais) fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Após o recebimento dos animais, os mesmos foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, onde permaneceram em gaiolas plásticas (41 x 31 x 16 cm – 4 animais por gaiola) no interior de estantes climatizadas (Alesco, Brasil) com controle de temperatura (21–23°C) e em ciclo claro/escuro de 12/12 h. Todos os ratos receberam ração Nuvilab (Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e água sem restrições. O manejo, o uso e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob o protocolo 231/2009 (**ANEXO 1**). Após atingirem o peso de 250 a 300g, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de injúria crônica por constrição (CCI) do nervo infra-orbitário do nervo trigêmeo.

4.2 – Cirurgia - Injúria crônica por constrição (CCI) do nervo infra-orbitário:

Os animais foram anestesiados com solução de ketamina a 5% (200 mg/kg) e xilazina a 2% (10 mg/kg) por via intramuscular e foram posicionados com a cavidade bucal aberta para realização da cirurgia. Conforme anteriormente descrito por Imamura *et al.* (1997), uma incisão de aproximadamente 1 cm foi feita na cavidade oral, a partir do primeiro molar superior direito em direção aos incisivos superiores (**Figura 2A**). Após o nervo infra-orbitário ser localizado e levemente separado dos tecidos adjacentes, foi realizada a colocação de duas ligaduras (fio “cat gut” cromado 4.0) ao redor do nervo (grupo efetivo). Animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico sem a colocação da ligadura no nervo foram utilizados como controle (grupo sham). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, durante todo o período de experimentação, que variou de 3 a 15 dias, até a eutanásia.

4.3 – Avaliação comportamental espontânea:

Conforme previamente descrito por Vos *et al.* (1994), o comportamento espontâneo dos ratos foi avaliado durante 7 minutos de permanência dos animais em gaiolas transparentes nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 dias pós-operatório (d.p.o.). O comportamento exploratório, períodos de imobilidade ou

descanso/sono e a frequência de *groomings*, vigorosos toques à região facial utilizando as patas dianteiras, foram analisados. O *grooming* ocorre como resposta a estímulos nociceptivos e, quando em número aumentado, sugere presença de dor espontânea. Os *groomings* podem ser caracterizados em pequeno, médio e grande, dependendo da região que o animal toca (**Figura 2B**), conforme descrito (VOS *et al.*, 1994).

4.4 – Avaliação comportamental evocada:

Para avaliação da alodínia (dor gerada por estímulo não doloroso), o território inervado pelo nervo infraorbitário foi estimulado por filamentos de von Frey (estesiômetro) com forças de dobramento crescentes de 0,05g, 0,2g, 2,0g, 4,0g e 10g. Para isso, os animais foram colocados sem contenção em gaiolas transparentes por 7 minutos para ambientação. Depois de decorrido esse tempo, os filamentos de von Frey foram aproximados da região da vibrissa e as respostas ao estímulo mecânico foram classificadas de 1 a 4, conforme escala previamente descrita (VOS *et al.*, 1994) (**Tabela 1**): (1) o animal vira a cabeça em direção ao estímulo, (2) o animal vira a cabeça bruscamente na direção oposta ao estímulo, (3) o animal se move para evitar contato posterior ou ataca o filamento e (4) adicionalmente ao movimento e ao ataque, o animal apresenta série de *groomings* faciais. Os animais foram testados e eutanasiados nos tempos 3, 6, 9, 12 e 15 d.p.o..

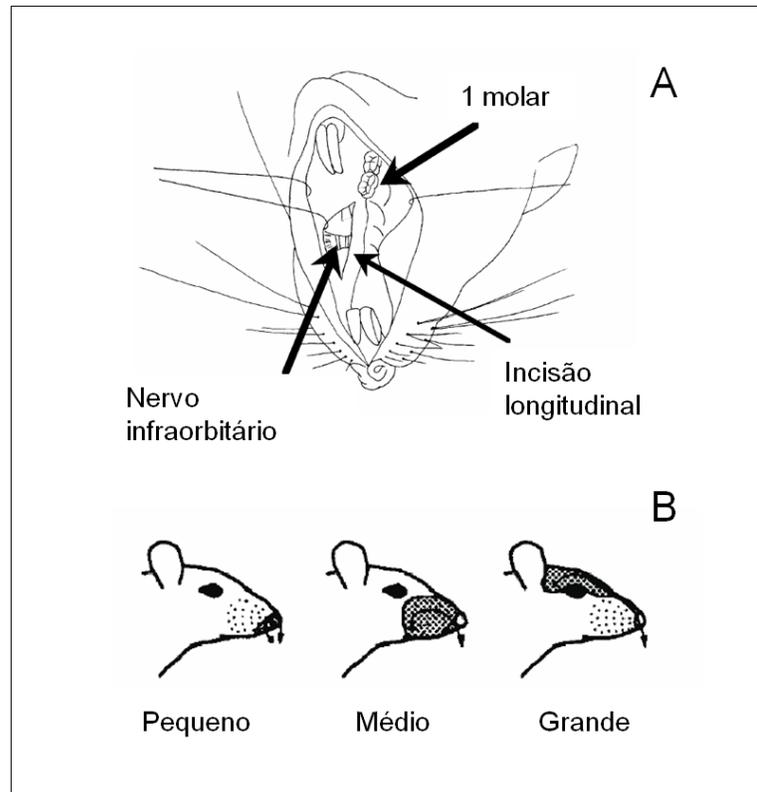


Figura 2: Cirurgia: incisão a partir do primeiro molar na cavidade bucal do animal para colocação das ligaduras em torno do nervo infra-orbitário (A). Tipos de *grooming* facial (pequeno, médio e grande) de acordo com a região tocada pelo animal (B). Adaptado de Imamura *et al.*, 1997 (A) e Vos *et al.*, 1994 (B).

Escore de resposta					
Categoria de Respostas	Elementos da resposta observada				
	Percepção	Retirada	Fuga/ataque	<i>grooming</i> facial	Pontuação
Sem resposta	0	0	0	0	0
Resposta não aversiva	1	0	0	0	1
Resposta aversiva leve	1	1	0	0	2
Resposta aversiva severa	1	1	1	0	3
Comportamento aversivo prolongado	1	1	1	1	4

Tabela 1: Escore de resposta à estimulação mecânica por filamentos de Von Frey, segundo VOS *et al.*, 1994. Adaptado de Vos *et al.*, 1994.

4.5 – Eutanásia e obtenção dos tecidos:

Em um grupo de animais, foi realizada a coleta de sangue e de nervo trigêmeo para microscopia óptica ou dosagem de fatores neurotróficos. Em outro grupo de animais, foi realizada perfusão para coleta de nervo trigêmeo para microscopia eletrônica:

- No primeiro grupo, após anestesia com solução de ketamina a 5% (200 mg/kg) e xilazina a 2% (10 mg/kg) por via intramuscular, foi realizado acesso à cavidade torácica para coleta de sangue venoso e posterior dosagem dos níveis séricos de fatores neurotróficos. Após permanecer por 30 minutos em temperatura ambiente, os tubos contendo o sangue foram transferidos para a geladeira (10°C) por 30 minutos e centrifugados em centrífuga refrigerada (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram aliquotados em tubos do tipo *eppendorf* e armazenados em freezer -70°C. Após a coleta de sangue, os animais foram decapitados e os nervos trigêmeos do lado direito onde foi aplicada a CCI foram dissecados e divididos em 2 porções: distal (da vibrissa até o forame infra-orbitário, local da lesão) e proximal (região onde o gânglio se encontra) (**FIGURA 3**). O material a ser destinado à microscopia óptica foi processado conforme descrito no item 4.6.1 e o material destinado às dosagens de fatores neurotróficos foram congelados em freezer -70° C.
- No segundo grupo de animais, cujo tecido se destinaria à microscopia eletrônica, foi realizada, após anestesia com solução de ketamina a 5% (200 mg/kg) e xilazina a 2% (10 mg/kg) por via intramuscular, a perfusão por via intracardíaca com solução salina 0,9% e em seguida, com solução fixadora de *Karnovsky* modificada (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a 7,4). Após perfusão, o nervo trigêmeo do lado direito onde foi aplicada a CCI foi dissecado e dividido em 2 porções: distal (da vibrissa até o forame infra-orbitário, local da lesão) e proximal (região onde o gânglio se encontra). Amostras de 2 mm de cada porção foram processados conforme descrito no item 4.6.2.

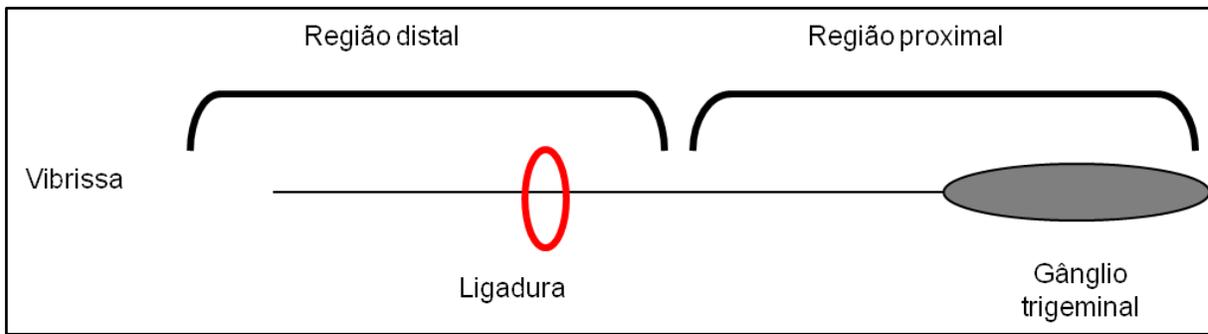


Figura 3: Subdivisão do nervo trigêmeo em porções distal e proximal.

4.6 – Processamento dos tecidos para microscopia:

4.6.1 – Microscopia óptica:

Logo após a dissecação, os segmentos do nervo trigêmeo foram fixados em solução de formaldeído a 10 %, desidratados em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo e cortes de 4 e 7 μm foram obtidos para colorações nos itens 4.7.1 e 4.7.2, e imunohistoquímica 4.7.3, respectivamente.

4.6.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão:

As porções de 2 mm do nervo dissecado foram imersas na solução fixadora de *Karnovsky* modificada por 24 horas e, após esse período, foram transferidas para o tampão cacodilato 0,1 M, com pH 7,2 a 7,4. Todas as amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG para serem processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Após lavagem do material em tampão fosfato, os fragmentos foram embebidos por 60 minutos em tetróxido de ósmio (OsO_4 2%), desidratado em série de alcoóis e acetona e incluídos em resina *epóxi Polibed 812*®. Os cortes semi-finos (0,5 a 1 μm) obtidos ao ultra-micrótomo foram corados por azul de toluidina a 1% e utilizados para análise qualitativa da desmielinização à microscopia óptica. Após o corte ser transferido para a lâmina de vidro e secar completamente na chapa quente a aproximadamente 58 °C, os cortes foram cobertos por uma gota grande do corante (azul de toluidina a 1% em solução de borato a 1%). As lâminas foram aquecidas na chapa até que a borda da gota começasse a secar, apresentando uma coloração metálica. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água e secas novamente na chapa quente. Após a secagem, as lâminas foram

montadas em meio Polymount (Polysciences) que impede o esmaecimento da coloração. A análise dos cortes semi-finos permitiu a seleção da região de interesse para obtenção das secções ultrafinas (50-70 nm), que foram colocados em telas de cobre e contracorados em acetato de uranila (2% em água destilada) e citrato de chumbo (1,33 g de nitrato de chumbo $Pb(NO_3)_2$; 1,76 g de citrato de sódio $Na_3(C_6H_5O_7).2H_2O$; 30 ml de água destilada isenta de CO_2). As telas contendo os cortes ultrafinos foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 Spirit.

4.7 – Colorações para análise morfológica à microscopia óptica:

4.7.1 – Coloração Hematoxilina e Eosina (HE):

Para a coloração HE, os cortes foram desparafinizados em sequencia decrescente de alcoóis (100%, 95%, 80% e 70%) por cinco minutos cada e lavados em água corrente por 2 minutos. Após, as lâminas foram coradas em hematoxilina de Harris por 20 segundos e lavadas em água corrente por 2 minutos. Em seguida, os cortes foram corados em eosina por 5 segundos e lavados rapidamente em água corrente, sendo em seguida desidratados em serie crescente de alcoóis (70%, 80%, 95% e 100%) por cinco imersões em cada. As lâminas foram, então, igualmente imersas por cinco vezes em sequencia de xilol (I, II e III) e montadas em meio de montagem comercial (Entellan, Merck).

4.7.2 – Coloração Luxol Fast Blue

Para evidenciação de mielina, foi utilizada a coloração de Luxol Fast Blue segundo protocolo previamente descrito (KLUVER e BARRERA, 1953). As lâminas foram desparafinizadas em sequencia decrescente de alcoóis (100%, 95%, 80% e 70%) por cinco minutos cada e coradas com solução Luxol Fast Blue (MBS - 0,1 g em etanol 95%) *overnight* em estufa a 56°C. O excesso de corante foi retirado com álcool 95% no dia seguinte e, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e diferenciadas em solução de carbonato de lítio a 0,05 % por 30 segundos. Esse protocolo de diferenciação foi repetido até que a mielina aparecesse ao microscópio óptico com tonalidade azul turquesa. Após, os cortes foram novamente lavados em água destilada e foram contracorados com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas rapidamente em álcool 95% e montadas em meio de montagem comercial (Entellan, Merck).

4.7.3 - Caracterização imuno-histoquímica:

Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica com os anticorpos primários detalhados na **TABELA 2** para verificar alterações na expressão *in situ* de SP e IL-1 β nas diferentes regiões dos nervos dos animais sham e efetivo ao longo do tempo. Também foram utilizados anticorpos marcadores de células da glia, como anti-GFAP (proteína ácida fibrilar da glia) e anti-S100.

Após desparafinização em xilol (I, II e III) por 20 minutos cada e hidratação em série de alcoóis de concentrações decrescentes (100, 90, 80, 70) por 5 minutos cada, foi realizada a recuperação antigênica em banho-maria a 100 °C utilizando-se solução *retrieval* (Dako - S1700). Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através de banho em solução de peróxido de hidrogênio a 3,5% em PBS por 30 minutos. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados em solução de soro albumina bovina (BSA) 2% em PBS por 30 minutos, em bloqueio em leite (12 g leite em pó / 200 ml de PBS) por 30 minutos e em incubação em soro normal de cabra, na diluição 1:20, em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário na diluição ótima (**TABELA 2**) em PBS por 18 horas, em câmara úmida, a 4 °C. No dia seguinte, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-coelho e anti-camundongo biotilado (Dako, LSAB, K0675) por 30 minutos, seguida pela incubação com o conjugado estreptavidina-peroxidase (Kit Dako, LSAB, K0675) por igual período à temperatura ambiente. A reação foi visualizada através da incubação em solução de 0,05% de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) com 0,03% de peróxido de hidrogênio por 5 minutos. As lâminas foram, então, contracoradas em hematoxilina de Harris (Reagen). Entre todas as etapas anteriormente descritas, foram realizados 3 banhos de 5 minutos em PBS, exceto entre o bloqueio dos sítios inespecíficos e a incubação com o anticorpo primário. Após a contracoloração, as lâminas foram desidratadas em série de alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100) por 10 minutos cada, diafanizadas em xilol I, II e III por 10 minutos cada e montadas em meio de montagem comercial (Entellan, Merck). Controles negativos foram realizados omitindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por PBS. Não foram utilizados controles positivos, uma vez que os anticorpos utilizados são usados de forma rotineira em nosso laboratório, já estando padronizados.

	Origem e Diluição	Código e Fabricante	Anticorpo Secundário e Conjugado
GFAP	Coelho 1:500	Z0334Dako	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinizada pré-diluída Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)
S100	Coelho 1:400	Z0311 Dako	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinizada pré-diluída Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)
SP	Coelho 1:100	AB1566 Millipore	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinizada pré-diluída Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)
IL-1β	Coelho 1:200	NBP1-19775 Novus Biologicals	Imunoglobulina anti-coelho e anti-camundongo biotinizada pré-diluída Estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit Dako, LSAB, K0675)

Tabela 2 – Caracterização dos anticorpos primários, secundários e conjugados utilizados nas imunohistoquímicas.

4.8 - Análise morfológica e morfométrica:

4.8.1 – Microscopia óptica:

As lâminas coradas por HE foram utilizadas para análise qualitativa e quantitativa de alterações histopatológicas, tais como infiltração de células inflamatórias, distúrbios circulatórios (hemorragia, edema), degenerações em células da glia e neurônios e tumefações axonais. A análise qualitativa foi categorizada como “inflamação” ou “lesão” e foi utilizado um escore de 0 a 3, sendo 0 ausente, 1 pouco, 2 moderado e 3 intenso, para cada categoria, conforme descrito a seguir. Para avaliação do infiltrado inflamatório, foram considerados a presença e o acúmulo de células inflamatórias no tecido conjuntivo subjacente aos fascículos nervosos ou em pequenas áreas do fascículo nervoso. Para a lesão, foram consideradas lesões axonais, como vacuolização e tumefações axonais, alteração da arquitetura tecidual do fascículo nervoso e alterações estruturais nos neurônios, como tamanho reduzido e dissociação dos corpúsculos de Nissl.

As lâminas coradas por Luxol Fast Blue e os cortes semi-finos corados por azul de toluidina foram analisadas quanto ao padrão e grau de mielinização, áreas de desmielinização focal e degeneração da mielina.

Para a análise quantitativa da celularidade ou da desmielinização dos fascículos nervosos, foram utilizados os cortes histológicos dos nervos dos animais sham ou efetivos aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias p.o. em lâminas coradas por HE ou Luxol Fast Blue, respectivamente. As imagens foram

visualizadas e digitalizadas utilizando-se a objetiva de 40 X do microscópio Olympus BX51 acoplado a microcâmara Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, EUA), através do programa Image-Pro Express 4.0. Cada lâmina continha, em média, 5 nervos e para cada um desses nervos, foram obtidas 15 imagens, abrangendo o maior número possível de fascículos nervosos, de forma que obteve-se aproximadamente 75 imagens por lâmina. Para análise da celularidade, as imagens obtidas foram submetidas à quantificação dos núcleos, utilizando-se o programa KS300, através da contagem manual dos núcleos. Para quantificação da mielina, a imagem foi binarizada e todas as estruturas morfológicamente identificadas como mielina pela coloração Luxol Fast Blue foram selecionadas, o que permitiu a medida computadorizada da área ocupada pelas mesmas. A área total de cada fascículo analisado foi obtida através da delimitação manual de seu contorno e, posteriormente, o número total de núcleos celulares ou a área de mielina por área de fascículo nervoso para cada porção do nervo foi calculado.

Segundo Mosconi e Kruger (1996), a razão axônio/mielina é um indicativo de processo de desmielinização / regeneração, já que axônios em remielinização podem apresentar bainha de mielina desproporcionalmente fina em relação à sua área. A quantificação desse processo foi realizada em cortes semifinos corados por azul de toluidina aos 6 e 15 d.p.o..

As lâminas submetidas à imuno-histoquímica foram analisadas quanto à imunopositividade em células dos fascículos nervosos e em neurônios nas diferentes porções dos nervos dos animais sham e efetivo em cada tempo estudado. As imagens foram digitalizadas utilizando-se a objetiva de 40 X do microscópio Olympus BX51 acoplado a microcâmara Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, EUA), através do programa Image-Pro Express 4.0. Cada lâmina continha, em média, 5 nervos e para cada um desses nervos, foram obtidas, no mínimo, 10 imagens. Através do programa ImageJ (versão 1.45s, NIH, EUA), foi realizada a contagem do número de células imunomarcadas por área de fascículo nervoso, conforme previamente descrito.

4.8.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Os cortes destinados a microscopia eletrônica foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 Spirit e as áreas de interesse foram fotografadas. A análise ultraestrutural permitiu detectar a presença ou ausência de debris de mielina degenerada, arranjo estrutural, aspecto de lamelas e invaginações da bainha de mielina. Em um número

representativo de imagens (mínimo de 6) de cada região do nervo, foi realizada a morfometria das fibras amielínicas. Foram mensurados a área total da célula de Schwann e o número de fibras amielínicas por célula de Schwann.

4.9 – Dosagem de fatores neurotróficos:

Os fatores neurotróficos NGF e GDNF foram dosados pelo método imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) utilizando-se kits comerciais de dosagem (GDNF: G7621 - Emax Promega, EUA; NGF: DY556 e DY999 - R&D Systems, EUA). Os fragmentos dos nervos congelados foram homogeneizados em tampão de lise (TRIS-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, NP40 1%, Glicerol 10%, Pepstatina A 1 μ M, EDTA 10 mM, E-64 10 μ M, Vanadato de sódio 0,5 mM) pelo processador ultrassônico (Sonic Systems, EUA) e centrifugados em centrífuga refrigerada (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) a 14.000 rpm por 20 minutos a 4° C. Os sobrenadantes resultantes foram aliquoteados em tubos tipo *ependorf* e armazenados novamente a -70 °C até o momento da realização da técnica de ELISA. O método imunoenzimático utilizado foi o de ELISA sanduíche, ou ELISA de captura, que consiste na imobilização dos antígenos presentes na solução problema. Um anticorpo primário específico ao antígeno é adsorvido ao poço da microplaca e, em seguida, o antígeno presente na solução (oriunda da amostra) é adicionado. Posteriormente, o segundo anticorpo específico ao antígeno marcado com uma enzima é adicionado e essa enzima reage com um substrato levando à mudança de cor do cromógeno. Dessa forma, a presença de cor nos poços indica a presença do antígeno, podendo ser quantificado.

Para as dosagens de GDNF, as placas de 96 poços (MaxiSorp™) foram revestidas com anticorpo monoclonal anti-GDNF durante a noite à 4°C. Após 5 lavagens no dia seguinte com a solução de lavagem específica, o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado por incubação de 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μ l das diferentes amostras, bem como as diferentes diluições de GDNF necessárias para construir a curva padrão, com posterior incubação por 6 h à temperatura ambiente. Desse modo, o GDNF solúvel presente nas amostras pode se ligar especificamente ao anticorpo monoclonal anti-GDNF. Após 5 lavagens com solução de lavagem específica, adicionou-se o anticorpo policlonal anti-GDNF para ligação ao GDNF previamente ligado ao anticorpo monoclonal. Após incubação durante a noite à 4°C, foram realizadas 5 lavagens com solução de lavagem específica para remoção dos excessos de

anticorpos não ligados. Em seguida, foi realizada a incubação com um anticorpo de galinha conjugado à enzima HRP por 2 h à temperatura ambiente para se detectar o anticorpo policlonal anti-GDNF. Após 5 lavagens para remoção dos excessos de anticorpos não ligados, procedeu-se à incubação com o substrato cromogênico (TMB one solution) por 15 min à temperatura ambiente com interrupção da reação pela adição de ácido clorídrico 1 M. A alteração de cor observada foi medida por leitura da absorbância a 450nm em leitor de ELISA (SpectraMax M2 microplate reader). Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1 (Molecular Devices, EUA) e as concentrações de GDNF foram determinadas com base na curva padrão obtida.

Para as dosagens de NGF, as placas de 96 poços (MaxiSorp™) foram revestidas com anticorpo de captura durante a noite à temperatura ambiente. Após 3 lavagens no dia seguinte com a solução de lavagem específica, foi realizado o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos com reagente diluente (BSA 1% em PBS) com incubação por 1 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, foram realizadas novamente 3 lavagens com a solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µl das diferentes amostras, bem como as diferentes diluições de NGF necessárias para construir a curva padrão, com posterior incubação por 2 h à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi realizada a lavagem das placas por 3 vezes e foi adicionado 100 µl de anticorpo de detecção em cada poço da placa para incubação por 2 h. Após 3 lavagens com solução de lavagem específica, adicionou-se 100 µL de estreptavidina (Streptavidin – HRP) na diluição específica por 20 minutos. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com a solução de lavagem e foram adicionados 100 µl da solução de substrato (Kit DY999) em cada poço da placa. Após incubação por 20 minutos, foram adicionados 50 µl da solução de parada (2N H₂SO₄) e a leitura da placa foi realizada imediatamente na absorbância de 450nm em leitor de ELISA (SpectraMax M2 microplate reader). Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1 (Molecular Devices, EUA) e as concentrações de NGF foram determinadas com base na curva padrão obtida.

A quantificação de proteína total foi realizada de acordo com o método Bradford (1976) de colorimetria. As amostras foram diluídas em água Milli-Q (4 µl de amostra / 96 µl água Milli-Q) e homogeneizadas. A solução padrão utilizada (BSA em água, 1 mg/ml) foi diluída (1:10) em

água Milli-Q e foi utilizada para a curva padrão nas diluições de 2.0, 1.5, 1.0 e 0.5 µg. Para o branco e padrão 0 foi utilizado apenas água milli-Q. As placas de 96 poços (MaxiSorp™) foram preenchidas com 180 µl de Corante Bradford (azul de Cromassi G250 – Sigma 10mg; etanol absoluto 5 ml; ác. fosfórico a 85 % 10 ml e água Milli-Q qsq 100 ml) e 20 µl de (amostra ou solução padrão), obedecendo o desenho da placa. As placas foram protegidas da luz por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se a leitura na absorvância de 600 nm em leitor de ELISA (SpectraMax M2 microplate reader) e as concentrações de proteína foram determinadas.

4.10 - Análise estatística:

A ocorrência de distribuição normal dos dados absolutos foi avaliada utilizando-se o programa GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Diferenças entre duas condições experimentais foram detectadas utilizando-se o teste t não pareado (dados paramétricos) ou o teste Mann-Whitney (dados não paramétricos). Para o aumento da frequência nas avaliações comportamentais foi utilizado o teste Z. Os dados foram expressos pelas médias +/- SEM (dados paramétricos) ou medianas (dados não paramétricos). Valores de probabilidade (p) iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

4.11 - Delineamento experimental:

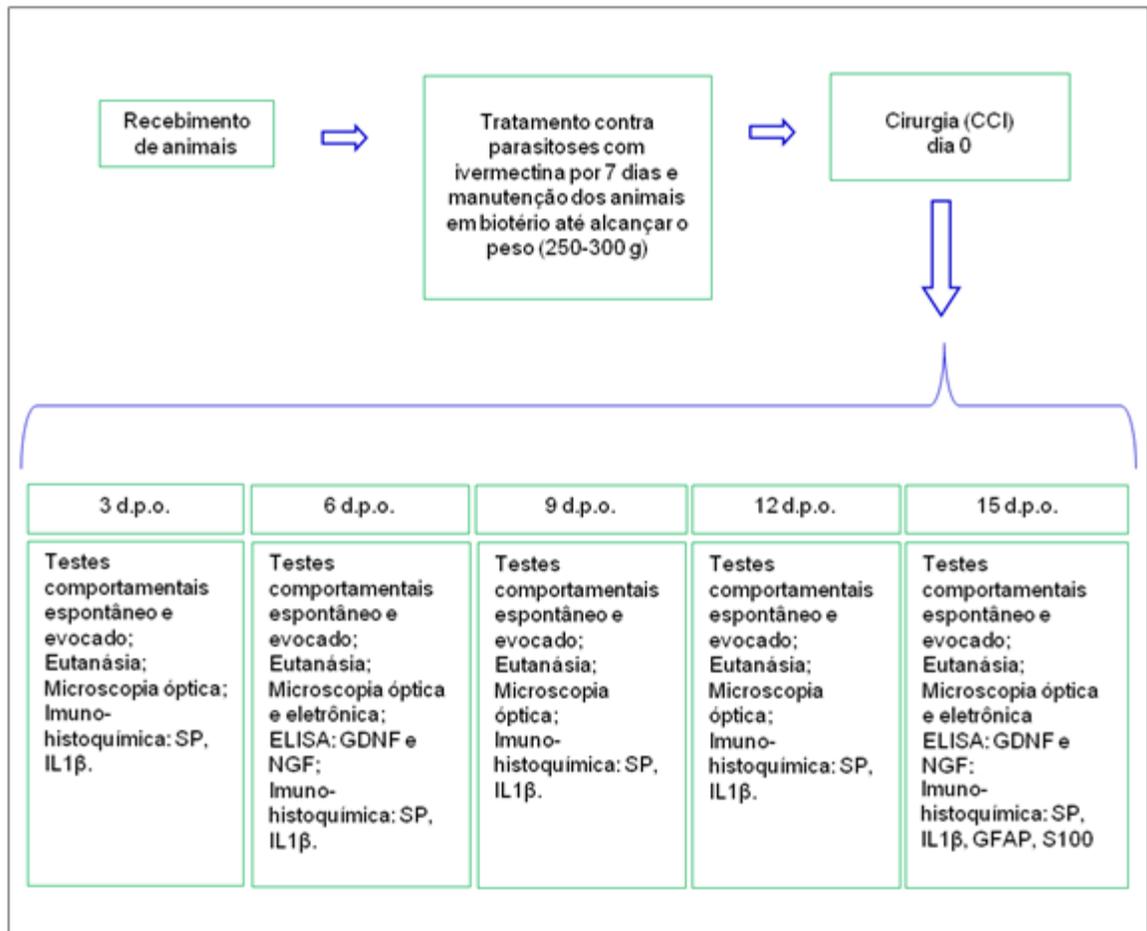


Figura 4: Delineamento experimental representando o desenho experimental do estudo contendo todas as etapas contempladas. N=5 animais, no mínimo, por d.p.o..

5 - RESULTADOS

5.1 – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL ESPONTÂNEA

A análise do comportamento espontâneo dos animais evidenciou que os ratos efetivos apresentaram maior número de episódios de *grooming* facial em relação aos animais sham e controle aos 3 d.p.o. e 15 d.p.o. (TABELA 3). Os *groomings* faciais foram, em sua maioria, pequenos, abrangendo apenas a região da vibrissa, segundo classificação de Imamura *et al.* (1997). No entanto, os animais efetivos, aos 3 d.p.o., apresentaram número de *groomings* médios superior ao dos animais sham (TABELA 3). Com relação ao comportamento exploratório, um número maior de animais efetivos apresentou esse comportamento em relação ao sham aos 3 d.p.o. (TABELA 4). Nos demais tempos, não foi observada diferença no comportamento exploratório. Outros comportamentos observados como imobilidade ou descanso / sono não se mostraram diferentes entre os grupos de animais para nenhum dos tempos estudados (TABELA 4).

Avaliação comportamental espontânea - <i>grooming</i>					
		Tamanho do <i>grooming</i>			
Tempo	Animais	Pequeno	Médio	Grande	Total
3 d.p.o.	sham	37	23	2	62
	efetivo	35	39*	5	79*
6 d.p.o.	sham	34	21	5	60
	efetivo	35	32	1	68
9 d.p.o.	sham	26	18	0	44
	efetivo	28	8	5	41
12 d.p.o.	sham	33	19	1	53
	efetivo	29	18	4	51
15 d.p.o.	sham	17	12	1	30
	efetivo	23	16	5	44*

TABELA 3: Avaliação comportamental espontânea: *groomings* faciais *Aumento da frequência, teste Z / proporção de 2 populações, p=0.04338 (total de *groomings* aos 3 d.p.o.), p=0.0083 (*grooming* médio aos 3 d.p.o.) e p=0.02144 (total de *groomings* aos 15 d.p.o.). N = 66 (3 d.p.o.), 60 (6 d.p.o.), 28 (9 d.p.o.), 12 (12 d.p.o.) e 13 (15 d.p.o.) animais por grupo, *p<0,05, teste Mann-Whitney ou teste t não pareado.

Avaliação Comportamental Espontânea – Outros comportamentos				
Tempo	Animais	Comportamento exploratório	Imobilidade	Descanso / Sono
3 d.p.o.	sham	17	4	38
	efetivo	30*	1	30
6 d.p.o.	sham	26	4	39
	efetivo	26	5	33
9 d.p.o.	sham	20	3	26
	efetivo	19	4	19
12 d.p.o.	sham	21	2	24
	efetivo	19	0	22
15 d.p.o.	sham	14	1	21
	efetivo	14	1	18

TABELA 4: Avaliação comportamental espontânea: Outros comportamentos *Aumento da frequência, teste Z / proporção de 2 populações, $p=0.0226$. N = 66 (3 d.p.o.), 60 (6 d.p.o.), 28 (9 d.p.o.), 12 (12 d.p.o.) e 13 (15 d.p.o.) animais por grupo, $*p<0,05$, teste Mann-Whitney ou teste t não pareado.

5.2 - AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EVOCADA

A análise do comportamento evocado revelou, na primeira semana após a CCI (período pós-operatório recente), diminuição de sensibilidade mecânica aos filamentos de von Frey nos ratos efetivos em relação aos ratos sham (**FIGURA 5**). Com o decorrer do tempo, os ratos efetivos apresentaram aumento significativo da resposta aos filamentos de von Frey em comparação aos ratos sham (**FIGURA 5**), com comportamento aversivo e desencadeamento de *grooming*, sugerindo desenvolvimento de alodínia.

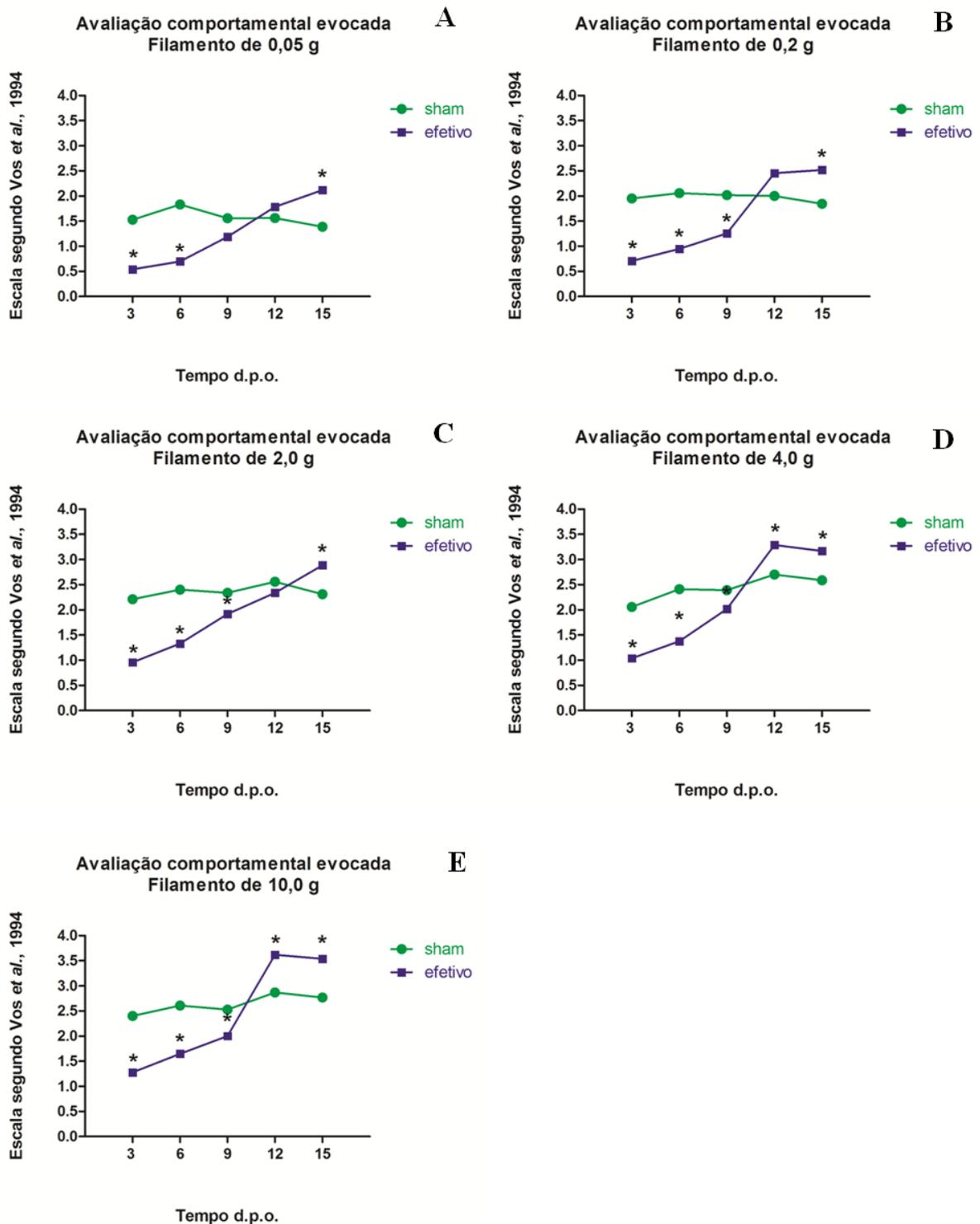


FIGURA 5: Avaliação comportamental evocada por filamentos de von Frey de forças de dobramento de 0,05 g (A), 0,2 g (B), 2 g (C), 4 g (D) e 10 g (E) em ratos submetidos (ratos efetivos) ou não (ratos sham) à CCI do nervo infra-orbitário. Na primeira semana p.o., os ratos efetivos apresentaram diminuição significativa de resposta a todos os filamentos de von Frey em relação aos ratos sham. No entanto, na

segunda semana de pós operatório, ocorreu uma hiperresponsividade aos filamentos de von Frey de 4,0 g (D) e 10,0 g (E) nos ratos efetivos em comparação aos ratos sham. N = 66 (3 d.p.o.), 60 (6 d.p.o.), 28 (9 d.p.o.), 12 (12 d.p.o.) e 13 (15 d.p.o.) animais por grupo, * $p < 0,05$, teste Mann-Whitney ou teste t não pareado.

5.3 - ANÁLISE MORFOLÓGICA À MICROSCOPIA ÓPTICA

Os animais efetivos apresentaram alterações histopatológicas significativas em relação aos animais sham. Foi possível observar lesão axonal, presença de infiltrado inflamatório e aumento da celularidade nos fascículos nervosos dos animais efetivos na porção distal (**FIGURA 6**). Aos 6 e 15 d.p.o., os animais efetivos apresentaram lesões axonais e, aos 15 d.p.o, aumento da celularidade nos animais efetivos em comparação aos animais sham (**FIGURA 6**). Na porção proximal, apesar das alterações serem de menor grau que na porção distal, foi possível observar aumento na celularidade, com muitas células da glia em torno dos corpos de neurônios em relação ao sham (**FIGURA 7**).

Aos 3 d.p.o., animais sham e efetivos apresentavam lesões semelhantes na porção distal do nervo. Ao longo do tempo, os animais sham se recuperam. No entanto, animais efetivos apresentam lesões consideráveis que se mantiveram significativamente mais pronunciadas durante todo o período avaliado (**FIGURA 8A**). Já na porção proximal, não foram observadas lesões nos nervos dos animais sham em nenhum dos tempos. Nos nervos dos animais efetivos, observamos lesões no tempo de 9 e 12 d.p.o. (**FIGURA 8B**).

Com relação à inflamação, no tempo de 3 d.p.o., os efetivos e sham apresentavam níveis de inflamação semelhantes na porção distal do nervo, sendo que os animais sham tiveram resolução da inflamação com o decorrer do tempo. Animais efetivos apresentaram manutenção do processo inflamatório, com redução aos 9 d.p.o. (**FIGURA 8C**).

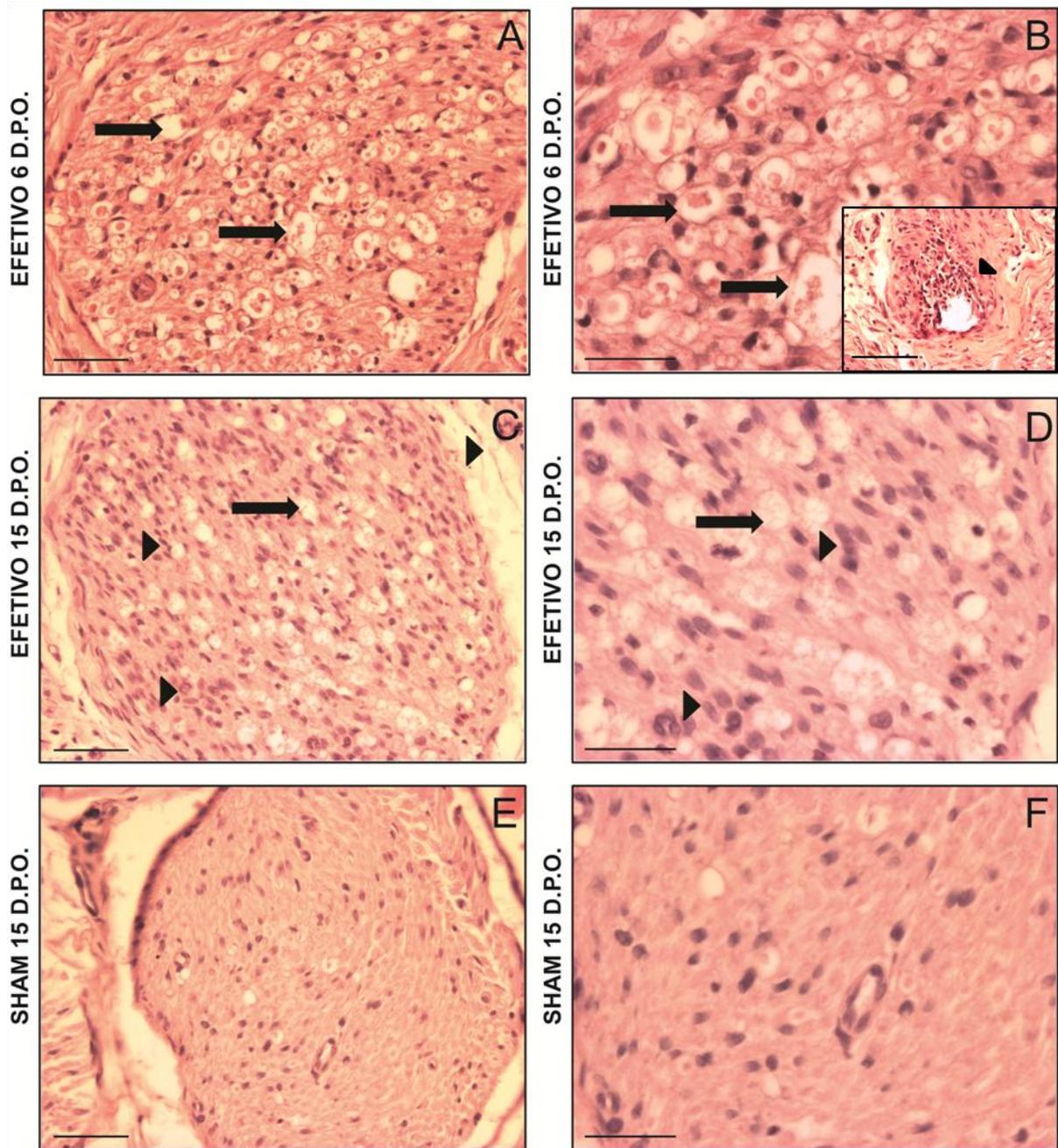


FIGURA 6: Porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham. Lesões da porção distal do nervo trigêmeo em animais efetivos. Lesão axonal nos tempos de 6 (A, B) e 15 d.p.o. (C, D), evidenciando vacuolização (setas grossas) e foco inflamatório no perineuro (B, detalhe, cabeça de seta). Fascículos nervosos com aumento de celularidade no tempo de 15 d.p.o. (C, D, cabeças de seta). Nervos de animais sham preservados aos 15 d.p.o. (E,F). As barras indicam 50 μ m (A, B-detalhe, C e E), 30 μ m (B, D e F). Coloração HE.

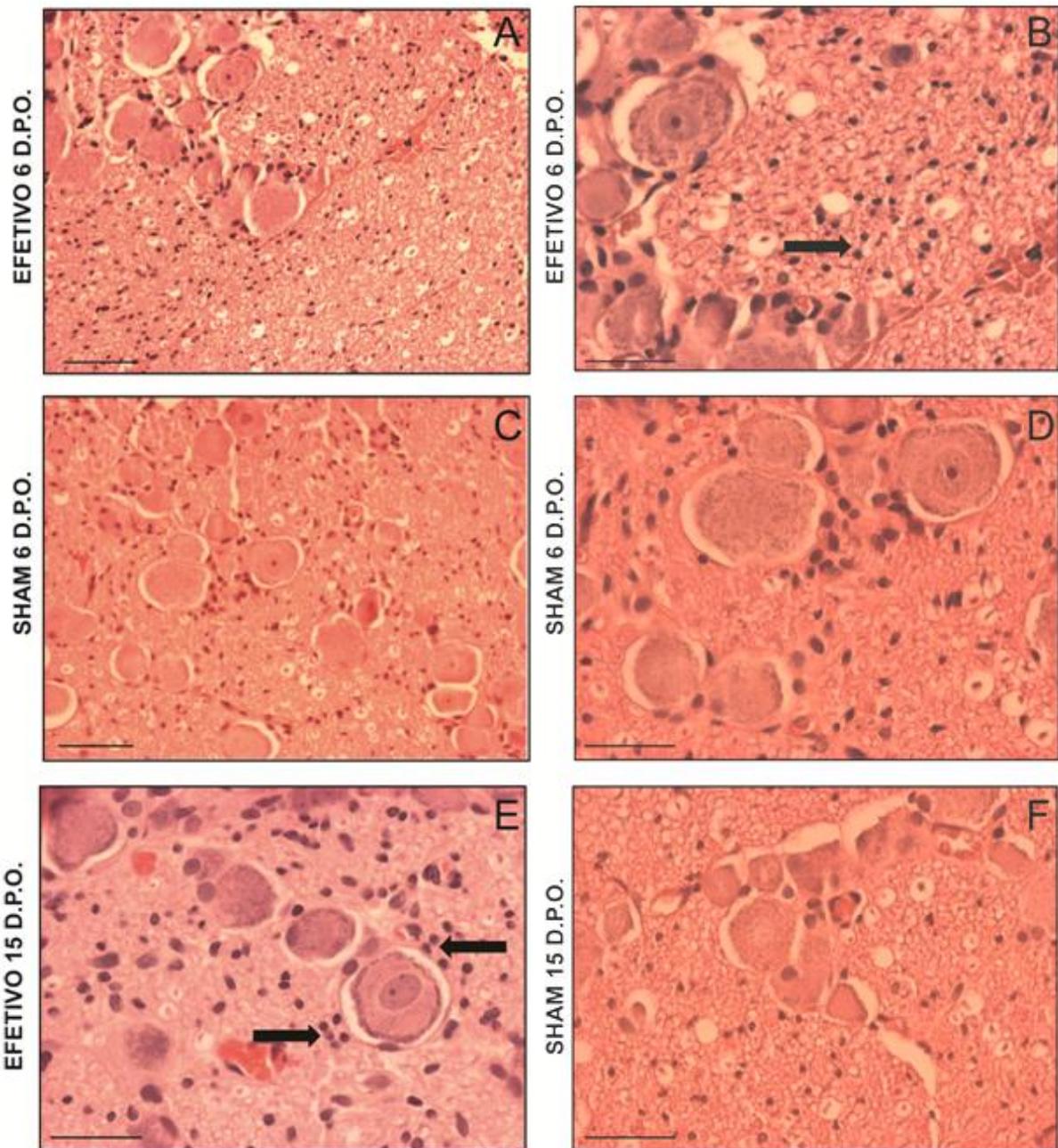


FIGURA 7: Porção proximal do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham. Lesões da porção proximal do nervo trigêmeo em animais efetivos. Aumento da celularidade (setas grossas) nos tempos de 6 (A, B) e 15 d.p.o. (E) em animais efetivos. Gânglios trigeminiais preservados em animais sham aos 6. (C, D) e 15 d.p.o. (F). As barras indicam 50 μm (A,C) e E) e 30 μm (B,D,E,F). Coloração HE.

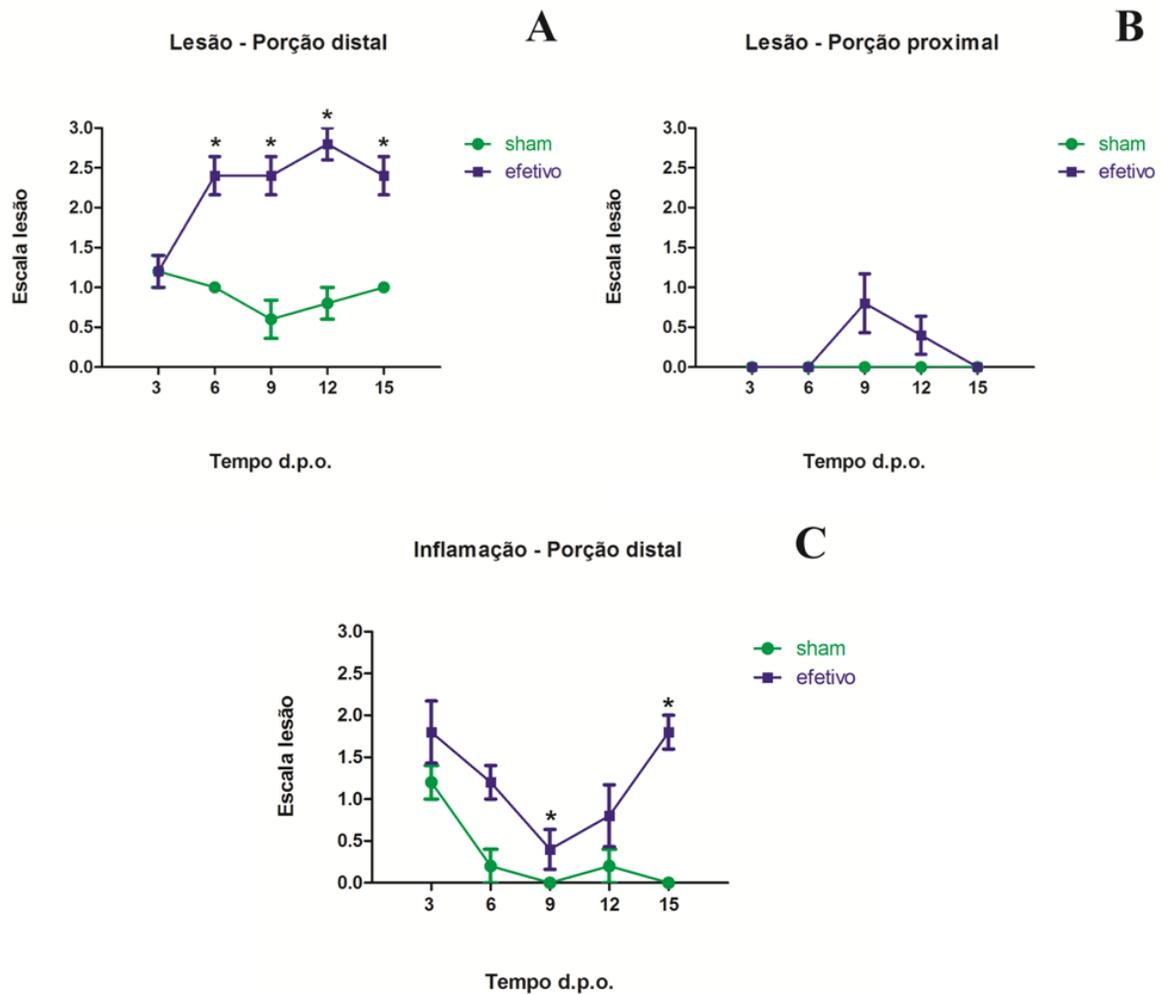


FIGURA 8: Semiquantificação das lesões do nervo trigêmeo em animais efetivos e sham ao longo do tempo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: lesão (alteração da arquitetura tecidual, vacuolização axonal) e inflamação (presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente). N = 5 animais por grupo, teste t não pareado, $p < 0,05$.

5.4 - ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA CELULARIDADE

Em função da análise qualitativa ter evidenciado aumento de celularidade nos fascículos nervosos, foi realizada a análise morfométrica do número de células por área de fascículo nervoso nas diversas porções do nervo de animais efetivos e sham ao longo do tempo (**FIGURA 9**). Na porção distal, a avaliação morfométrica revelou maior número de células a partir de 9 d.p.o. em animais efetivos em relação aos sham. Na porção proximal, os nervos efetivos apresentaram maior celularidade apenas aos 15 d.p.o em relação aos sham.

Em função do aumento da celularidade observado nos fascículos nervosos, foi realizada imunohistoquímica para marcadores de células inflamatórias (CD68) e de células da glia (GFAP e S100), com o intuito de verificar o tipo celular aumentado. Não foi observada imunopositividade citoplasmática para CD68 (dado não mostrado), mas observamos imunoexpressão de GFAP e S100 em diversas células dos fascículos nervosos (**FIGURA 10**).

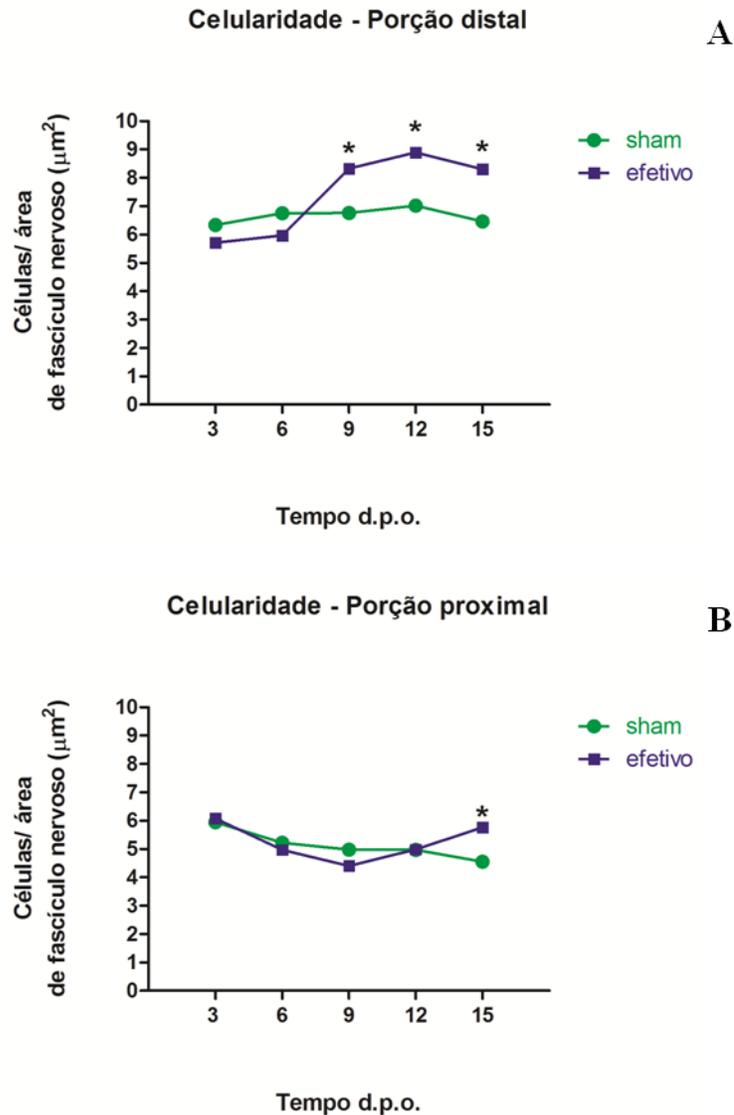


FIGURA 9: Avaliação morfométrica do número de células por área de fascículo nervoso ao longo do tempo nas porções distal (**A**) e proximal (**B**) em nervos de animais efetivos e sham. Na porção distal, maior celularidade a partir do 9 d.p.o. nos nervos de animais efetivos. Na porção proximal, celularidade aumentada aos 15 d.p.o.. N = 5 animais por grupo. Teste Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

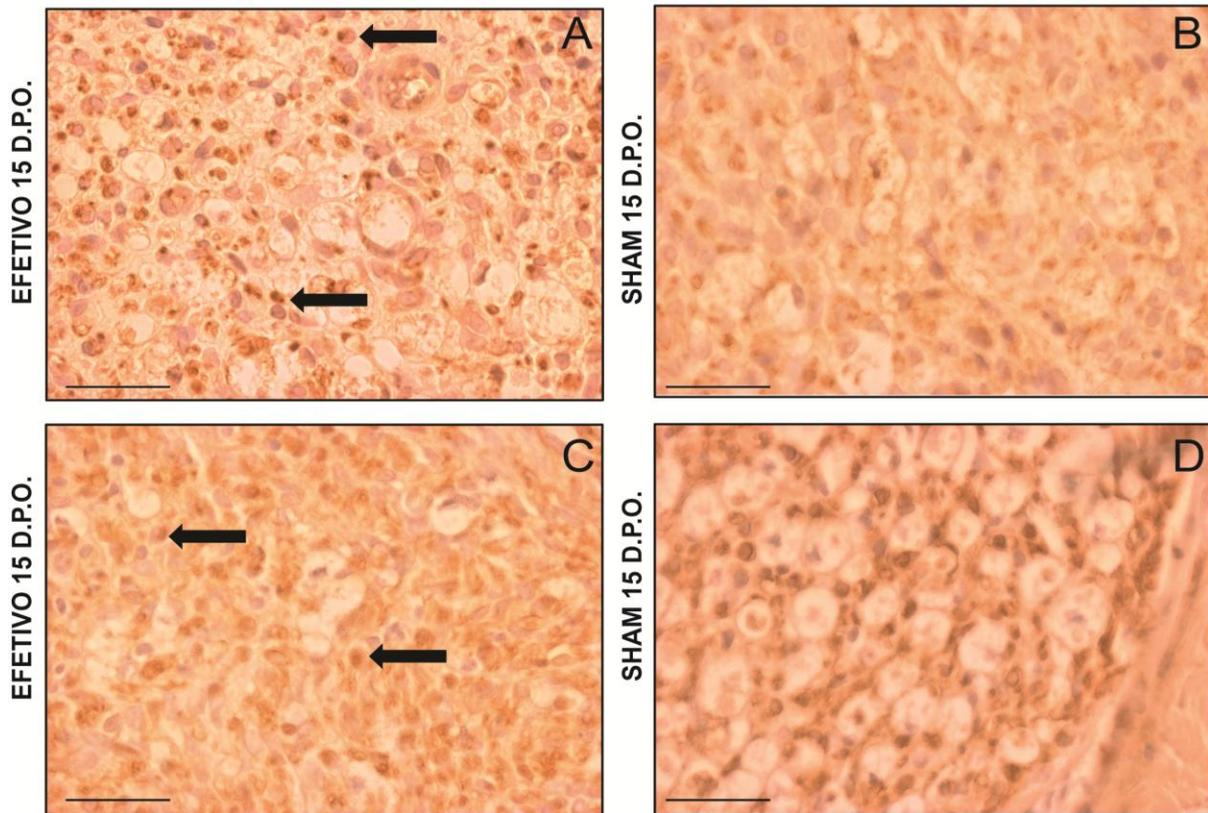


FIGURA 10: Imunopositividade para GFAP (setas) na porção distal dos nervos de animais efetivos (A) e sham (B) aos 15 d.p.o. Imunopositividade para S100 (setas) na porção distal dos nervos de animais efetivos (C) e sham (D) aos 15 d.p.o.. As barras representam 50 μ m.

5.5 - ANÁLISE QUALITATIVA DAS FIBRAS MIELÍNICAS E AMIELÍNICAS

A análise qualitativa da mielinização através da coloração especial Luxol Fast Blue (**FIGURA 11**) e em cortes histológicos de rotina e da coloração azul de toluidina em cortes semi-finos (**FIGURA 12**), revelaram desmielinização significativa e lesões intensas em fibras mielínicas na região distal e em regiões proximais do nervo trigêmeo de ratos efetivos (**FIGURA 11**). Aos 3, 6, 9 d.p.o., os animais efetivos apresentaram lesões intensas da bainha de mielina, perda do padrão de mielinização dos fascículos nervosos e alteração completa do aspecto dos axônios e bainhas de mielina, sendo que as alterações mais intensas foram observadas aos 6 d.p.o. A desmielinização e a degeneração da mielina apresentaram-se presentes em fascículos nervosos lesados, sendo diretamente relacionada à lesão nos animais efetivos. Aos 12 e 15 d.p.o., pode-se observar desmielinização menos intensa. Nos animais sham, algum grau de desmielinização foi encontrado em fascículos periféricos do nervo (**FIGURA 11**).

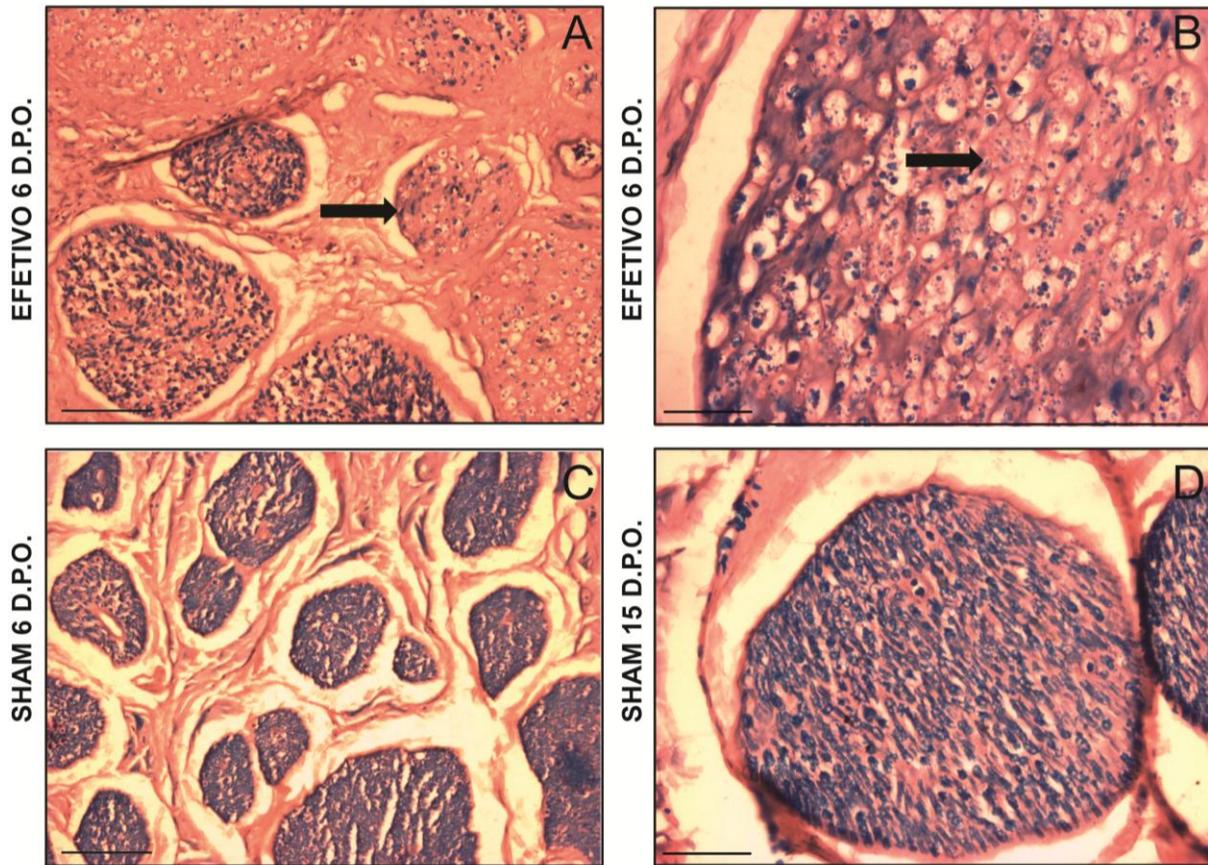


FIGURA 11: Desmielinização na porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos (A,B) em comparação aos animais sham (C,D) aos 6 d.p.o.. Perda de mielina em fascículos nervosos (A, B, setas) em animais efetivos aos 6 d.p.o.. As barras indicam 100 μm (A,C) ou 30 μm (B,D). Coloração Luxol Fast Blue.

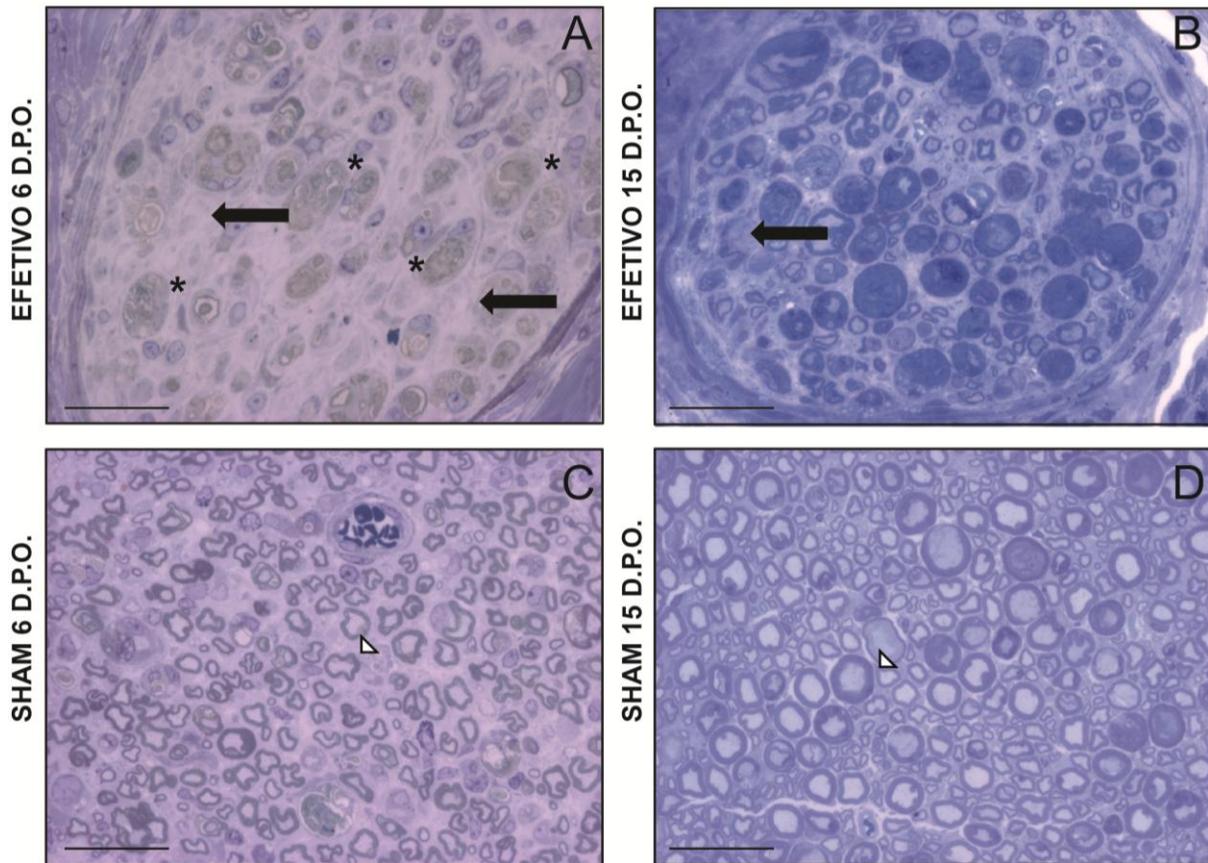


FIGURA 12: Desmielinização na porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos (A,B) em comparação aos animais sham (C,D) aos 6 e 15 d.p.o.. Fibras mielínicas bem preservadas (C, D, cabeça de seta) em animais sham e área de total desmielinização (A, B, setas) em animais efetivos aos 6 (A) e 15 (B) d.p.o.. Presença de debris de mielina degenerada (*) em animais efetivos aos 6 d.p.o. (A). As barras representam 50 μm .

A análise ultraestrutural da desmielinização revelou, na porção distal de animais efetivos, a formação de debris de mielina degenerada, grave desarranjo estrutural da bainha de mielina com separação de suas lamelas e numerosas invaginações da bainha nos tempos de 6 d.p.o. e 15 d.p.o., sendo essas alterações mais intensas aos 6 d.p.o. (**FIGURA 13**). No tempo de 15 d.p.o., foram observadas bainhas de mielinas proporcionalmente finas em relação aos axônios. Na porção proximal do nervo, não foram observadas diferenças entre os animais efetivos e controles. Alterações estruturais, porém mais discretas, também foram observadas nas fibras amielínicas, com maior número de fibras amielínicas por feixe nos animais efetivos (**FIGURA 13**).

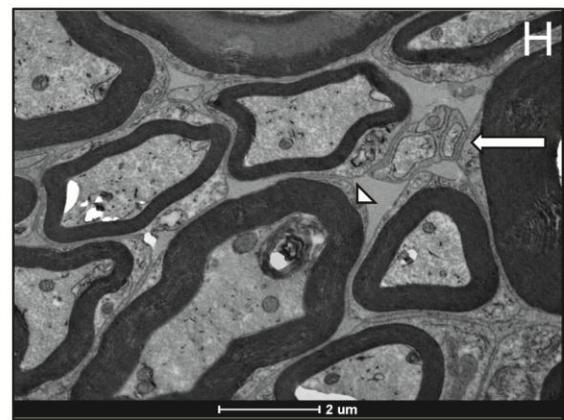
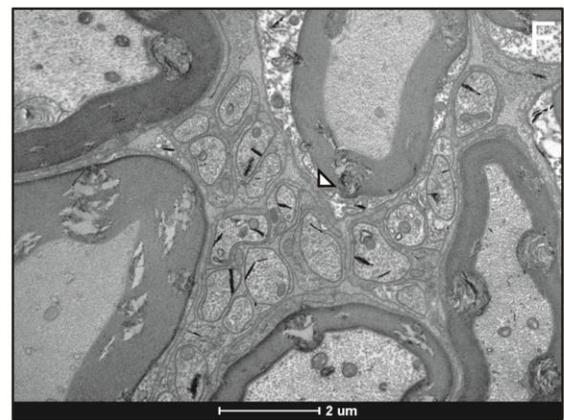
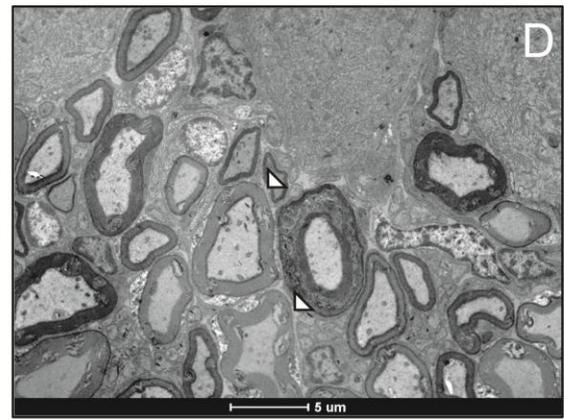
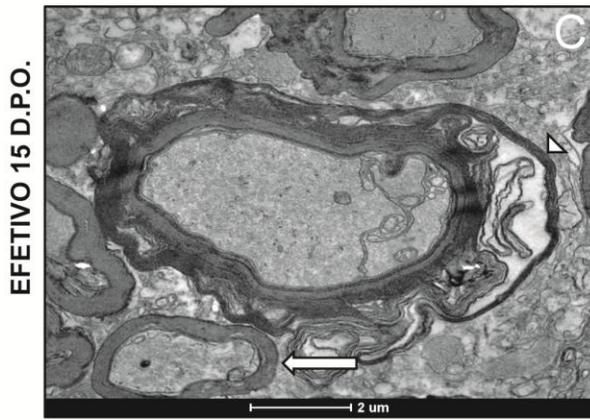
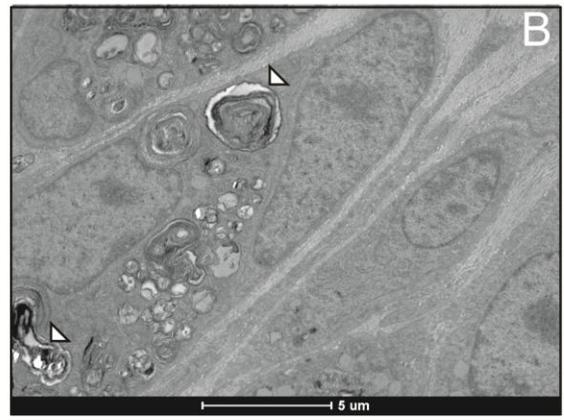
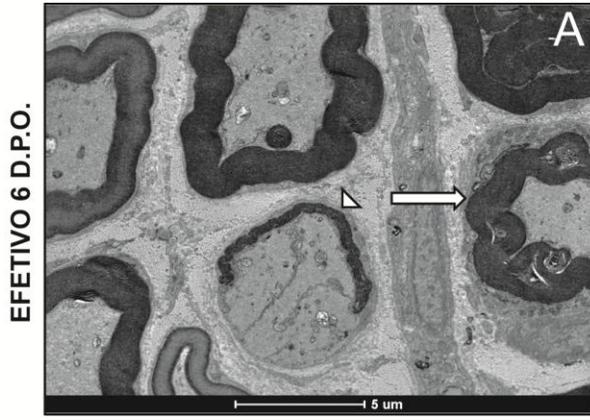


FIGURA 13: Microscopia eletrônica de transmissão da porção distal do nervo trigêmeo de animais efetivos (A-F) e sham (G-H). Invaginação da bainha de mielina (A, seta) e desmielinização intensa (A, cabeça de seta) em animal efetivo aos 6 d.p.o. Debris de mielina degenerada (B, cabeça de seta) em células da glia aos 6.d.p.o.. Bainha de mielina degenerada (C, cabeça de seta) e com perda de densidade (D, cabeça de seta) em animal efetivo aos 15 d.p.o.. Aumento no número de fibras amielínicas por feixe (E, F, cabeças de seta) em animais efetivos aos 6 e 15 d.p.o.. Animais sham aos 6 (G) e 15 d.p.o (H) com fibras mielínicas íntegras (cabeça da seta) e feixe de fibras amielínicas bem preservado (seta).

5.6 - ANÁLISE QUANTITATIVA DA DESMIELINIZAÇÃO

A desmielinização observada à microscopia óptica foi quantificada em cortes corados por Luxol Fast Blue aos 3, 6, 9, 12 e 15 d.p.o.. A análise quantitativa revelou significativa diminuição da área de mielina por fascículo nervoso na porção distal de animais efetivos aos 3, 6, 9, 12 e 15 d.p.o. em relação aos sham (**FIGURA 14**). Na porção proximal, não foram observadas diferenças no grau de mielinização entre animais efetivos e sham para nenhum dos tempos estudados (**FIGURA 14**).

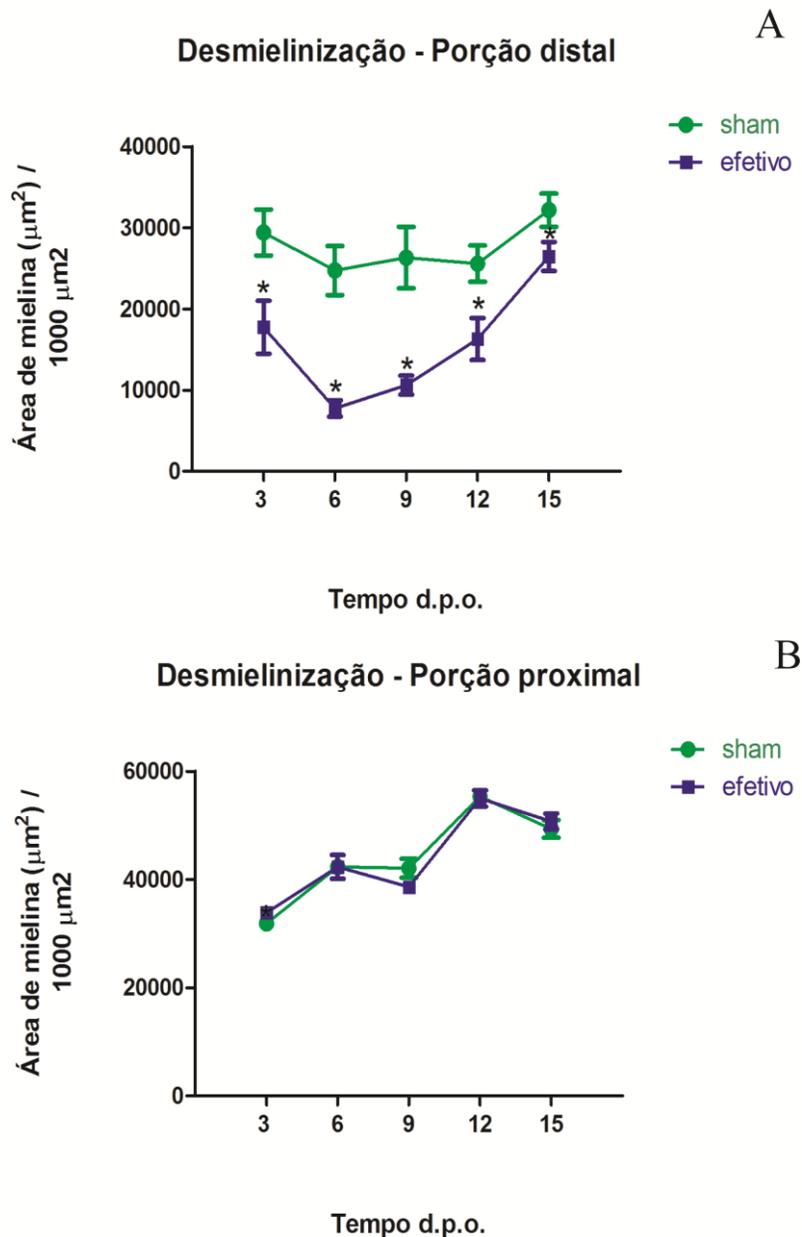


FIGURA 14: Área de mielina (μm^2) por área de fascículo nervoso ($1000 \mu\text{m}^2$) ao longo do tempo nas porções distal (A) e proximal (B) em nervos de animais efetivos e sham. $N = 5$ animais por grupo. Teste t não pareado, $*p < 0,05$.

Segundo Mosconi e Kruger (1996), a razão axônio/mielina é um indicativo de processo de desmielinização / regeneração, já que axônios em remielinização podem apresentar bainha de mielina desproporcionalmente fina em relação à sua área. Ao comparar essa razão, observou-se que animais efetivos apresentaram valores elevados em comparação aos animais sham aos 6 d.p.o na porção distal (FIGURA 15). Aos 15 d.p.o., não foi observada nenhuma diferença entre os

grupos. Na porção proximal, não foram observadas diferenças entre animais sham e efetivos em nenhum dos tempos estudados (**FIGURA 15**).

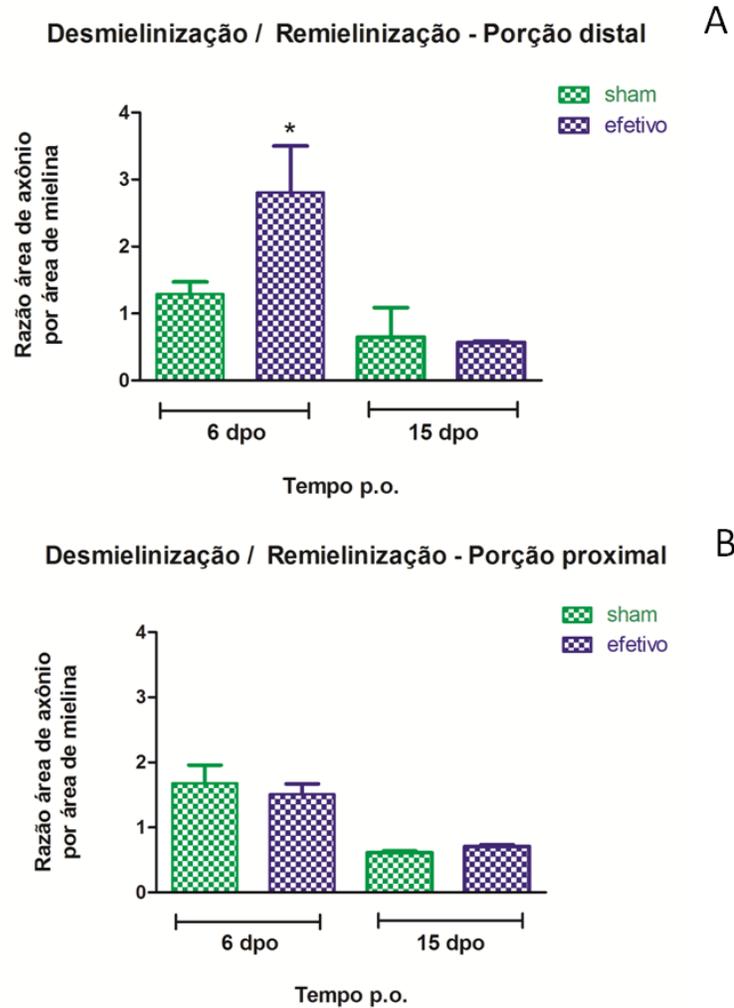


FIGURA 15: Razão área de axônio por área de mielina (μm^2) aos 6 e 15 d.p.o. nas porções distal (A) e proximal (B) de nervos de animais efetivos e sham. N = 5 animais por grupo. Teste t não pareado, * $p < 0,05$.

5.7 – ANÁLISE QUANTITATIVA DE FIBRAS AMIELÍNICAS

Em função da análise qualitativa ter evidenciado feixes de fibras amielínicas com maior número de fibras por feixe, foi realizada a quantificação da área da célula de Schwann, assim como o número de fibras por célula de Schwann. Na porção distal do nervo de animais efetivos apresentaram células de Schwann maiores em relação aos animais sham no tempo de 15 d.p.o.

(FIGURA 16A). Na porção proximal, não foram observadas diferenças entre os grupos em nenhum dos tempos (FIGURA 16B).

Quanto a fibras amielínicas por células de Schwann, não foram observadas diferenças entre os grupos na porção distal (FIGURA 16C) ou proximal (FIGURA 16D) nos tempos analisados de 6 e 15 d.p.o.

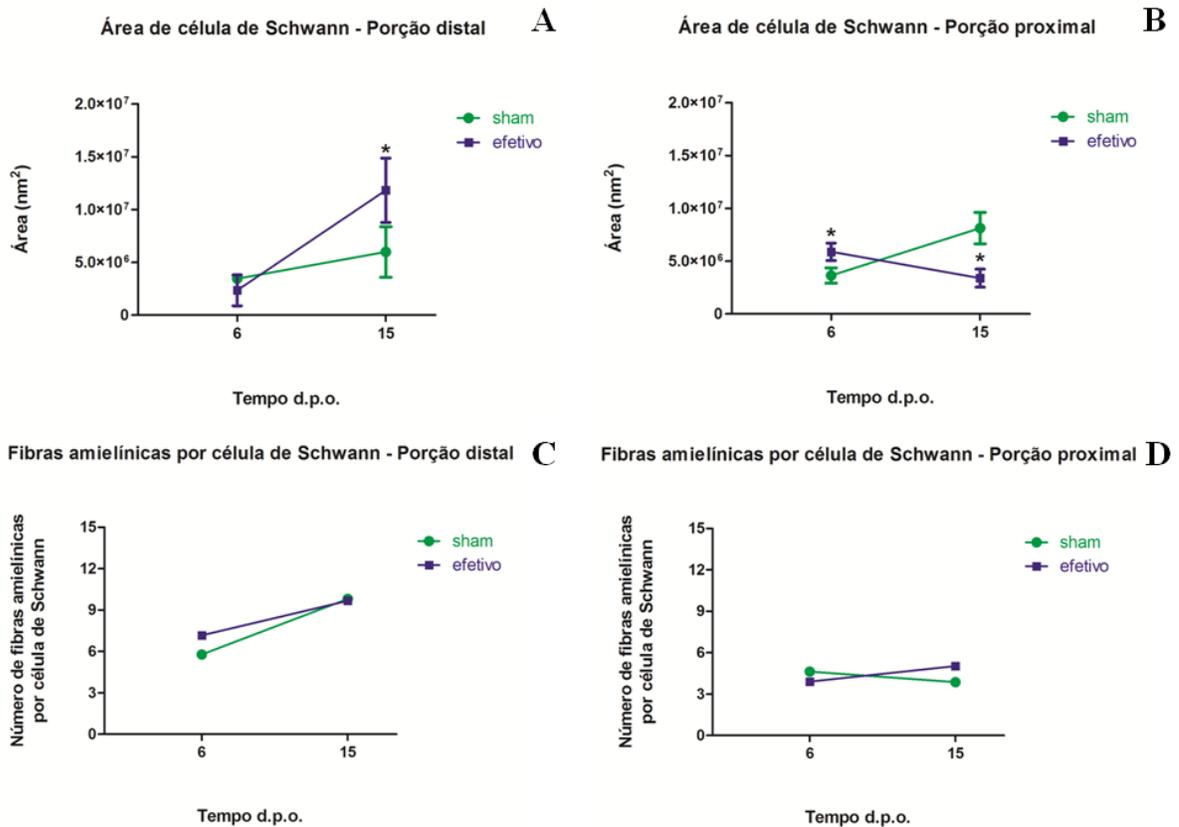


FIGURA 16: Área de célula de Schwann (A, B) e número de fibras amielínicas por célula de Schwann (C,D) nas porções distal e proximal dos nervos de animais efetivos e sham aos 6 e 15 d.p.o.. N=2 animais por grupo, Teste t não pareado (A, B) ou Mann-Whitney (C,D), *p<0,05.

5.8 - EXPRESSÃO DA CITOCINA IL-1 β E DO NEUROPEPTÍDEO SP

Em função do importante papel dos mediadores inflamatórios e dos neuropeptídeos na fisiopatologia da dor, a imunopressão da citocina IL-1 β e do neuropeptídeo SP foram investigadas ao longo do tempo. Observamos, tanto na porção distal quanto na porção proximal dos nervos de animais efetivos, uma maior imunopositividade para IL-1 β (**FIGURA 17 e 18**). A quantificação desses achados revelou maior quantidade de células imunopositivas para IL-1 β aos 9 e 15 d.p.o. na porção distal (**FIGURA 18**). Na porção proximal, os animais efetivos apresentaram maior número de neurônios imunopositivos para IL-1 β aos 3, 6 e 9 d.p.o. (**FIGURA 18**).

Com relação ao neuropeptídeo SP, foi observada maior imunopositividade nos nervos de animais efetivos em relação aos sham (**FIGURA 19 e 20**). A quantificação revelou que os nervos de animais efetivos apresentaram maior marcação para SP aos 6, 9 e 15 d.p.o. na porção distal (**FIGURA 20**). Não foi observada diferença na imunopressão de SP em neurônios de animais efetivos em relação aos sham ao longo do tempo. (**FIGURA 20**).

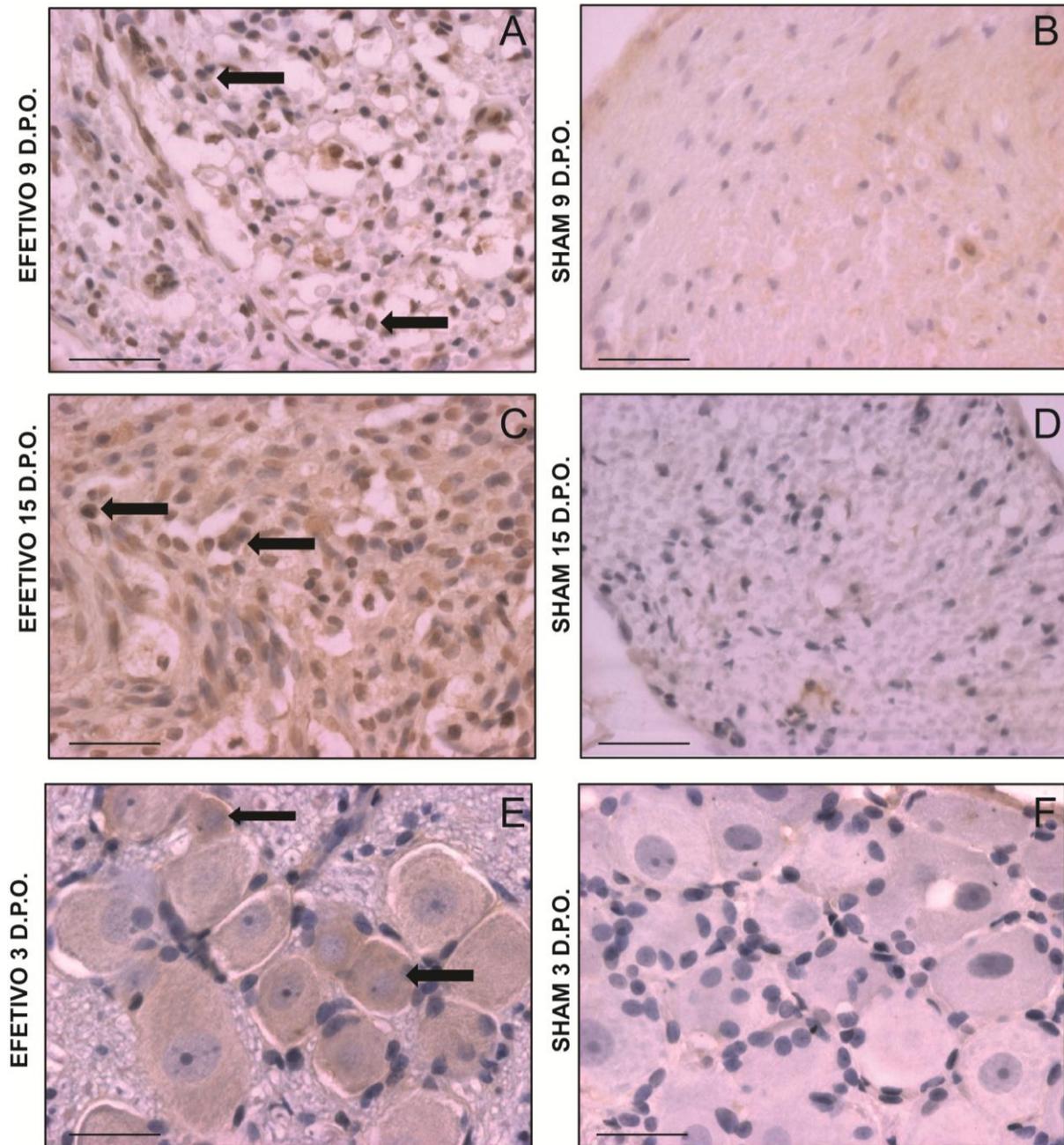


FIGURA 17: Imunopositividade para IL-1 β (setas) na porção distal de nervos trigêmeo de animais efetivos aos 9 (A) e 15 (C) d.p.o. e em animais sham aos 9 (B) e 15 (D) d.p.o.. Imunopositividade para IL-1 β em neurônios na porção proximal de animal efetivo (E) em comparação ao sham (F) aos 3 d.p.o.. As barras representam 50 μ m.

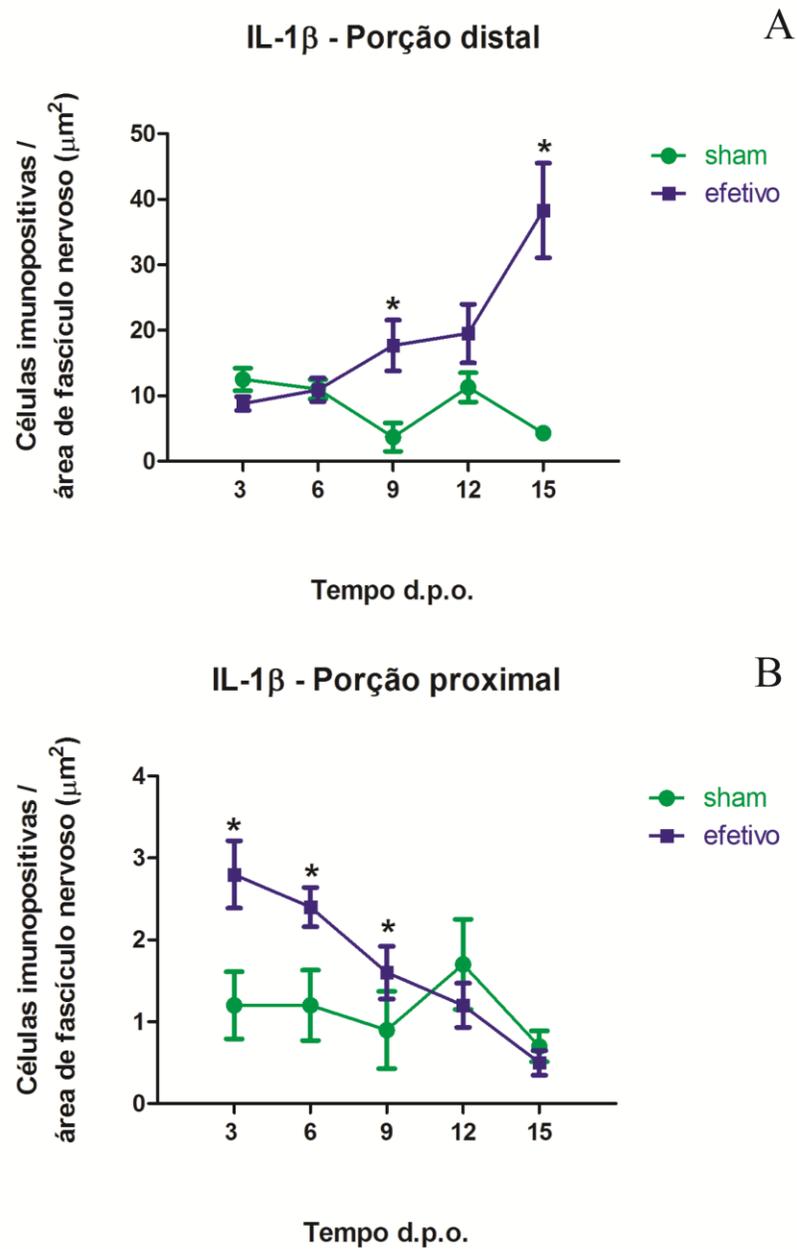


FIGURA 18: Quantificação da imunopositividade para IL-1 β nas porções distal (A) e proximal (B) do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham ao longo do tempo. N = 5 animais por grupo, teste t não pareado, $p < 0,05$.

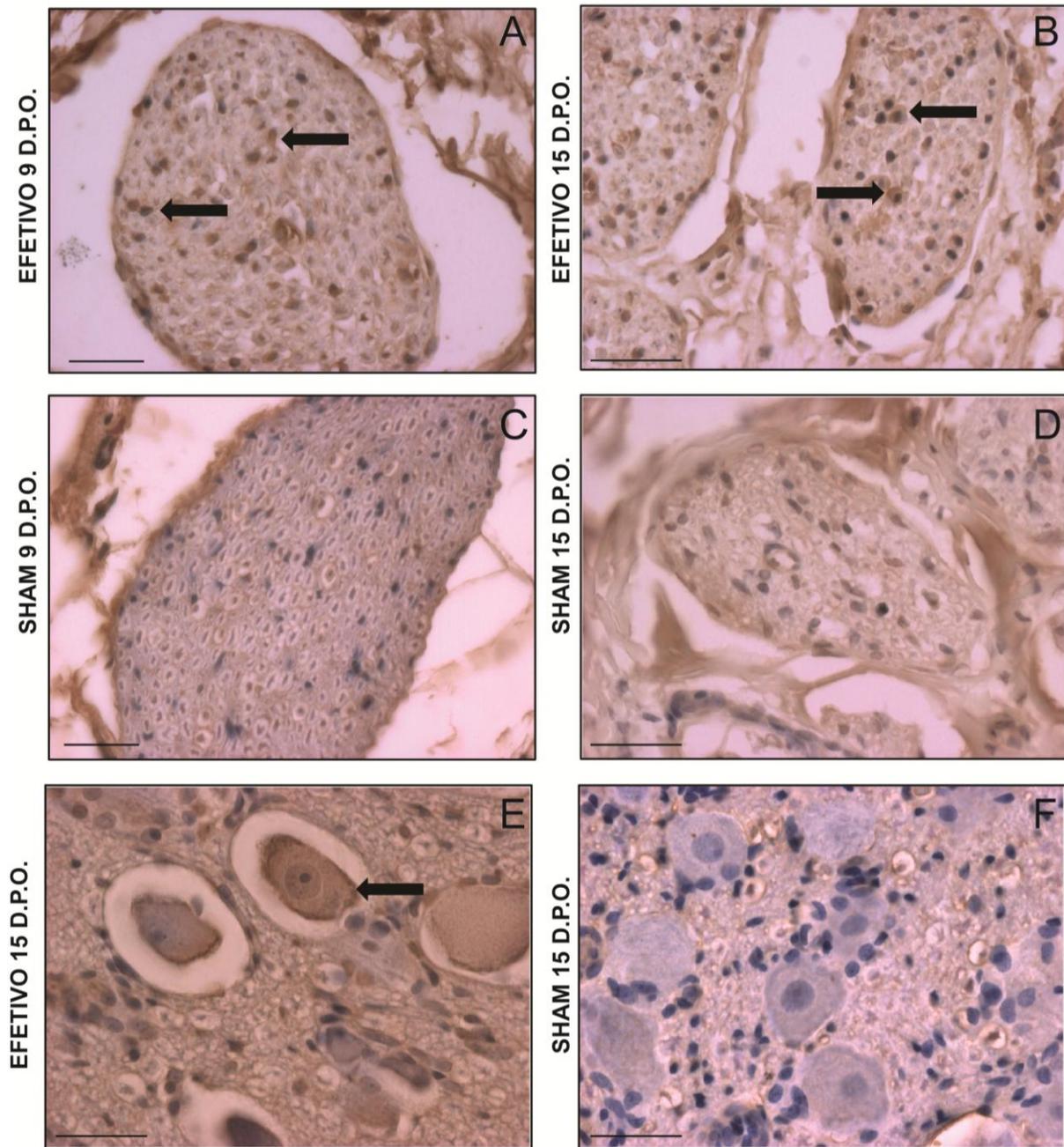


FIGURA 19: Imunopositividade para SP (setas) na porção distal de nervos trigêmeo de animais efetivos aos 9 (A) e 15 (B) d.p.o. e em animais sham aos 9 (C) e 15 (D) d.p.o.. Imunopositividade para SP em neurônios na porção proximal de animal efetivo (E) em comparação ao sham (F) aos 15 d.p.o.. As barras representam 50 μm.

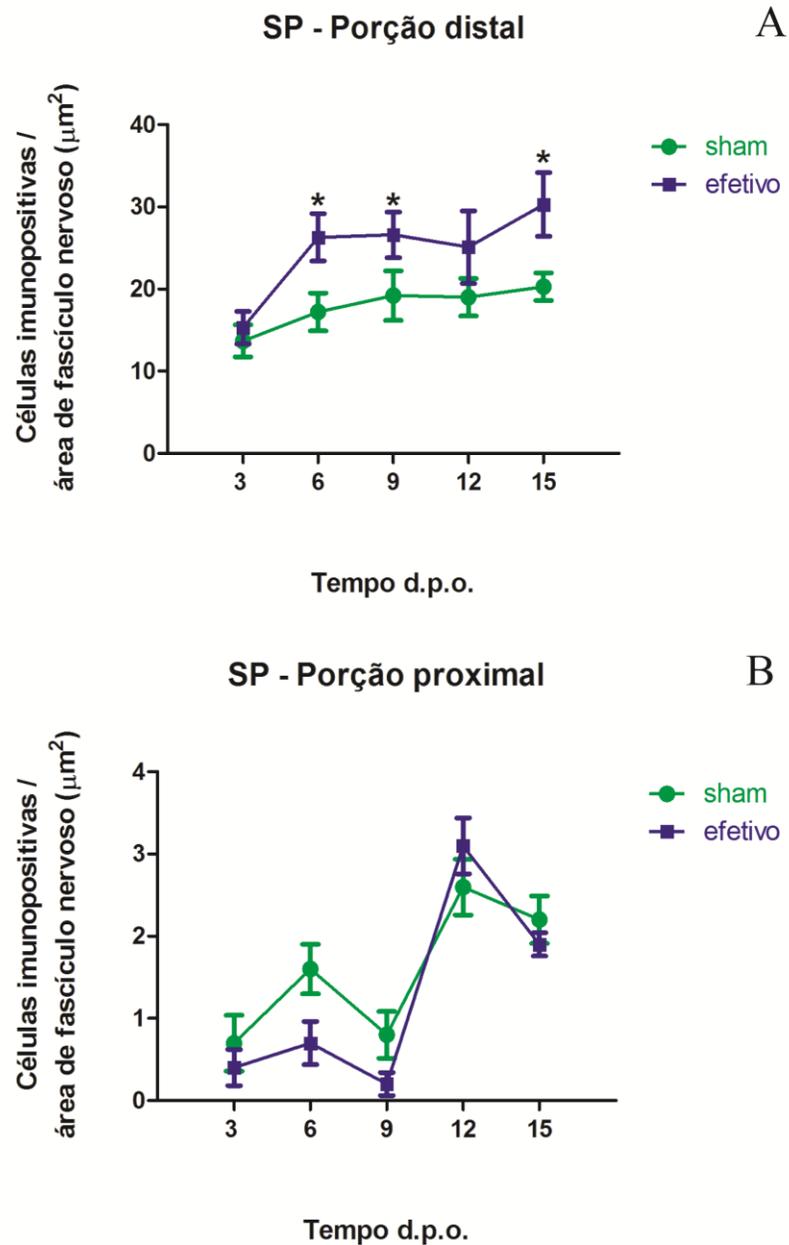


FIGURA 20: Quantificação da imunopositividade para SP nas porções distal (A) e proximal (B) do nervo trigêmeo de animais efetivos e sham ao longo do tempo. N = 5 animais por grupo, teste t não pareado, $p < 0,05$.

5.9 - DOSAGEM DO FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF):

A dosagem de NGF no soro dos animais não evidenciou diferenças entre os grupos nos tempos estudados (**FIGURA 21**). Na porção distal do nervo, apesar dos valores absolutos de dosagens terem sido superiores para diversos animais sham aos 15 d.p.o., não foi observada diferença

estatística entre os grupos de animais nesse tempo, assim como aos 6 d.p.o. Na porção proximal, também não foram observadas diferenças na produção de NGF entre os grupos nos dois tempos estudados (**FIGURA 21**).

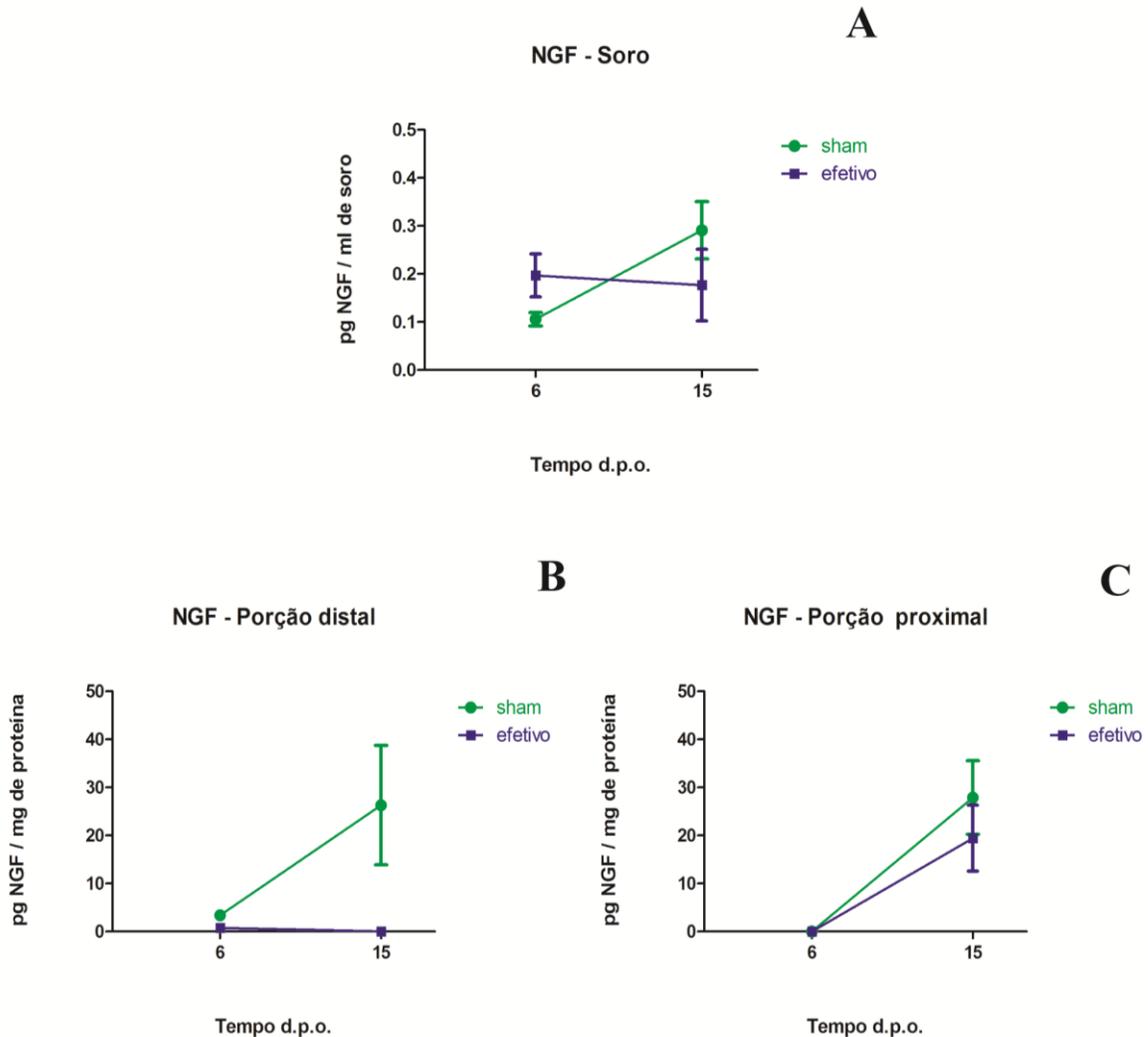


FIGURA 21: Dosagem de NGF no soro (A) (pg de NGF por ml de soro) e nas porções distal (B) e proximal (C) de nervos trigêmeo (pg de NGF por mg de proteína) em animais sham e efetivos aos 6 e 15 d.p.o. N = 10 animais por grupo, teste t não pareado, $p < 0,05$.

5.10 - DOSAGEM DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DA GLIA (GDNF):

Uma vez observado aumento significativo do número de células da glia nos fascículos nervosos e considerando o papel do GDNF no desenvolvimento de dores neuropáticas, foi realizada a dosagem desse fator neurotrófico no soro e nos tecidos dos animais de ambos os grupos aos 6 e

15 d.p.o. Foi observado que, aos 6 d.p.o., os animais efetivos apresentaram níveis séricos de GDNF significativamente inferiores em comparação aos animais sham. No entanto, aos 15 d.p.o., não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos de animais (**FIGURA 22**). Na porção distal do nervo, os animais sham e efetivos produziram níveis semelhantes de GDNF aos 6 d.p.o. (**FIGURA 22**) e, aos 15 d.p.o., não foram detectadas dosagens significativas de GDNF em nenhum dos grupos. Na porção proximal, animais dos grupos sham e efetivos produziram níveis semelhantes de GDNF tanto aos 6 quanto aos 15 d.p.o. (**FIGURA 22**).

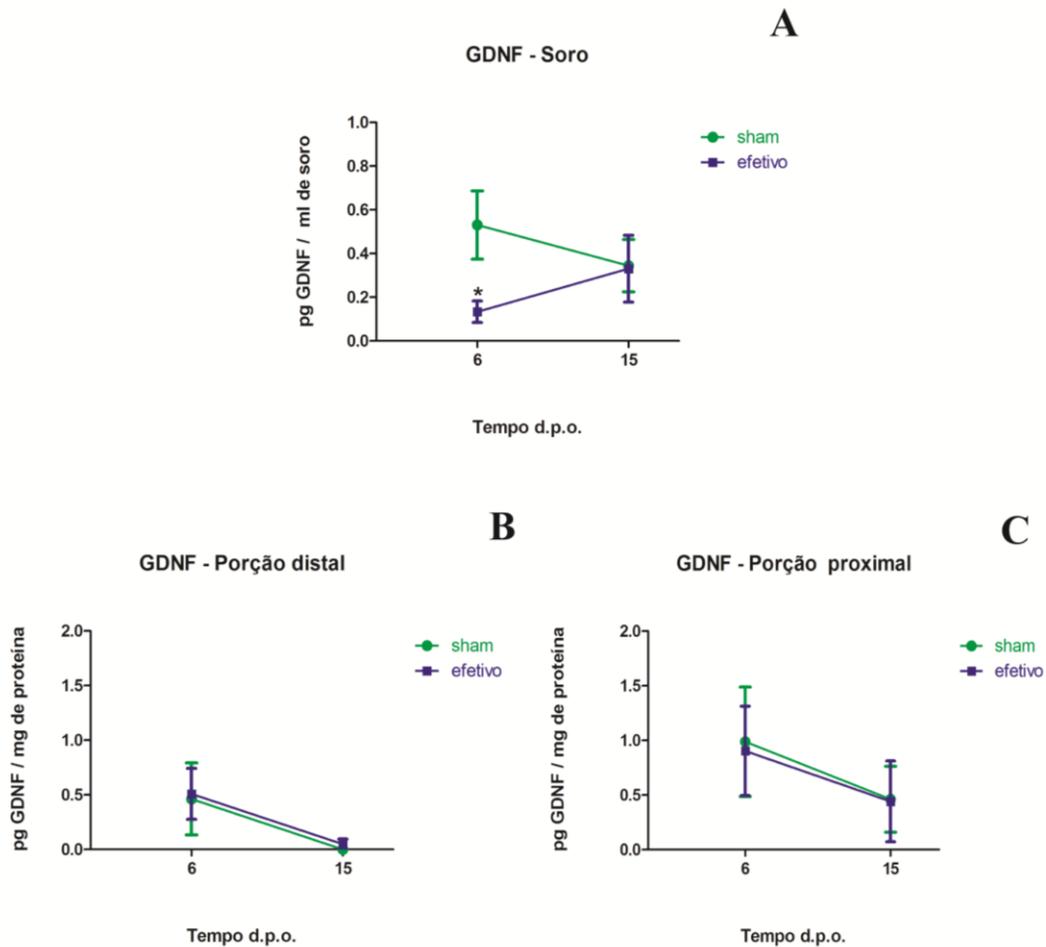


FIGURA 22: Dosagem de GDNF no soro (A) (pg de GDNF por ml de soro) e nas porções distal (B) e proximal (C) de nervos trigêmeo (pg de GDNF por mg de proteína) em animais sham e efetivos aos 6 e 15 d.p.o. N = 5 animais por grupo, teste t não pareado, $p < 0,05$.

6 – DISCUSSÃO

Nosso trabalho utiliza um modelo experimental bem estabelecido na literatura para tentar elucidar alterações morfológicas e expressão de mediadores subjacentes ao desenvolvimento da dor neuropática trigeminal ao longo do tempo. Apesar de diversos trabalhos terem demonstrado substrato morfológico e alterações em mediadores inflamatórios na sensibilização periférica e central nas dores neuropáticas (AUSTIN e MOALEM-TAYLOR, 2010; VALLEJO *et al.*, 2010; XU e YAKSH, 2011), não se sabe qual a cinética e a participação desses no desenvolvimento da dor neuropática trigeminal que possui, sabidamente, mecanismos patofisiológicos distintos à dor neuropática extracefálica (LATRÉMOLIÈRE *et al.*, 2008; HAMON *et al.*, 2008). Dessa forma, o presente trabalho, ao elucidar a cinética da lesão estrutural e dos sistemas de sinalização neuro-inflamatórios, visa contribuir para o esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento da dor neuropática trigeminal.

Avaliação comportamental espontânea:

Na avaliação comportamental espontânea, foram observados, além da frequência de *groomings*, outros parâmetros como o comportamento exploratório, a imobilidade e períodos de descanso / sono. Observamos que os animais efetivos apresentaram maior número de episódios de *grooming* facial em relação aos animais sham aos 3 d.p.o. e 15 d.p.o., o que está de acordo com a literatura. Vos e colaboradores descrevem que os animais efetivos apresentaram maior frequência de *grooming* se comparado aos sham, sobretudo na primeira semana (VOS *et al.*, 1994).

Com relação ao comportamento exploratório, animais efetivos apresentaram esse comportamento com mais frequência se comparados aos sham aos 3 d.p.o., mas não observamos diferenças entre os grupos nos demais tempos do estudo. Em contrapartida, Vos e colaboradores descrevem que os animais efetivos apresentam comportamento exploratório reduzido em relação ao sham (VOS *et al.*, 1994). Acreditamos que essa diferença não se apresenta relevante, uma vez que o tempo de 3 d.p.o. não corresponde ao período em que o quadro de dor neuropática está estabelecido. Outros comportamentos observados como imobilidade e descanso / sono não se mostraram diferentes entre os grupos de animais para nenhum dos tempos estudados. Vos e colaboradores não relataram diferenças entre os grupos na avaliação de períodos de descanso / sono, o que coincide com os nossos resultados. Porém, eles descrevem diferenças entre a imobilidade nos grupos,

sugerindo que os animais do grupo efetivo permaneceriam mais tempo imóveis que os animais sham (VOS *et al.*, 1994). Neste trabalho, encontramos, conforme mencionado, comportamento exploratório e mobilidade normais nos animais efetivos.

Avaliação comportamental evocada:

A cinética observada na análise do comportamento evocado com hiporresponsividade na primeira semana e hiperresponsividade num segundo momento pós operatório está de acordo com os dados observados em estudo anterior, que estabeleceu as alterações comportamentais após a CCI do nervo infraorbitário e permitiu sua utilização como modelo experimental de dor neuropática trigeminal (VOS *et al.*, 1994). Podemos, portanto, afirmar que nossos experimentos reproduziram o modelo já estabelecido na literatura.

Análise morfológica à microscopia óptica:

Os animais sham apresentaram algumas alterações histopatológicas, como inflamação leve no tecido conjuntivo adjacente e lesão axonal discreta, sobretudo em fascículos nervosos localizados periféricamente nos nervos. Esses achados sugerem lesões decorrentes de trauma mecânico em função do procedimento cirúrgico e foram de menor intensidade e abrangência do que as alterações observadas nos animais efetivos. Nossos resultados mostram também, que, ao longo do tempo, os animais sham se recuperaram das lesões enquanto animais efetivos apresentam lesões consideráveis, que se mantiveram significativamente mais pronunciadas durante todo o período avaliado.

Os animais efetivos apresentaram, na porção distal, alterações histopatológicas significativas em relação aos animais sham, evidenciando-se vacuolização axonal, presença de infiltrado inflamatório e aumento da celularidade nos fascículos nervosos. Na porção proximal, apesar de as alterações serem em menor grau do que na porção distal, foi possível observar aumento na celularidade, com aumento de células da glia em torno de neurônios e lesão axonal aos 9 d.p.o. nos animais efetivos em relação aos sham. Esses dados estão de acordo com dados já mostrados para o nervo ciático (GAUTRON *et al.*, 1990; NUYTEN *et al.*, 1992; GABAY e TAL, 2004) e estudos de CCI trigeminal (VIT *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2008) e apresentam relevância como eventos que levam ao desenvolvimento da dor. Acreditamos que a inflamação observada na porção distal seria decorrente da lesão nervosa causada pela CCI e que as células inflamatórias

presentes, assim como a própria lesão axonal, estariam atuando de diversas maneiras, como já descrito na literatura e detalhado a seguir.

A lesão do nervo produz alterações celulares e moleculares que afetam a excitabilidade da membrana neuronal, permitindo respostas exacerbadas (RO e CHANG 2005), e tais alterações podem comprometer porções centrais ou periféricas do sistema nervoso, levando às sensibilizações central e periférica, respectivamente (MOALEM e TRACEY, 2006). A perda de integridade da fibra nervosa pode gerar o fenômeno da transmissão efática ou excitação cruzada de fibras nervosas, que envolve a transmissão de potenciais de ação de fibras sensitivas periféricas aferentes lesionadas e hiperexcitáveis para fibras sensitivas adjacentes não estimuladas ou lesionadas, levando a uma expansão da área em que a dor é percebida (SUZUKI e DICKENSON, 2000). A lesão e inflamação subsequente leva à diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores por ação de produtos de reações inflamatórias e imunológicas, tais como bradicinina, prostaglandinas, serotonina e adenosina (JULIUS e BASBAUM, 2001). O aumento de bradicinina e adenosina podem levar a desgranulação de mastócitos presentes nos nervos periféricos, com liberação de grânulos de histamina e citocinas que excitam diretamente os nociceptores e células do gânglio da raiz dorsal, provocando dor e queimação (BARON *et al.*, 2001).

Em resposta à lesão pode ocorrer também o recrutamento de outros tipos celulares e a literatura descreve um provável papel inicial para os neutrófilos na dor neuropática seguida por lesão, já que foi observado um aumento de neutrófilos endoneurais em seções do nervo lesado até sete dias após a lesão (PERKINS e TRACEY, 2000). Já mastócitos e macrófagos podem ser os principais responsáveis pela liberação de TNF- α , IL-1 e NGF. A participação dos macrófagos nas fases iniciais e tardias do desenvolvimento da hiperalgesia térmica subsequente à CCI parece ser crucial (MARCHAND *et al.*, 2005). Sabe-se que a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β ocorre em nervos ciático lesados 1 hora após a CCI e esses mediadores atuam hiperexcitando a área lesionada (UCEYLER *et al.*, 2007). Além disso, as interações entre neurônios, células inflamatórias, células da glia, mediadores inflamatórios e neurofinas estão relacionados à sensibilização periférica nas DN (LASKIN e PENDINO, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001; AYDINLI e KESKINBORA, 2004; MOALEM e TRACEY, 2006).

Com base no exposto, portanto, acreditamos que a lesão nervosa observada no nosso modelo está mediando alterações na excitabilidade neuronal e facilitando a transmissão efática, hipóteses que poderiam ser testadas em estudos eletrofisiológicos posteriores. Da mesma maneira, há evidências que nos permitem sugerir que o processo inflamatório, suas células e mediadores estariam acarretando diminuição dos limiares de ativação de nociceptores e as sensibilizações periférica e central no modelo de CCI trigeminal.

Análise morfométrica da celularidade:

A análise morfométrica do número de células por área de fascículo nervoso evidenciou aumento da celularidade nas porções distal e proximal do nervo de animais efetivos ao longo do tempo. Em função desse aumento, foi realizada imuno-histoquímica para marcadores de células inflamatórias (CD68) e de células da glia (GFAP e S100), com o intuito de verificar o tipo celular aumentado. Não foi observada imunopositividade citoplasmática para CD68 (dado não mostrado), mas observamos imunoposição de GFAP e S100 em diversas células dos fascículos nervosos de animais efetivos, corroborando com outros estudos que demonstraram proliferação de células gliais satélite no gânglio trigeminal (VIT *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2011; DONEGAN *et al.*, 2013). Essa proliferação ocorre no momento em que as alterações comportamentais indicativas de dor neuropática estão se instalando e sabe-se que a lesão nervosa acarreta proliferação das células da glia (DONEGAN *et al.*, 2013; DEFRANCESCO-LISOWITZ *et al.*, 2014).

Estudos têm evidenciado a importância das células da glia do sistema nervoso central e, mais recentemente, as dos gânglios sensitivos nos mecanismos de dor, já que elas possuem a capacidade de se comunicar com os neurônios e de modular a sua atividade (MCMAHON e MALCANGIO, 2009; HANANI 2010). Sabe-se que, no gânglio do trigêmeo, as células da glia satélite possuem relação privilegiada com os corpos neuronais que as rodeiam (HANANI, 2005) e que podem modular a excitabilidade dos neurônios nociceptivos via IL-1 β , induzindo despolarização de membrana e aumento da expressão do receptor IL-1RI no corpo neuronal (TAKEDA *et al.*, 2007). Aumentos de junções gliais após a lesão do nervo também aumentam o comportamento nociceptivo, mas, paradoxalmente, a redução das junções em gânglios normais também aumenta o comportamento nociceptivo, revelando, portanto, as múltiplas funções desempenhadas pelas células da glia (VIT *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2008). Raghavendra e

colaboradores demonstraram que a inibição da ativação da glia atenuou o desenvolvimento de hipersensibilidade comportamental em modelo de dor neuropática em ratos (RAGHAVENDRA *et al.*, 2003). Outro fator de relevância da células da glia se refere à presença de canais iônicos específicos presentes neste tipo celular e que atuam na excitabilidade neuronal (OHARA, 2008). Nossa análise quantificou as células da glia no nervo, diferentemente dos autores citados, que analisaram as células da glia do gânglio trigeminal. Acreditamos que as células da glia no nervo periférico atuem de forma similar às do gânglio, já que também exercem funções protetoras e tróficas e responderam à lesão proliferando-se no grupo efetivo, tanto na porção distal quanto na porção proximal. Sugerimos, portanto, que a proliferação de células da glia periférica em nervo trigêmeo aqui evidenciada é importante na fisiopatologia da dor, uma vez que elas são capazes de secretar citocinas, remover debris de mielina degenerada e são essenciais para a reparação de nervos bem sucedida (DEFRANCESCO-LISOWITZ *et al.*, 2014).

Análise qualitativa das fibras mielínicas e amielínicas:

Nossas observações morfológicas referentes à mielinização revelaram desmielinização significativa e lesões intensas em fibras mielínicas na região distal e em regiões distais à mesma do nervo trigêmeo de ratos efetivos. A análise ultraestrutural revelou, na porção distal de animais efetivos, a formação de debris de mielina degenerada, severo desarranjo estrutural da bainha nos tempos de 6 d.p.o. e 15 d.p.o.. Alterações estruturais, porém mais discretas, também foram observadas nas fibras amielínicas, como a redução no tamanho das fibras, evidências de danos teciduais e um aumento no número de fibras por célula de Schwann nos animais efetivos. Esses achados estão de acordo com estudos de CCI do nervo ciático e estudos humanos de neuralgia trigeminal que mostraram perda de fibras mielinizadas distalmente à lesão como principal achado patológico (BASBAUM *et al.*, 1991; NUYTTEN *et al.*, 1992; MOSCONI e KRUGER, 1996). Estudos apontam que a principal patologia presente no modelo de CCI é a desmielinização intensa, com perda de fibras mielinizadas de grande calibre na região distal à lesão, sendo essa perda mais evidente nos dias 5 a 9 dias p.o., com recuperação parcial no tempo 12 a 15 d.p.o. (SOMMER, 1995; MA e BISBY, 2000; SHIMOYAMA *et al.*, 2002; GABAY e TAL 2004). Esses achados referem-se à CCI do nervo ciático, sendo que análise detalhada da desmielinização ao longo do tempo no modelo de CCI do nervo trigêmeo ainda não havia sido realizada. Dessa

forma, a avaliação de desmielinização ao longo do tempo em CCI do nervo trigêmeo é descrita pela primeira vez aqui.

As alterações nas fibras são responsáveis pela geração ectópica de potenciais de ação e facilitação da transmissão sináptica (COSTIGAN *et al.*, 2009). As áreas de desmielinização são locais de disparos ectópicos e espontâneos por acúmulo de canais iônicos e falhas nos mecanismos de isolamento da fibra (LOVE e COAKHAM, 2001). Em conjunto, as alterações observadas demonstram comprometimento estrutural importante com possíveis repercussões na geração e condução de impulsos nervosos e desenvolvimento de alodínia, o que tem particular importância na neuralgia do trigêmeo, sobretudo porque as alterações aqui descritas ocorrem em tempos coincidentes com o início das alterações comportamentais indicativas de alodínia.

Análise quantitativa da desmielinização:

A quantificação da desmielinização observada revelou significativa diminuição na porção distal de animais efetivos em relação aos sham, corroborando nossos achados qualitativos. Mosconi e Kruger (1996) sugeriram a desmielinização e remielinização em CCI do ciático e parece que este é o caso também para a CCI do trigêmeo, já que observamos razão axônio/mielina mais elevada em animais efetivos em comparação aos sham aos 6 d.p.o.. Portanto, é possível que a recuperação na proporção axônio/mielina ao longo do tempo mostre indiretamente que a remielinização ocorre do dia 6 ao dia 15 p.o., quando a alodínia mecânica está bem estabelecida. Como já mencionado, as áreas de desmielinização geram disparos ectópicos e espontâneos, o que tem particular importância na alodínia (LOVE e COAKHAM, 2001). Além disso, a justaposição de axônios desmielinizados facilita a transmissão efática de impulsos nervosos (RAMON e MOORE, 1978; RASMINSKY, 1978). Nossos dados corroboram a hipótese da excitação cruzada de fibras nervosas, uma vez que fibras de tato podem ser envolvidas na regeneração da bainha juntamente com fibras nociceptivas e a ativação da fibra tátil pode disparar a ativação da fibra de dor, justificando a alodínia observada e contribuindo para o esclarecimento da fisiopatologia da dor neuropática trigeminal (LOVE e COAKHAM, 2001).

Análise quantitativa de fibras amielínicas:

Apesar de a análise qualitativa ter evidenciado feixes de fibras amielínicas com maior número de fibras por feixe, como já descrito para o nervo ciático (NUYTEN *et al.*, 1992), nossa análise morfométrica não detectou tal diferença. Foi sugerido que a hiperinervação por fibras amielínicas pode produzir hiperalgesia em função de descargas ectópicas (MOSCONI e KRUGER, 1996). Esses impulsos ectópicos, somados à aposição entre axônios desmielinizados, levaria à transmissão efática de impulsos nervosos para fibras adjacentes, contribuindo para a manifestação da dor neuropática (RAMON e MOORE, 1978; RASMINSKY, 1978; LOVE e COAKHAM, 2001). No nosso modelo, é possível que as fibras amielínicas não exerçam papel tão relevante, já que não observamos, quantitativamente, o aumento de fibras por feixe. No entanto, as alterações fisiológicas não podem ser descartadas.

Expressão da citocina IL-1 β e do neuropeptídeo SP:

Sabe-se que a dor neuropática não é um fenômeno exclusivamente neuronal, mas envolve células inflamatórias, células da glia, mediadores inflamatórios, neuropeptídeos e fatores neurotróficos (MACHELSKA, 2011). Trabalhos anteriores já sugeriram importante papel para a citocina IL-1 β em diversas neuropatias periféricas (HILTON *et al.*, 1994; TAKEDA *et al.*, 2008; BAŁKOWIEC-ISKRA, 2010; DE CORATO, 2011). Observamos maior quantidade de células imunopositivas para IL-1 β em tempos mais tardios na porção distal e em tempos mais recentes na porção proximal dos animais efetivos. Algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , são capazes de sensibilizar neurônios nociceptivos, podendo, assim, modular a resposta inflamatória e influenciar o comportamento doloroso (BAŁKOWIEC-ISKRA, 2010). A liberação de IL-1 β parece ser importante para o estabelecimento da hiperalgesia trigeminal inflamatória (TAKEDA *et al.*, 2013). A imunopositividade de IL-1 β em neurônios observada aqui está em conformidade com a expressão desta citocina em neurônios do gânglio da raiz dorsal (COPRAY *et al.*, 2001) e mostra a resposta precoce de neurônios trigeminais à lesão periférica, como tem sido demonstrado em outros modelos de lesão nervosa (BOUTIN *et al.*, 2003; ALLAN *et al.*, 2005). A IL-1 β tem numerosos efeitos sobre as células da glia, promovendo sua proliferação e modulando a expressão e liberação de vários mediadores neurotóxicos ou potencialmente benéficos (ALOISI, 2001; BASU *et al.*, 2004;). Em geral, a consequência da exposição de neurônios a níveis elevados de IL-1 β depende do equilíbrio e perfil temporal entre as moléculas produzidas pelas células da glia (ALLAN *et al.*, 2005). A IL-1 também pode afetar a

mielinização e atrasar a remielinização (MASON *et al.*, 2001). Os dados aqui obtidos permitem sugerir que a IL-1 β participa dos sistemas de sinalização envolvidos na sensibilização periférica e no desenvolvimento da dor neuropática do trigêmeo provavelmente por um dos mecanismos descritos acima. Estudos posteriores de bloqueio de IL-1 β endógena ou de injeção de IL-1 β exógena poderão esclarecer quais mecanismos estariam operantes no estabelecimento da dor neuropática neste modelo.

Com relação ao neuropeptídeo SP, foi observada maior imunopositividade nos animais efetivos em relação aos sham apenas na porção distal. Nosso resultado entra em contraste com resultados de Bird *et al.* (2002) que relatou grande imunopositividade de SP no gânglio trigeminal até 15 dias após outro modelo do CCI trigeminal (ligadura com constrição intensa do nervo alveolar inferior) (BIRD *et al.*, 2002). Acreditamos que a diferença seja devido à lesão gerada pela ligadura intensa, em contraste com a ligadura frouxa no modelo de CCI. Sommer e colaboradores (1995) observaram queda nos níveis de expressão de SP nas quatro primeiras semanas após a CCI do nervo ciático e sugerem que essa redução não é específica do modelo, mas sim um evento geral decorrente do processo de despolarização e regeneração do nervo lesado (SOMMER, 1995). Outros estudos também encontraram uma diminuição na expressão de SP no corno dorsal da medula espinhal de ratos em modelos de CCI do nervo ciático (GARRISON *et al.*, 1993; KAJANDER e XU, 1995; ABBADIE *et al.*, 1996). Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com o apresentado nesses estudos, uma vez que encontramos baixa expressão de SP no gânglio trigeminal. No entanto, encontramos uma relação significativa entre a presença de alodínia e expressão de SP na porção distal do nervo, com níveis mais elevados no pós-operatório tardio, quando é observado aumento nas respostas a estímulos mecânicos. Este resultado está em concordância com forte imunopositividade para SP observada nas amostras do nervo trigêmeo obtidos de pacientes com neuralgia do trigêmeo (MARINKOVIĆ *et al.*, 2009). Diversos trabalhos vêm apontando a relevância da SP no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Alguns destes trabalhos sugerem que a SP liberada nas terminações nervosas está diretamente relacionada à dor e desempenha um papel importante na inflamação. Concomitantemente, a inflamação periférica pode desencadear a liberação de SP, diminuindo o limiar da dor e resultando em alodínia (BIE e ZHAO, 2011, MUNOZ e COVENAS, 2014; WITT e VILENSKY, 2014). Sendo assim, é possível que a alodínia induzida pela lesão esteja associada com a reorganização neuroquímica nos aferentes primários e que o acúmulo de SP pode estar

relacionado ao desenvolvimento da atividade neural ectópica, como demonstrado para a CCI do ciático e para um outro modelo de CCI trigeminal (CAMERON *et al.*, 1997; BIRD *et al.*, 2002).

Dosagem de NGF:

Várias desordens dolorosas estão associadas com a desregulação do NGF, incluindo a dor neuropática (EIBL *et al.*, 2012). Neste trabalho, a dosagem de NGF no soro ou nos tecidos nervosos não evidenciou diferenças entre os grupos nos tempos estudados.

Kurata e colaboradores sugerem que a lesão de nervo periférico pode induzir a transdução de sinal dos neurônios para células da glia satélites, induzindo a expressão de NGF em torno dos corpos neuronais com possível envolvimento desse fator na restauração de neurônios danificados (KURATA *et al.*, 2013). No entanto, outros autores sugerem que o NGF pode atuar nos dois sentidos. Por um lado, contribuindo para a regeneração de neurônios lesados e, por outro, causando a sensibilização dos nociceptores de maneira direta pela interação com receptores específicos e, indiretamente, pela ativação de células pró-inflamatórias (HORIGOME *et al.*, 1993; WOOLF *et al.*, 1995; MCMAHON *et al.*, 2005). Anderson e Rao (2001) verificaram aumento nos níveis de NGF no nervo trigêmeo de 1 a 10 dias após a CCI, sendo que essa alteração foi relacionada à diminuição significativa na sensibilidade mecânica (ANDERSON e RAO, 2001). Apesar de nossos achados não terem sido semelhantes aos de Anderson e Rao, níveis de NGF no gânglio trigeminal não havia sido medidos anteriormente. Embora não tenha sido possível correlacionar níveis de NGF ao comportamento de dor observado, tem sido demonstrado que a infusão de NGF no local da lesão bloqueia o desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia (REN *et al.*, 1995). Recentemente, foi demonstrado que o aumento de NGF não provoca hiperalgesia após CCI de um outro ramo do nervo trigeminal (nervo mental). O desenvolvimento da hiperalgesia ao frio não se correlacionou com a expressão alterada de NGF, sendo que esta ocorreu apenas em momentos posteriores, quando não foi detectada evidência comportamental de dor neuropática (EVANS *et al.*, 2014). Esses dados vão de encontro aos nossos, com ausência de correlação entre níveis alterados de NGF e quadros de dor. Uma vez que esta neurotrofina é conhecida por alterar a síntese de neuropeptídeos em nociceptores (LINDSAY e HARMAR, 1989), poderíamos esperar uma correlação entre a maior expressão de SP e um aumento dos níveis de NGF distalmente à lesão no grupo efetivo, mas isso não foi encontrado. Nossos dados e a literatura demonstram que os efeitos do NGF após a lesão do nervo são

complexos, não se correlacionam diretamente à dor e dependem da concentração, do tempo e do modelo experimental.

Dosagem do GDNF:

Sabe-se que o GDNF possui papel crucial nos mecanismos de sobrevivência e plasticidade neuronal em resposta a injúrias e no reparo de lesões nervosas no nervo ciático, além de possuir um papel regulador na atividade de vias nociceptivas (AIRAKSINEN e SAARMA 2002; NAGANO *et al.*, 2003; OSSIPOV 2011; EIBL *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que os animais efetivos apresentaram níveis séricos de GDNF significativamente inferiores aos animais sham no período pós operatório recente. Podemos inferir que há uma disfunção na síntese e / ou sinalização de GDNF no grupo efetivo e que essa alteração pode contribuir para o desenvolvimento e / ou manutenção da dor neuropática trigeminal, sugerindo um efeito protetor do GDNF. Com relação à dosagem tecidual do GDNF, poderíamos supor expressão significativa desse fator neurotrófico, em função da proliferação de células da glia observada. Além disso, a elevada expressão de IL-1 β nos animais efetivos poderia ter influenciado a síntese de GDNF, uma vez que esta citocina altera a expressão de genes que codificam fatores neurotróficos (JOHN *et al.*, 2005; ALLAN *et al.*, 2005). No entanto, dosagens teciduais significativas de GDNF nos animais efetivos não foi observada. Nossos resultados estão de acordo com outro estudo em modelo de CCI no nervo ciático em que níveis de GDNF no gânglio dorsal da raiz diminuem acentuadamente no 7º dia após a operação e se mantêm baixos até o 14º d.p.o. (NAGANO 2003). As alterações comportamentais indicativas de dor neuropática também foram correlacionadas à perda de GDNF no coto distal do nervo ciático de animais submetidos à CCI (SHI *et al.*, 2011). Contrariamente, o GDNF pode aumentar a excitabilidade de neurônios nociceptivos no gânglio trigeminal (TAKEDA *et al.*, 2013). Assim como o NGF, o GDNF parece ter funções antagônicas nos mecanismos de proteção e lesão que são subjacentes aos quadros de dor.

7 - CONCLUSÕES

Com o presente estudo concluímos que as principais alterações teciduais relacionadas ao desenvolvimento da dor no modelo de dor neuropática trigeminal utilizado são as lesões axonais, o aumento da celularidade por proliferação de células da glia periféricas, a desmielinização intensa, bem como a remielinização parcial. Estas alterações estão implicadas nos mecanismos de sensibilizações periférica e central de dores neuropáticas. Além disso, nossos resultados sugerem papel importante dos mediadores IL-1 β e SP e da disfunção na produção de GDNF no desenvolvimento da dor ao longo do tempo, contribuindo para o entendimento dos fenômenos teciduais que levam ao estabelecimento e à manutenção da dor neuropática do nervo trigêmeo.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADIE, C.; BROWN, J. L.; MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. **Neuroscience**, v.70, n.1, Jan, p.201-9. 1996.
- AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci**, v.3, n.5, May, p.383-94. 2002.
- ALLAN, S. M.; TYRRELL, P. J.; ROTHWELL, N. J. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.8, Aug, p.629-40. 2005.
- ALMEIDA, I. C. G. B., *et al.* Chronic low back pain prevalence in the population of the city of Salvador. **Rev bras ortop**, v.43, n.3, p.96-102. 2008.
- ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v.36, n.2, Nov, p.165-79. 2001.
- ANDERSON, L. C.; RAO, R. D.. Interleukin-6 and nerve growth factor levels in peripheral nerve and brainstem after trigeminal nerve injury in the rat. **Arch Oral Biol**, v.46, n.7, Jul, p.633-40. 2001.
- APFEL, S. C.; KESSLER, J. A.; ADORNATO, B. T.; LITCHY, W. J.; SANDERS, C.; RASK, C. A. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. NGF Study Group. **Neurology**, v.51, n.3, Sep, p.695-702. 1998.
- AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J Neuroimmunol**, v.229, n.1-2, p.26-50. 2010.
- AYDINLI, I.; KESKINBORA, K. New immune system approach to pain pathology--interaction with the sensory system. **Agri**, v.16, n.2, Apr, p.7-16. 2004.
- BALKOWIEC-ISKRA, E. The role of immune system in inflammatory pain pathophysiology. **Pol Merkur Lekarski**, v.29, n.174, p.395-9. 2010.
- BARON, R.; SCHWARZ, K.; KLEINERT, A.; SCHATTSCHNEIDER, J. WASNER, G. Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. **Neuroreport**, v.12, n.16, p.3475-8. 2001.
- BASBAUM, A. I.; GAUTRON, M.; JAZAT, F.; MAYES, M.; GUILBAUD, G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. **Pain**, v.47, n.3, Dec, p.359-67. 1991.
- BASU, A.; KRADY, J. K.; LEVISON, S. W. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. **J Neurosci Res**, v.78, n.2, Oct 15, p.151-6. 2004.
- BENNETT, G. J.; XIE Y. K.. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v.33, n.1, p.87-107. 1988

- BENNETTO, L.; PATEL, N. K.; FULLER, G. Trigeminal neuralgia and its management. **Bmj**, v.334, n.7586, Jan 27, p.201-5. 2007.
- BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; IADAROLA, M. J. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? **Pain**, v.91, n.1-2, Mar, p.111-21. 2001.
- BIE, B.; ZHAO, Z. Q. Peripheral inflammation alters desensitization of substance P-evoked current in rat dorsal root ganglion neurons. **Eur J Pharmacol**, v.670, n.2-3, Nov 30, p.495-9. 2011.
- BIRD, E. V.; LONG, A.; BOISSONADE, F. M.; FRIED, K.; ROBINSON, P. P. Neuropeptide expression following constriction or section of the inferior alveolar nerve in the ferret. **J Peripher Nerv Syst**, v.7, n.3, Sep, p.168-80. 2002.
- BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N., *et al.* Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). **Pain**, v.114, n.1-2, Mar, p.29-36. 2005.
- BOUTIN, H.; KIMBER, I.; ROTHWELL, N. J.; PINTEAUX, E. The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain? **Mol Neurobiol**, v.27, n.3, Jun, p.239-48. 2003.
- BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Mol Neurobiol**, v.27, n.3, p.277-323. 2003.
- BUNGE, M. B.; BUNGE, R. P.; RIS, H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. **J Biophys Biochem Cytol**, v.10, n.1, p. 67-94, 1961.
- CAMERON, A. A., *et al.* Time course of degenerative and regenerative changes in the dorsal horn in a rat model of peripheral neuropathy. **J Comp Neurol**, v.379, n.3, Mar 17, p.428-42. 1997.
- CHEN, M. J., *et al.* Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. **Glia**, v.60, n.11, Nov, p.1660-70. 2012.
- CHESHIRE, W. P. Trigeminal neuralgia: for one nerve a multitude of treatments. **Expert Rev Neurother**, v.7, n.11, Nov, p.1565-79. 2007.
- COPRAY, J. C., *et al.* Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **J Neuroimmunol**, v.118, n.2, Aug 30, p.203-11. 2001.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J., *et al.* Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v.32, p.1-32. 2009.
- DAEMEN, M. A., *et al.* Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain. **Neurol Res**, v.20, n.1, Jan, p.41-5. 1998.

- DE CORATO, A.; LISI, L., *et al.* Trigeminal satellite cells express functional calcitonin gene-related peptide receptors, whose activation enhances interleukin-1beta pro-inflammatory effects. **J Neuroimmunol**, v.237, n.1-2, Aug 15, p.39-46. 2011.
- DEFRANCESCO-LISOWITZ, A.; LINDBORG, J. A., *et al.* The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**, Sep 19. 2014.
- DIEB, W.; HAFIDI, A. Astrocytes are involved in trigeminal dynamic mechanical allodynia: potential role of D-serine. **J Dent Res**, v.92, n.9, Sep, p.808-13. 2013.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, n.6, Mar 15, p.2095-147. 1996.
- DONEGAN, M.; KERNISANT, M., *et al.* Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve. **Glia**, v.61, n.12, Dec, p.2000-8. 2013.
- EBNER, F. H; TATAGIBA, M; ROSER, F. Familial trigeminal neuralgia-Microsurgical experience and psychological observations. **Acta Neurochirurgica**, v.152, n.2, p.381-382. 2010.
- EIBL, J. K.; STRASSER, B. C.; ROSS, G. M. Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor. **Neurochem Int**, v.61, n.8, Dec, p.1266-75. 2012.
- ESKANDAR, E.; BARKER, F. G.; RABINOV, J. D. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 21-2006. A 61-year-old man with left-sided facial pain. **N Engl J Med**, v.355, n.2, Jul 13, p.183-8. 2006.
- EVANS, L. J., LOESCHER, A. R., *et al.* Temporal mismatch between pain behaviour, skin Nerve Growth factor and intra-epidermal nerve fibre density in trigeminal neuropathic pain. **BMC Neurosci**, v.15, p.1. 2014.
- FONTES, K. B.; JAQUES A. E. O papel da enfermagem frente ao monitoramento da dor como 5º sinal vital. **Cienc Cuid Saude**, v.6, p.481-487. 2008.
- FRIED, K.; BONGENHIELM, U., *et al.* Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist**, v.7, n.2, Apr, p.155-65. 2001.
- FRIZZO, H. M.; HASSE, P. N.; VERONESE, R. M. Neuralgia do Trigêmeo :revisa bibliográfica analítica. **Rev cir traumatol buco-maxilo-fac** Recife,v.4,n.4, p. 212 - 217, out/dez – 2004.
- GABAY, E.; TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, v.110, n.1-2, Jul, p.354-60. 2004.
- GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; CARLTON, S. M. Quantitative analysis of substance P and calcitonin gene-related peptide immunohistochemical staining in the dorsal horn of neuropathic MK-801-treated rats. **Brain Res**, v.607, n.1-2, Apr 2, p.205-14. 1993.

GAUTRON, M., JAZAT, F., *et al.* Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. **Neurosci Lett**, v.111, n.1-2, Mar 26, p.28-33. 1990.

GRONSETH, G.; CRUCCU, G., *et al.* Practice parameter: the diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies. **Neurology**, v.71, n.15, Oct 7, p.1183-90. 2008.

GUO, W.; WANG, H., *et al.* Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. **J Neurosci**, v.27, n.22, May 30, p.6006-18. 2007.

HAMON, M.; KAYSER, V.; BOURGOIN, S. Neuropathic pain. Physiopathological mechanisms and therapeutic perspectives. **Bull Acad Natl Med**, v.192, n.5, May, p.921-6; discussion 926-8. 2008.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res Brain Res Rev**, v.48, n.3, Jun, p.457-76. 2005.

HANANI, M. Satellite glial cells: more than just 'rings around the neuron. **Neuron Glia Biol**, v.6, n.1, Feb, p.1-2. 2010.

HARRISON, S.; GEPPETTI P. Substance p. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33, n.6, Jun, p.555-76. 2001.

HARSTALL, C.; OSPINA M. How prevalent is chronic pain. **Pain Clinical Updates**, v.11, n.2, p.1-4. 2003.

HILTON, D. A.; LOVE, S.; GRADIDGE, T.; COAKHAM, H. B. Pathological findings associated with trigeminal neuralgia caused by vascular compression. **Neurosurgery**, v.35, n.2, Aug, p.299-303; discussion 303. 1994.

HORIGOME, K.; PRYOR, J. C.; BULLOCK, E. D.; JOHNSON, E. M. JR. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. **J Biol Chem**, v.268, n.20, Jul 15, p.14881-7. 1993.

IBRAHIM, S. Trigeminal neuralgia: diagnostic criteria, clinical aspects and treatment outcomes. A retrospective study. **Gerodontology**, v.31, n.2, Jun, p.89-94. 2014.

ICHD-II. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. **Cephalalgia**, v.24 Suppl 1, p.9-160. 2004.

IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Exp Brain Res**, v.116, n.1, Aug, p.97-103. 1997.

IASP. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. ISSN 978-0-931092-05-3. 2011.

- JOHN, G. R.; LEE, S. C., *et al.* IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. **Glia**, v.49, n.2, Jan 15, p.161-76. 2005.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.
- KAJANDER, K. C.; XU J. Quantitative evaluation of calcitonin gene-related peptide and substance P levels in rat spinal cord following peripheral nerve injury. **Neurosci Lett**, v.186, n.2-3, Feb 17, p.184-8. 1995.
- KATUSIC, S.; WILLIAMS, D. B., *et al.* Epidemiology and clinical features of idiopathic trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia: similarities and differences, Rochester, Minnesota, 1945-1984. **Neuroepidemiology**, v.10, n.5-6, p.276-81. 1991.
- KIM, K. H.; KIM, J. I.; HAN, J. A.; CHOE, M. A.; AHN, J. H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v.190, Sep 8, p.367-78. 2011.
- KLUVER, H.; BARRERA E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.12, n.4, Oct, p.400-3. 1953.
- KRAFFT, R. M. Trigeminal neuralgia. **Am Fam Physician**, v.77, n.9, May 1, p.1291-6. 2008.
- KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L., *et al.* Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Rev Bras Anestesiol**, v.58, p.492-505. 2008.
- KURATA, S., GOTO, T., *et al.* Nerve Growth Factor Involves Mutual Interaction between Neurons and Satellite Glial Cells in the Rat Trigeminal Ganglion. **Acta Histochem Cytochem**, v.46, n.2, Apr 30, p.65-73. 2013.
- LASKIN, D. L.; PENDINO K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.35, p.655-77. 1995.
- LATREMOLIERE, A., MAUBORGNE, A., *et al.* Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. **J Neurosci**, v.28, n.34, Aug 20, p.8489-501. 2008.
- LEE, S.; ZHANG J. Heterogeneity of macrophages in injured trigeminal nerves: cytokine/chemokine expressing vs. phagocytic macrophages. **Brain Behav Immun**, v.26, n.6, Aug, p.891-903. 2012.
- LINDSAY, R. M.; HARMAR A. J. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. **Nature**, v.337, n.6205, Jan 26, p.362-4. 1989.
- LOVE, S.; COAKHAM. H. B. Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis. **Brain**, v.124, n.Pt 12, Dec, p.2347-60. 2001.

- MA, W.; BISBY M. A. Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial sciatic nerve injuries. **J Neurocytol**, v.29, n.4, Apr, p.249-62. 2000.
- MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A., *et al.* Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol Ther.**, v.75, n.1, p.1-19. 1997.
- MACHELSKA, H. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.59, n.1, Feb, p.11-24. 2011.
- MANZONI, G. C.; TORELLI, P. Epidemiology of typical and atypical craniofacial neuralgias. **Neurol Sci**, v.26 Suppl 2, May, p.s65-7. 2005.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M., *et al.* Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v.6, n.7, Jul, p.521-32. 2005.
- MARINKOVIC, S.; GIBO, H., *et al.* Ultrastructure and immunohistochemistry of the trigeminal peripheral myelinated axons in patients with neuralgia. **Clin Neurol Neurosurg**, v.111, n.10, Dec, p.795-800. 2009.
- MARTIN, Y. B., *et al.* Uncovering new pharmacological targets to treat neuropathic pain by understanding how the organism reacts to nerve injury. **Curr Pharm Des**. 17(5): 434-48. 2001.
- MASON, J. L.; SUZUKI, K., *et al.* Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. **J Neurosci**, v.21, n.18, Sep 15, p.7046-52. 2001.
- MCDERMOTT, A. M.; TOELLE, T. R., *et al.* The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. **Eur J Pain**, v.10, n.2, Feb, p.127-35. 2006.
- MCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B., *et al.* Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v.192, n.2, Apr, p.444-62. 2005.
- MCMAHON, S. B.; MALCANGIO, M. Current challenges in glia-pain biology. **Neuron**, v.64, n.1, Oct 15, p.46-54. 2009.
- MCNALLY, G. P. Pain facilitatory circuits in the mammalian central nervous system: their behavioral significance and role in morphine analgesic tolerance. **Neurosci Biobehav Rev**, v.23, n.8, Dec, p.1059-78. 1999.
- MATTOS, J. M. B.; BUENO, F. V.; MATTOS, L. R. Neuralgia do Trigêmeo: Um novo protocolo de tratamento clínico. **Revista Dor**, v. 6, n. 4, p. 652-656, 2005.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain, Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd Ed. Seattle: ASP Press, Seattle. 1994.
- MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev**, v.51, n.2, Aug, p.240-64. 2006.

- MOSCONI, T.; KRUGER L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. **Pain**, v.64, n.1, Jan, p.37-57. 1996.
- MUNOZ, M.; COVENAS, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. **Amino Acids**, v.46, n.7, Jul, p.1727-50. 2014.
- MURRAY, B. Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma. In: BRADLEY, W. G. et al. (Ed.). *Neurology in Clinical Praticce: Principles of diagnosis and management*. 4. ed. London: Butterworth Heinemann, 2005. p. 1179-1198.
- NAGANO, M.; SAKAI, A., *et al.* Decreased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in rat models of neuropathic pain. **Br J Pharmacol**, v.140, n.7, Dec, p.1252-60. 2003.
- NUYTEN, D.; KUPERS, R., *et al.* Further evidence for myelinated as well as unmyelinated fibre damage in a rat model of neuropathic pain. **Exp Brain Res**, v.91, n.1, p.73-8. 1992.
- OHARA, P. T.; VIT, J. P., *et al.* Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. **J Neurophysiol**, v.100, n.6, Dec, p.3064-73. 2008.
- OSSIPOV, M. H. Growth factors and neuropathic pain. **Curr Pain Headache Rep**, v.15, n.3, Jun, p.185-92. 2011.
- PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v.101, n.3, p.745-57. 2000.
- PERRY, V. H.; BROWN, M. C., *et al.* The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. **J Exp Med**, v.165, n.4, Apr 1, p.1218-23. 1987.
- PETRUSKA, J. C.; MENDELL, L. M. The many functions of nerve growth factor: multiple actions on nociceptors. **Neurosci Lett**, v.361, n.1-3, May 6, p.168-71. 2004.
- RAEBURN, C. D.; SHEPPARD, F., *et al.* Cytokines for surgeons. **Am J Surg**, v.183, n.3, Mar, p.268-73. 2002.
- RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F., *et al.* Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther**, v.306, n.2, Aug, p.624-30. 2003.
- RAMON, F.; MOORE, J. W. Ephaptic transmission in squid giant axons. **Am J Physiol**, v.234, n.5, May, p.C162-9. 1978.
- RASMINSKY, M. Ectopic generation of impulses and cross-talk in spinal nerve roots of "dystrophic" mice. **Ann Neurol**, v.3, n.4, Apr, p.351-7. 1978.

REN, K.; THOMAS, D. A., *et al.* Nerve growth factor alleviates a painful peripheral neuropathy in rats. **Brain Res**, v.699, n.2, Nov 20, p.286-92. 1995.

RIBEIRO, N. C. A., *et al.* O enfermeiro no cuidado à vítima de trauma com dor: o quinto sinal vital. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, v.45, n.1,p.146-152,2011.

RO, L. S.; CHANG K. H. Neuropathic pain: mechanisms and treatments. **Chang Gung Med J**, v.28, n.9, Sep, p.597-605. 2005.

ROTHWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends Pharmacol Sci**, v.12, n.11, Nov, p.430-6. 1991.

SEBBEN, A. D.; COCOLICHIO, F., *et al.* Effect of neurotrophic factors on peripheral nerve repair. **Rev bras ortop**, v.21, n.2, p.81-89. 2011.

SCHERER, S. S.; SALZER, J. L. Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: Jessen KR, Richardson WD, editors. *Glial cell development* 2nd ed. New York: Oxford: University Press;. p. 299-330. 2001.

SHI, J. Y.; LIU, G. S.; LIU, L. F., *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer exerts protective effect on axons in sciatic nerve following constriction-induced peripheral nerve injury. **Hum Gene Ther**, v.22, n.6, Jun, p.721-31. 2011.

SHIMOYAMA, M.; TANAKA, K., *et al.* A mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v.99, n.1-2, Sep, p.167-74. 2002.

SMITH, H.; JOINT, C., *et al.* Motor cortex stimulation for neuropathic pain. **Neurosurg Focus**, v.11, n.3, p.E2. 2001.

SMITH, K. J.; MCDONALD W. I. Spontaneous and mechanically evoked activity due to central demyelinating lesion. **Nature**, v.286, n.5769, Jul 10, p.154-5. 1980.

SOMMER, C.; MYERS R. R. Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. **Acta Neuropathol**, v.90, n.5, p.478-85. 1995.

SUZUKI, R.; DICKENSON A. H. Neuropathic pain: nerves bursting with excitement. **Neuroreport**, v.11, n.12, Aug 21, p.R17-21. 2000.

TAKEDA, M.; TAKAHASHI, M., *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates the excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons via a paracrine mechanism following inflammation. **Brain Behav Immun**, v.28, Feb, p.100-7. 2013.

TAKEDA, M.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, S. Contribution of activated interleukin receptors in trigeminal ganglion neurons to hyperalgesia via satellite glial interleukin-1beta paracrine mechanism. **Brain Behav Immun**, v.22, n.7, Oct, p.1016-23. 2008.

- TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; KADOI, J., *et al.* Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. **Pain**, v.129, n.1-2, May, p.155-66. 2007.
- TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N., *et al.* Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v.70, n.18, Apr 29, p.1630-5. 2008.
- UCEYLER, N.; TSCHARKE, A.; SOMMER, C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. **Brain Behav Immun**, v.21, n.5, Jul, p.553-60. 2007.
- VALLEJO, R.; TILLEY, D. M.; VOGEL, L.; BENYAMIN, R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Pract**, v.10, n.3, May-Jun, p.167-84. 2010.
- VIT, J. P.; JASMIN, L.; BHARGAVA, A.; OHARA, P. T. Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. **Neuron Glia Biol**, v.2, n.4, Nov, p.247-57. 2006.
- VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **J Neurosci**, v.14, n.5 Pt 1, May, p.2708-23. 1994.
- WAKISAKA, S.; SASAKI, Y.; KURISU, K. Temporal analysis of neuropeptide Y expression in the rat trigeminal ganglion following peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve. **Neurosci Lett**, v.188, n.1, Mar 16, p.49-52. 1995.
- WITT, K. L.; VILENSKY, J. A. The anatomy of osteoarthritic joint pain. **Clin Anat**, v.27, n.3, Apr, p.451-4. 2014.
- WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B., *et al.* Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behav Immun**, v.22, n.7, Oct, p.1072-7. 2008.
- WOOLF, C. J. Somatic pain-pathogenesis and prevention. **Br J Anaesth**, v.75, n.2, Aug, p.169-76. 1995.
- WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol Dis**, v.7, n.5, Oct, p.504-10. 2000.
- XU, Q.; YAKSH T. L. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. **Curr Opin Anaesthesiol**, v.24, n.4, Aug, p.400-7. 2011.
- ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v.45, n.2, Spring, p.27-37. 2007.

ZHENG, X. F.; LI, B.; ZHANG, Y. H., *et al.* Blockade of substance P receptor attenuates osteoporotic pain, but not bone loss, in ovariectomized mice. **Menopause**, v.20, n.10, Oct, p.1074-83. 2013.

ZOCHODNE, D. W.; LEVY D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. **Cell Mol Biol** (Noisy-le-grand), v.51, n.3, Sep 5, p.255-67. 2005.

9 – ANEXOS

Anexo 1 – Certificado do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 231/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Alterações histopatológicas e expressão de neuropeptídeos e mediadores inflamatórios no nervo trigêmeo e gânglio trigeminal ao longo do tempo em modelo de dor neuropática trigeminal em ratos*", que tem como responsável(is) **Camila Megale de Almeida Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **24/ 02/2010**.

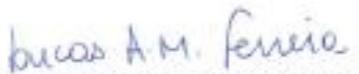
Este certificado expira-se em **24/ 02/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 231/2009**, related to the project entitled "*Histopathological analysis and expression of neuropeptides and inflammatory mediators in trigeminal nerve and ganglion along time in a model of neuropathic pain in rats*", under the supervisors of **Camila Megale de Almeida Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 24, 2010**.

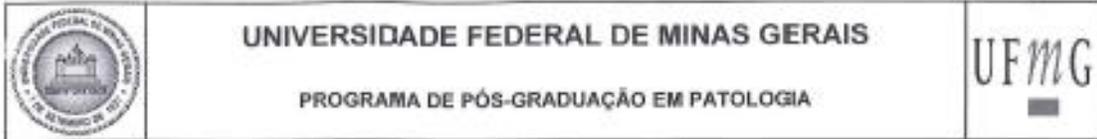
This certificate expires in **February 24, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Março de 2010.


 Prof. Humberto Pereira Oliveira
 Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2 – Declaração de aprovação.



FOLHA DE APROVAÇÃO

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS, DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA CITOCINA INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β), DO NEUROPEPTÍDEO SUBSTÂNCIA P (SP) E DOS FATORES NEUROTRÓFICOS FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF) E FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DA GLIA (GDNF) AO LONGO DO TEMPO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA DO NERVO TRIGÊMEO.

GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA

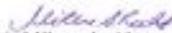
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



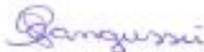
Prof(a). Camila Megale de Almeida Leite - Orientador

UFMG



Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid

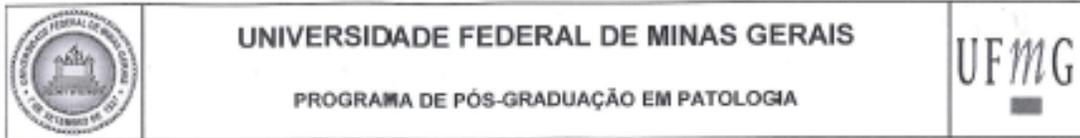
UFMG



Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu
UFOP

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015.

Anexo 3 – Ata de defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA

Realizou-se, no dia 23 de fevereiro de 2015, às 14:00 horas, na sala 210 do Centro de Atividades Didáticas (CAD) 1 da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação intitulada *ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS, DESMIELINIZAÇÃO E EXPRESSÃO DA CITOCINA INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β), DO NEUROPEPTÍDEO SUBSTÂNCIA P (SP) E DOS FATORES NEUROTRÓFICOS FATOR DE CRESCIMENTO NERVOSO (NGF) E FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DA GLIA (GDNF) AO LONGO DO TEMPO EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA DO NERVO TRIGÊMEO.*, apresentada por GRAZIELLE MARA FERREIRA COSTA, número de registro 2013655961, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Camila Megale de Almeida Leite - Orientador (UFMG), Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid (UFMG), Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu (UFOP).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015.



Prof(a). Camila Megale de Almeida Leite (Doutor)



Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid (Doutor)



Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu (Doutor)

Anexo 4 – Comprovante de submissão do Artigo

De: "European Journal of Pain" <em@editorialmanager.com>

Para: "Camila Megale Almeida-Leite" <camila@icb.ufmg.br>

Enviadas: Quarta-feira, 4 de fevereiro de 2015 10:49:03

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Almeida-Leite,

Your submission entitled "DEMYELINATION/REMYELINATION AND EXPRESSION OF INTERLEUKIN-1<beta>, SUBSTANCE P AND NEUROTROPHIC FACTORS IN TRIGEMINAL NEUROPATHIC PAIN IN RATS" has been received by journal European Journal of Pain

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://euripain.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Dr. Bettina Haake-Weber
Editorial Assistant
European Journal of Pain

Anexo 5 – Artigo submetido