

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEANDRO FRANCISCO SILVA BASTOS

Dor neuropática: contribuição da inflamação para
a sua gênese e proposta de intervenção
terapêutica

Belo Horizonte

2013

LEANDRO FRANCISCO SILVA BASTOS

Dor neuropática: contribuição da inflamação para
a sua gênese e proposta de intervenção
terapêutica

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Área de concentração: Neurofisiologia

Orientador: Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes
Co-orientador: Dr. Márcio de Matos Coelho

Belo Horizonte

2013

**“DOR NEUROPÁTICA: CONTRIBUIÇÃO DA INFLAMAÇÃO PARA A SUA
GÊNESE E PROPOSTA DE INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA”**

LEANDRO FRANCISCO SILVA BASTOS


Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 12 de junho de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



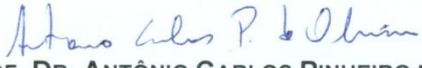
PROFA. DRA. MARUCIA CHACUR
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO




PROFA. DRA. GISELE ZAPATA-SUDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO




PROF. DR. ANTÔNIO LÚCIO TEIXEIRA JÚNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. MÁRCIO DE MATOS COELHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROF. DR. MÁRCIO FLÁVIO DUTRA MORAES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**

Belo Horizonte, 12 de junho de 2013

Dedico a minha mãe

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço aos professores Márcios, aproveitando para expressar a minha admiração pela sagacidade impressionante do professor Márcio Moraes e pela perspicácia extraordinária do professor Márcio Coelho. Além dessas características, o entusiasmo com o ensino ajuda a explicar porque já receberam tantas homenagens dos alunos dos cursos de medicina e farmácia, respectivamente.

A todos os integrantes do Núcleo de Neurociências, em especial ao Daniel Medeiros. A todos do Laboratório de Farmacologia da FaFar, em especial à Adriana Godin. A todos do Laboratório de Neurociência Comportamental da Universidade do Colorado, em especial à Yingning Zhang. Ao Dr. Bernd Fiebich, do Laboratório de Neuroquímica da Universidade de Freiburg. À professora Lirlândia de Sousa, do Laboratório de Biologia Molecular da FaFar, e às alunas Juliana, Thais e Aline. À professora Rossimiriam de Freitas e ao doutorando Bruno, do Laboratório de Síntese Orgânica do Departamento de Química (UFMG). À Doutora Sílvia Fialho Ligório e à aluna de iniciação científica Bruna Costa, da Fundação Ezequiel Dias. À professora Rosa Arantes, do Laboratório de Neuro-Imunopatologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do ICB. Àqueles que, direta ou indiretamente, deram uma contribuição intelectual ou técnica para a realização desse estudo e para a minha formação.

A minha mãe, dona Marlene, e aos meus irmãos, Letícia e Lucas. Ao grande amigo Fabrício Oliveira. À minha Preta querida, pelo companheirismo, carinho, compreensão e, sobretudo, paciência.

À CAPES, FAPEMIG, PRPq, ao CNPq, e NIH (subvenções DA024044 e DE017782) por apoio financeiro.

Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.

José Saramago

RESUMO

BASTOS, Leandro Francisco Silva. **Dor neuropática: contribuição da inflamação para a sua gênese e proposta de intervenção terapêutica.** 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Dores de origem neuropática têm sido amplamente estudadas. No entanto, sabe-se pouco sobre os processos fisiopatológicos que levam ao seu desenvolvimento e, como consequência, há poucas opções terapêuticas para alívio dessas dores. Inicialmente, foi avaliado o curso temporal para desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia após a constrição de nervo ciático em ratos. A hiperalgesia se estabeleceu em três dias após a constrição e a alodínia se estabeleceu em sete dias. Em seguida, observou-se que a injeção intraneural, mas não perineural, de dexametasona no momento da constrição (dia 0) retardou o desenvolvimento tanto da hiperalgesia quanto da alodínia. Então, foi avaliado durante 33 dias o efeito induzido pelo implante perineural de dexametasona sobre o desenvolvimento de alodínia mecânica. O implante de dexametasona retardou a gênese de alodínia por semanas. Por outro lado, quando a implantação foi realizada 12 dias após a constrição, momento em que a alodínia estava plenamente estabelecida, não foi observado efeito antialodínico. O retardo no desenvolvimento de alodínia induzido pela dexametasona está associado com efeito antineuroinflamatório periférico, uma vez que houve redução da translocação de fator nuclear κ B nos gânglios da raiz dorsal em ratos submetidos à implantação perineural de dexametasona simultaneamente à constrição. Assim como a dexametasona, a minociclina é um fármaco que induz efeitos anti-inflamatórios pleiotrópicos, mas, ao contrário da dexametasona, reduz alodínia em modelos de dor neuropática já estabelecida. No entanto, os efeitos antibacteriano e quelante de cátions bivalentes (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) induzidos por essa tetraciclina diminuem o interesse no potencial uso dessa tetraciclina como analgésico. Portanto, foi investigado o efeito induzido por um derivado não antibacteriano da minociclina sobre a alodínia induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos. Observou-se que tanto a minociclina quanto o seu derivado sintético (12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina – PMIN – i.p.) induziram efeito antialodínico quando administrados 21 dias após a constrição. A PMIN reduziu a produção de PGE_2 em culturas de células microgliais estimuladas com LPS e as sinalizações via receptor *toll-like* 2 humano (hTLR2) ou hTLR4 em células HEK293 induzidas por PAM3CSK4 e LPS, respectivamente. O presente estudo reforça as evidências de que a resposta inflamatória é essencial para o desenvolvimento de dor neuropática experimental e sustenta a proposta de teste da possível utilidade clínica da PMIN para alívio de dor neuropática, uma vez que as tetraciclinas quimicamente modificadas apresentam segurança potencialmente superior à das tetraciclinas convencionais por não apresentar atividades antibacteriana e quelante.

Palavras-chave: Dor neuropática. Interações neuro-imunes. Alodínia. Hiperalgesia. Dexametasona. Minociclina. 12S-Hidróxi-1,12-pirazolinominociclina. PGE_2 . TLR2. TLR4.

ABSTRACT

BASTOS, Leandro Francisco Silva. **Neuropathic pain: contribution of inflammation to its genesis and search for a therapeutic tool.** 2013. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Neuropathic pain has been currently widely studied. However, the pathophysiological processes that lead to its genesis are poorly known and, consequently, there is a paucity of therapeutic tools to treat the patients with these chronic painful conditions. Initially, the time course for development of hyperalgesia and allodynia after chronic constriction injury (CCI) of rat sciatic nerve was examined. Hyperalgesia was detectable three days after CCI and allodynia was detectable seven days afterwards. Next, we observed the intraneural, but not perineural, administration of dexamethasone at the moment of CCI (day 0) delayed the development of both hyperalgesia and allodynia. Then, we evaluated for 33 days the effect induced by a perineural implant containing dexamethasone on the development of mechanical allodynia. This systemic treatment prevented the development of allodynia for weeks, whereas the allodynia remained unaffected when the implantation was performed 12 days after CCI, a time point at which allodynia was fully developed. The delay of allodynia development is associated with peripheral antineuroinflammatory effect, as we observed reduced activation of nuclear factor κ B in dorsal root ganglia in rats subjected to dexamethasone perineural implantation simultaneously to constriction. As well as dexamethasone, minocycline induces pleiotropic anti-inflammatory effects, but in contrast to dexamethasone, minocycline inhibits fully established allodynia in models of neuropathic pain. However, minocycline's antibiotic and divalent cation (Ca^{2+} ; Mg^{2+}) chelating effects detract from its potential clinical utility. Therefore, it was investigated the potential effect induced by a non-antibacterial, non-chelating minocycline derivative on the allodynia induced by CCI in mice. Either minocycline or its derivative (12S-hydroxy-1,12-pyrazolinominocycline – PMIN – i.p. injection) induced antiallodynic effect when administered 21 days after CCI. An initial investigation of its anti-inflammatory mechanisms was performed and showed that this chemically modified tetracycline reduced the PGE_2 production by cultured primary rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and inhibited toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 signaling in transfected HEK293 cells stimulated with PAM3CSK4 and LPS, respectively. The present study reinforces the evidence that inflammatory/immune response is essential for the development of experimental neuropathic pain and supports the conduction of clinical studies to evaluate the usefulness of PMIN as analgesic, especially because chemically modified tetracyclines are potentially safer than conventional tetracyclines as they do not exhibit antibacterial and chelating activities.

Keywords: Neuropathic pain. Neuroimmune interactions. Allodynia. Hyperalgesia. Dexamethasone. Minocycline. 12S-Hydroxy-1,12-pyrazolinominocycline. PGE_2 . TLR2. TLR4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da reação entre minociclina e hidrazina, gerando dois derivados não antibacterianos	36
Figura 2	Nervos ciáticos de rato e de camundongo constringidos por fios de náilon ou categutê, respectivamente.....	43
Figura 3	Aparato utilizado para a avaliação de hiperalgesia térmica.....	44
Figura 4	Aparato utilizado para a avaliação de alodínia mecânica.....	45
Figura 5	Hiperálgesia térmica e alodínia mecânica induzidas pela constrição do nervo ciático em ratos.....	54
Figura 6	Efeito induzido pela administração intraneural de dexametasona no momento da constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de hiperálgesia térmica e alodínia mecânica em ratos.....	55
Figura 7	Efeito induzido pela administração perineural de dexametasona no momento da constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de hiperálgesia térmica e alodínia mecânica em ratos.....	56
Figura 8	Efeito induzido pelo implante perineural de dexametasona no momento da constrição do nervo ciático ou no 12 ^o dia após essa cirurgia sobre o desenvolvimento de alodínia mecânica em ratos.....	59
Figura 9	Efeito induzido pela constrição do nervo ciático sobre a translocação de NF- κ B em células dos DRG's no 15 ^o dia após a constrição em ratos que tiveram implantação perineural contendo dexametasona	

	(2,4 mg) ou veículo realizado no dia da cirurgia.....	60
Figura 10	Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos.....	62
Figura 11	Efeito induzido pela minociclina ou pela PMIN sobre a alodínia mecânica no 21 ^o dia após constrição do nervo ciático de camundongos.....	63
Figura 12	Efeito induzido pela PMIN sobre a produção de PGE ₂ por células microgliais de ratos induzida por LPS, avaliado por meio de imunoenensaio enzimático.....	64
Figura 13	Efeito induzido pela minociclina ou PMIN sobre a sinalização via hTLR2 induzida por PAM3CSK4 em células HEK293 transfectadas, avaliado por meio do ensaio de fosfátase alcalina secretada.....	66
Figura 14	Efeito induzido pela minociclina ou PMIN sobre a sinalização via hTLR4 induzida por LPS em células HEK293 transfectadas, avaliado por meio do ensaio de fosfátase alcalina secretada	67
Figura 15	Efeito induzido pela minociclina ou PMIN, em associação ou não com LPS ou PAMCSK4, sobre a viabilidade de células microgliais ou células HEK293 transfectadas com hTLR2 ou hTLR4.....	68

LISTA DE ABREVIações

AP-1	Proteína ativadora 1 (na sigla em inglês)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (no acrônimo em inglês)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETEA	Comitê de Ética em Experimental Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Ciclo-oxigénase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRG	Gânglios da raiz dorsal (na sigla em inglês)
DTT	Ditiotreitól
EUA	Estados Unidos da América
FAINE's	Fármacos anti-inflamatórios não esteroides
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
GABA	Ácido gama-aminobutírico (no acrônimo em inglês)
GILZ	Proteína induzida por glicocorticoides que possui "zíper" de leucina
GR	Receptor para glicocorticoide (na sigla em inglês)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfônico (no acrônimo em inglês)
HMGB-1	<i>High mobility group box 1</i>
hTLR2	Receptor <i>toll-like 2</i> humano (na sigla em inglês)
hTLR4	Receptor <i>toll-like 4</i> humano (na sigla em inglês)
I.c.v.	Intracerebroventricular
I.p.	Intraperitoneal

IL	Interleucina
I.pl.	Intraplantar
I.t.	Intratecal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas cínases ativadas por mitógenos
mPGES-1	Sintétase 1 microssomal de prostaglandina E (na sigla em inglês)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF- κ B	Fator nuclear κ B (na sigla em inglês)
NIH	National Institutes of Health
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
PBS	Salina tamponada com fosfato (na sigla em inglês)
PG	Prostaglandina
PLGA	Polímero dos ácidos láctico e glicólico (na sigla em inglês)
PMIN	12S-Hidróxi-1,12-pirazolinominociclina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila (na sigla em inglês)
PRPq	Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α (na sigla em inglês)
TRP	Receptores de potencial transiente (na sigla em inglês)
TRPA	Receptor anquirina de potencial transiente (na sigla em inglês)
TRPV	Receptor vaniloide de potencial transiente (na sigla em inglês)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Aspectos gerais da dor.....	17
1.2	Contribuição da inflamação para a manutenção da dor crônica.....	20
1.3	Aspectos farmacoterapêuticos da dor.....	31
2	JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivos principais.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Animais experimentais.....	41
4.2	Construção do nervo ciático em ratos ou camundongos.....	42
4.3	Hiperalgisia térmica induzida pela constrição do nervo ciático em ratos....	43
4.4	Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em ratos ou camundongos.....	44
4.5	Extração de DRG's para determinação da translocação de NF- κ B por meio de <i>Western blot</i>	45
4.6	Preparação de extratos proteicos nucleares das células dos DRG's.....	46
4.7	Avaliação da translocação de NF- κ B (p65/RelA) por meio de <i>Western blot</i>	46
4.8	Culturas celulares e testes <i>in vitro</i>	48
4.9	Drogas, preparo de soluções, vias de administração e protocolos experimentais.....	49
4.10	Análise estatística.....	51

5	RESULTADOS.....	53
5.1	Hiperalgesia térmica e alodínia mecânica induzidas pela constrição do nervo ciático em ratos.....	53
5.2	Efeitos induzidos pela dexametasona (vias intraneural ou perineural no dia 0) sobre a hiperalgesia térmica e a alodínia mecânica após constrição do nervociático em ratos.....	53
5.3	Efeitos induzidos pela dexametasona (implante perineural no momento da constrição ou no 12º dia após a cirurgia) sobre a alodínia mecânica e o ganho de massa corporal após constrição do nervo ciático em ratos....	57
5.4	Efeito induzido pela dexametasona (implante perineural no dia 0) sobre a translocação de NF-κB em células dos DRG's (avaliada no dia 15 após a cirurgia) induzida pela constrição do nervo ciático em ratos.....	58
5.5	Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervociático em camundongos.....	61
5.6	Efeito antialodínico induzido pela minociclina ou pela PMIN após constrição do nervo ciático de camundongos.....	61
5.7	Efeito induzido pela PMIN sobre a produção de PGE ₂ por células microgliais primárias de ratos estimulada com LPS.....	61
5.8	Efeito induzido pela minociclina ou pela PMIN sobre a sinalização intracelular via hTLR2 ou hTLR4 em células HEK293 transfectadas.....	65
5.9	Efeito induzido pela minociclina ou PMIN sobre a viabilidade de células microgliais primárias de ratos ou HEK293 transfectadas com hTLR2 ou hTLR4.....	65
6	DISCUSSÃO.....	69
7	CONCLUSÕES, LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO E PERSPECTIVAS.....	80

REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS.....	97
Anexo 1	Certificado concedido pelo CETEA referente ao protocolo 168/2009..... 97
Anexo 2	Certificado concedido pelo CETEA referente ao protocolo 015/2011..... 98
Anexo 3	Espectro de ressonância magnética nuclear de próton da substância PMIN..... 99
Anexo 4	Espectro de massas da substância PMIN.....100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da dor

A dor é definida pela *International Association for the Study of Pain* como uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais e emocionais, geralmente associada a uma lesão real ou potencial. A alodínia é a dor induzida por estímulos que em condições normais não provocam dor, enquanto a hiperalgesia é a dor mais intensa induzida por um estímulo que originalmente é doloroso. Os neurônios sensoriais de diâmetro reduzido, pouco mielinizados (fibras A δ) ou não mielinizados (fibras C), chamados nociceptores, estão envolvidos na indução dessas respostas. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG, na sigla em inglês) ou nos gânglios trigeminais – dependendo da região que inervam – e podem ser ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos. O influxo sensorial gerado por esses nociceptores ativa neurônios na medula espinhal ou no tronco cerebral, os quais se projetam para o tálamo e o córtex cerebral, o que pode gerar desconforto (Basbaum e Jessell, 2000).

No início da década passada foi proposta uma divisão da dor em categorias. Uma delas é a dor nociceptiva, a qual resulta de estímulos nocivos térmicos, químicos ou mecânicos e tem natureza essencialmente fisiológica, protetora e adaptativa. Outra categoria é a dor inflamatória, geralmente relacionada com lesão tecidual. Mediadores inflamatórios, tais como aminas, cininas, prostanoides, purinas e citocinas podem ativar ou sensibilizar nociceptores, levando a alterações funcionais de neurônios no sistema nervoso central (SNC). Por último, outra categoria é a dor neuropática, que decorre de lesões ou disfunção no sistema

nervoso, que pode estar associada também com déficits neurológicos (Scholz e Woolf, 2002).

A dor neuropática pode resultar de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) ou no SNC. As lesões no SNP podem ser causadas por trauma mecânico, doenças metabólicas, agentes neurotóxicos, infecção e tumores, enquanto as lesões no SNC podem ser causadas por acidente vascular encefálico ou esclerose múltipla (Dray, 2008). Para o estudo experimental de neuropatias, vários modelos animais foram desenvolvidos e, conseqüentemente, o avanço no conhecimento dessas condições patológicas foi grande nas últimas duas décadas. Atualmente, é possível modelar dor neuropática induzida por medicamentos quimioterápicos, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida ou herpes-zóster, diabetes melito, consumo de etanol, neuralgia trigeminal e lesão de nervo periférico, entre outros (Jaggi, Jain *et al.*, 2011).

A lesão de nervos periféricos pode iniciar uma grande variedade de mudanças celulares em neurônios sensoriais. Propõe-se que a dor neuropática decorrente de lesão de nervos periféricos se deve ao aumento da excitabilidade ou sensibilização crônica de nociceptores ou de neurônios do SNC envolvidos no processamento nociceptivo. Por exemplo, após lesão de nervos periféricos, um subconjunto de neurônios sensoriais periféricos lesados, ou os intactos nas proximidades dos lesados, podem apresentar descargas ectópicas espontâneas (Tal e Devor, 1992; Ma, Shu *et al.*, 2003). Essas alterações fisiopatológicas podem levar a mudanças neuroplásticas que resultam em sensibilização de neurônios de segunda ordem e, possivelmente, neurônios de ordem superior na via aferente somatossensorial. Conseqüentemente, a amplificação de sinal por sensibilização central faz com que aferências primárias que chegam ao corno dorsal da medula

espinhal ou ao tronco cerebral por fibras mecanorreceptivas A β passem a processar informação nociceptiva, levando assim à alodínia mecânica (Basbaum e Jessel, 2000).

O transporte químico axônico e alterações eletrofisiológicas são os dois mecanismos principais de comunicação entre fibras nervosas periféricas e os seus corpos celulares no DRG ou nos gânglios trigeminais. A sinalização inicial do sítio lesado ao corpo celular ocorre por meio do disparo de potenciais de ação induzidos por despolarização rápida (Berdan, Easaw *et al.*, 1993; Ziv e Spira, 1993). Portanto, canais iônicos que são importantes para funções de nociceptores, tais como aqueles para sódio, potássio e receptores de potencial transiente (TRP, na sigla em inglês) são alvos terapêuticos em potencial (Dray, 2008; Patapoutian, Tate *et al.*, 2009).

A família de canais para sódio sensíveis à voltagem consiste em nove subtipos (Na_v1,1-1,9) já identificados, que variam em localização, cinética e sensibilidade à tetrodotoxina. Aqueles que desempenham papel mais importante em nocicepção são Na_v1,7 e Na_v1,8 (Parada, Vivancos *et al.*, 2003; Villarreal, Sachs *et al.*, 2005; Dray, 2008). Canais para potássio também modulam nocicepção. A ativação de canais para potássio é um dos mecanismos pelos quais opioides (Ocana, Barrios *et al.*, 1996) e antidepressivos tricíclicos (Galeotti, Ghelardini *et al.*, 2001) induzem efeitos antinociceptivos, sendo que o bloqueio desses canais pode exacerbar a resposta nociceptiva (Hu, Carrasquillo *et al.*, 2006). Os receptores TRP, proteínas com seis domínios transmembrana que formam canais não seletivos para cátions, são especializados na detecção de estímulos térmicos e químicos. O receptor vaniloide de potencial transiente 1 (TRPV1) foi o primeiro da família a ser clonado e é ativado por temperaturas altas (≥ 42 °C), capsaicina (Caterina, Schumacher *et al.*, 1997) – um componente picante de pimentas –, toxinas de cobra

(Siemens, Zhou *et al.*, 2006) e por pH baixo (Caterina, Leffler *et al.*, 2000), que é uma consequência de inflamação. Camundongos deficientes para TRPV1 apresentam perda completa de sensibilidade à capsaicina, redução na hipersensibilidade térmica após inflamação e redução acentuada da resposta a pH baixo (Caterina, Leffler *et al.*, 2000). O receptor TRP anquirina 1 (TRPA1) é ativado por várias substâncias pungentes presentes em alimentos, por alguns poluentes, pelo formaldeído – o agente químico mais utilizado para induzir resposta nociceptiva em animais experimentais – e pelo aldeído endógeno 4-hidroxinonenal (MacPherson, Xiao *et al.*, 2007; McNamara, Mandel-Brehm *et al.*, 2007).

1.2 Contribuição da inflamação para a manutenção da dor crônica

O desenvolvimento de dor neuropática envolve não somente vias neuronais, mas também células de Schwann, células satélites no DRG, componentes do sistema imune periférico, micróglia e astrócitos espinhais. O conceito de que a neuroinflamação na periferia, na ausência de lesão estrutural aparente no nervo ou degeneração axônica, é suficiente para induzir dor experimental ganhou boa sustentação quando Maves e colaboradores (Maves, Pechman *et al.*, 1993) demonstraram que a mera colocação de fios catgut cromados 4-0 na proximidade do nervo exposto é suficiente para induzir hiperalgisia. Esse efeito foi semelhante àquele obtido quando quatro ligaduras frouxas foram feitas com esse material exatamente como proposto por Bennett e Xie (1988). Portanto, foi demonstrado que o desenvolvimento de dor neuropática experimental usando esse método não está exclusivamente relacionado com a lesão estrutural causada pela ligadura do nervo, mas também com uma resposta imune local. Outros protocolos

com resposta imune local utilizando administração de fator de necrose tumoral (TNF- α , na sigla em inglês) (Wagner e Myers, 1996), carragenina, adjuvante completo de Freund (Eliav, Herzberg *et al.*, 1999) ou zymosan (Chacur, Milligan *et al.*, 2001) na periferia do nervo ciático induzem alodínia mecânica referida à pata ipsilateral à administração.

A associação entre estímulo inflamatório e lesão física do nervo exacerba a dor experimental, enquanto a supressão concomitante da resposta imune com administração sistêmica de ciclosporina A (Bennett, 2000) ou do anti-inflamatório esteroide dexametasona reduz a infiltração de células imunes e a hiperalgesia induzidas pela constrição de nervo ciático (Clatworthy, Illich *et al.*, 1995). Na periferia, células imunocompetentes incluem não somente os fagócitos que infiltram (neutrófilos e macrófagos) e células *natural killers*, mas também mastócitos, células de Schwann ao longo dos axônios, células satélites nos DRG's, fibroblastos e células epiteliais. Ocorre proliferação de células gliais satélites nos DRG's, bem como infiltração de macrófagos e linfócitos T nessa estrutura. Todas essas células podem produzir mediadores classicamente associados com ativação de células imunes (McMahon, Cafferty *et al.*, 2005). Esses mediadores sensibilizam ou ativam diretamente os nociceptores que, por sua vez, disparam mais potenciais de ação e, por meio dessas alterações eletrofisiológicas, ocorre sensibilização central. No corno dorsal da medula espinhal, ocorre ativação de células gliais, que também produzem mediadores inflamatórios de diferentes naturezas químicas que tornam neurônios hiperexcitáveis e levam, conseqüentemente, ao aumento da facilitação sináptica que gera alodínia e hiperalgesia.

Diferentes lesões do nervo ciático levam ao aumento da translocação e ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B, na sigla em inglês) em DRG's (Ma e Bisby,

1998). NF- κ B desempenha um papel essencial na expressão gênica de mediadores inflamatórios por células gliais e neuronais, além de vários outros tipos celulares. Em células não estimuladas, NF- κ B consiste de um heterodímero composto pelas subunidades p50 e p65, formando um complexo com uma proteína inibitória, chamada I κ B. Várias substâncias endógenas ou exógenas podem ativar receptores que desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que, por sua vez, ativa NF- κ B (principalmente heterodímeros de p65RelA/p50), o qual é liberado da proteína inibitória e transloca do citoplasma para o núcleo celular. Uma vez no núcleo celular, ocorre fosforilação e conseqüente ativação desse fator de transcrição, o que resulta em aumentada expressão de vários genes. Entre esses, estão incluídos genes relacionados com a expressão de diversos mediadores inflamatórios, tais como síntese de óxido nítrico, COX-2, moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas (Kaltschmidt, Widera *et al.*, 2005). Alguns mecanismos intracelulares têm sido propostos para explicar os efeitos induzidos por anti-inflamatórios esteroides sobre a ativação de NF- κ B. Na linhagem celular monocítica humana THP-1, após tratamento com dexametasona ou IL-10, a proteína induzida por glicocorticoides que possui “zíper” de leucina (GILZ) se liga à subunidade p65 do NF- κ B e impede a sua interação com elementos regulatórios gênicos (Berrebi, Bruscoli *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que a GILZ inibe a ativação de NF- κ B também em células embrionárias mesenquimais derivadas da medula óssea (Yang, Zhang *et al.*, 2008), células epiteliais (Eddleston, Herschbach *et al.*, 2007) e macrófagos (Yang, Aeberli *et al.*, 2009).

Vias de sinalização entre células neuronais e não neuronais têm sido elucidadas e evidenciam um importante papel de citocinas, entre outros mediadores inflamatórios de diferentes naturezas químicas, no estabelecimento e na progressão

da dor neuropática. Citocinas são mediadores proteicos importantes para comunicação entre células, comumente chamadas de pleiotrópicas devido a sua ampla redundância, podendo apresentar atividades autócrinas, parácrinas ou endócrinas. Algumas citocinas são chamadas inflamatórias, outras anti-inflamatórias, dependendo de seus efeitos sobre células do sistema imunológico, particularmente sobre linfócitos. Entretanto, sabe-se que essa classificação de citocinas em inflamatórias e anti-inflamatórias é meramente didática, pois citocinas ditas anti-inflamatórias podem mediar também respostas inflamatórias. Como exemplo, pode ser citado o papel desempenhado por citocinas anti-inflamatórias na progressão da asma grave (Levine e Wenzel, 2010).

Citocinas inflamatórias induzem a liberação de outros mediadores inflamatórios na periferia, que por sua vez ativam ou sensibilizam neurônios aferentes primários, participando assim de um fenômeno chamado sensibilização periférica. Citocinas tais como TNF- α (Woolf, Allchorne *et al.*, 1997), interleucina (IL)-1 β (Ferreira, Lorenzetti *et al.*, 1988), IL-8 (Cunha, Lorenzetti *et al.*, 1991), IL-12 (Verri, Molina *et al.*, 2005), IL-18 (Verri, Schivo *et al.*, 2004), bem como as quimiocinas CCL3 (Zhang, Inan *et al.*, 2005), CXCL12 e CCL22 (Oh, Tran *et al.*, 2001), induzem hipersensibilidade mecânica e/ou térmica após sua injeção por via intraplantar (i.pl.). Além disso, aplicação direta de TNF- α ou de IL-1 β no DRG ou no nervo ciático resulta em alodínia mecânica (Homma, Brull *et al.*, 2002; Zelenka, Schafers *et al.*, 2005). IL-1 β , além de mediar inflamação e induzir a síntese de substâncias que sensibilizam nociceptores, tal como prostaglandina (PG)-E₂, pode alterar diretamente suas propriedades eletrofisiológicas, pois leva à geração de potenciais de ação ao alterar correntes de sódio resistentes à tetrodotoxina (Binshtok, Wang *et al.*, 2008). IL-1 β , IL-6 e TNF- α exacerbam transmissão sináptica

excitatória e correntes induzidas pelo ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) na lâmina superficial (II) do corno dorsal da medula espinhal. Além disso, inibem transmissão inibitória e correntes induzidas pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) e glicina (Kawasaki, Zhang *et al.*, 2008).

Consistente com as evidências de que a aplicação de citocinas induz resposta nociceptiva, o bloqueio de suas ações induz efeito oposto. Injeção intratecal (i.t.) do receptor solúvel de TNF- α , isoladamente ou em combinação com um antagonista para o receptor para IL-1, reduz alodínia mecânica associada com transecção de nervo espinhal, um modelo de dor neuropática (Sweitzer, Martin *et al.*, 2001). Aplicação direta de anticorpo contra TNF- α no nervo ciático, de maneira simultaneamente à sua constrição, resulta em hiperalgesia térmica e alodínia mecânica reduzidas quando comparadas com aquelas de animais controles tratados com imunoglobulina G de cabra (Lindenlaub, Teuteberg *et al.*, 2000; Sommer, Lindenlaub *et al.*, 2001). A infusão contínua de TNF- α pela via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratos exacerba a resposta hiperalgésica induzida pela constrição crônica do nervo ciático, enquanto a infusão de um anticorpo contra essa citocina reverte a hiperalgesia sem alterar a concentração de TNF- α na medula espinhal ou no plasma desses animais (Ignatowski, Covey *et al.*, 1999).

Por outro lado, alguns estudos mostram os efeitos antinociceptivos induzidos por citocinas anti-inflamatórias em modelos de dor inflamatória e neuropática. A injeção i.pl. de IL-4 ou IL-10, citocinas anti-inflamatórias que inibem a ativação de macrófagos/micróglia (Ledeboer, Breve *et al.*, 2000), atenua a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de carragenina, bradicinina ou TNF- α em ratos. Além disso, anticorpos contra IL-4 ou IL-10 exacerbam a resposta hiperalgésica induzida pela

carragenina e pelo TNF- α , evidenciando, portanto, seu papel anti-inflamatório (Poole, Cunha *et al.*, 1995; Cunha, Poole *et al.*, 1999). O aumento da expressão do gene para IL-4 no DRG, por meio de um vetor viral, reduz a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica uma semana após a ligadura de nervo espinhal. A inibição dessas respostas comportamentais é associada à prevenção do aumento da produção de IL-1 β e PGE₂ na medula espinhal. Além disso, esse tratamento reduz a imunorreatividade para c-fos (uma proteína codificada pelo gene FOS, que é um gene de expressão imediata, cujo aumento da expressão indica aumento de atividade neuronal) no corno dorsal induzida por estímulo mecânico não nocivo (Hao, Mata *et al.*, 2006). A administração intraneural de dose única de IL-10 (250 ng) no local e no momento da constrição crônica do nervo ciático reduz a hiperalgesia térmica avaliada nos dias 3, 5 e 9 após a cirurgia. Além disso, a migração de macrófagos para o sítio constringido e a imunorreatividade local para o TNF- α são reduzidas (avaliação nos dias 2 e 5 após a constrição) (Wagner, Janjigian *et al.*, 1998). Esses resultados obtidos em animais experimentais condizem com aqueles obtidos em estudos clínicos recentes que mostram uma tendência para a diminuição da produção das citocinas anti-inflamatórias em condições dolorosas. Pacientes portadores de dor crônica difusa ou de síndrome dolorosa complexa regional apresentam concentrações séricas reduzidas de IL-4 e IL-10 (Uceyler, Valenza *et al.*, 2006; Uceyler, Eberle *et al.*, 2007).

Prostanoides também desempenham um papel importante no estabelecimento e manutenção da dor crônica. PGE₂ é o principal prostanóide inflamatório que é produzido por neurônios e células imunes e têm ações periféricas e centrais em diferentes modelos experimentais de dor neuropática (Matsunaga, Kawamoto *et al.*, 2007; Kawabata, 2011). No entanto, é preciso ressaltar

que fármacos anti-inflamatórios não esteroides (FAINE's) não aliviam dores de origem neuropática de maneira marcante (Dray, 2008).

Os efeitos induzidos por antagonistas de receptores para prostanoides e inibidores de outras enzimas da via de metabolismo do ácido araquidônico sobre dor neuropática experimental têm sido investigados. Os quatro receptores para PGE₂ já identificados (EP1-EP4) têm sua expressão aumentada em nervo ciático de ratos após ligadura parcial (Ma e Eisenach, 2003b) ou constrição (Woodhams, Macdonald *et al.*, 2007). Administração *per os* de um antagonista de receptores EP₁ (ONO-8711) reverte parcialmente hiperalgesia, alodínia e expressão de c-fos no corno dorsal da medula espinhal em ratos submetidos à constrição do nervo ciático (Kawahara, Sakamoto *et al.*, 2001). Em nervos de ratos submetidos a diferentes modelos de dor neuropática, bem como em nervos lesados e DRG's de humanos, a expressão do gene para ciclo-oxigenase (COX)-2 também é aumentada (Ma e Eisenach, 2003a; Durrenberger, Facer *et al.*, 2006). Há evidências de que a sintetase 1 microssomal de PGE (mPGES-1) também está envolvida no desenvolvimento de alodínia e hiperalgesia em camundongos submetidos à transecção de nervo espinhal (Mabuchi, Kojima *et al.*, 2004).

Os receptores TLR também estão envolvidos na gênese e progressão de dores crônicas. O primeiro receptor do tipo *toll* foi identificado em 1997 e, atualmente, já foram identificados 13 subtipos (Nicotra, Loram *et al.*, 2012). Esses receptores transmembrana de reconhecimento de padrão respondem tanto a ligantes exógenos quanto a ligantes endógenos. Os principais ligantes exógenos que são reconhecidos pelo receptor TLR2 são lipopeptídeos de bactérias Gram-positivas, enquanto TLR4 reconhece predominantemente endotoxinas de bactérias Gram-negativas (por exemplo: LPS). Macromoléculas endógenas tais como β-

defensinas, fibronectina, proteínas de choque térmico e *high mobility group box 1* (HMGB1) – coletivamente conhecidos como padrões moleculares associados com perigo ou simplesmente “alarminas” – ativam receptores TLR e são considerados a fonte de ativação de TLR’s em condições dolorosas crônicas e outras doenças que afetam o SNC. TLR’s são expressos em diversas células imunes e medeiam interações neuro-imunes. A ativação de TLR2 ou TLR4 aciona cascatas de sinalização intracelulares que resultam na translocação de NF- κ B, o que por sua vez leva à liberação de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (Liu, Gao *et al.*, 2012; Nicotra, Loram *et al.*, 2012).

Estudos em camundongos deficientes para TLR2 mostram que a expressão desse receptor desempenha um papel importante na gênese e na progressão de alodínia mecânica, hiperalgesia térmica e dor espontânea experimental associadas com lesão de nervo periférico. Essa deficiência genética é associada também com redução de ativação de células microgliais espinhais e infiltração de macrófagos em DRG’s (Kim, Kim *et al.*, 2007; Kim, You *et al.*, 2011).

O papel desempenhado por TLR2 na dor neuropática experimental após lesão de nervo periférico parece ser muito dependente de macrófagos que se infiltram no nervo e pouco dependente ou independente de ativação microglial na medula espinhal. As expressões dos genes para TLR2 ou TNF- α são aumentadas em nervos ciáticos de camundongos submetidos à ligação parcial, e esse aumento de expressão ocorre essencialmente em macrófagos ED-1⁺. No entanto, a expressão do gene para TNF- α não é aumentada em camundongos deficientes na expressão de TLR2. A ligação parcial de nervo ciático ativa micróglia espinhal, mas essa ativação não está associada com aumento da expressão de TLR2. Além disso, ativação microglial ocorre normalmente em camundongos deficientes em TLR2

submetidos à lesão de nervo mencionada anteriormente; o desenvolvimento de hiperalgesia térmica é impedido nesses camundongos, mas o desenvolvimento de alodínia mecânica é apenas parcialmente inibido. Portanto, esse conjunto de resultados indica que receptores do tipo TLR2 medeiam a gênese e progressão de dor neuropática experimental por meio de ações periféricas e que o seu papel é mais marcante no desenvolvimento de hiperalgesia do que no de alodínia (Shi, Zekki *et al.*, 2011).

Os papéis desempenhados por TLR4 na gênese e progressão de dor experimental, mostrados por meio de diferentes abordagens genéticas e farmacológicas, têm sido amplamente estudados em diferentes modelos experimentais de dor neuropática (Liu, Gao *et al.*, 2012; Nicotra, Loram *et al.*, 2012). Administração sistêmica ou i.t. de antagonistas de receptores TLR4 em roedores reverte tanto a hiperalgesia quanto a alodínia induzidas pela constrição do nervo ciático (Bettoni, Comelli *et al.*, 2008; Kuang, Huang *et al.*, 2012). (+)-Naloxona, um composto que não antagoniza receptores opioides, mas inibe a sinalização via hTLR4, reverte alodínia em modelos de constrição do nervo ciático e de ligadura de nervo espinhal (Lewis, Loram *et al.*, 2012). TLR4 tem expressão gênica aumentada em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (Yan, Yuan *et al.*, 2012).

Se várias substâncias endógenas, de diferentes naturezas químicas, medeiam a gênese e persistência da dor neuropática clínica ou experimental, espera-se que anti-inflamatórios, tais como anti-inflamatórios esteroides, que induzem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores pleiotrópicos, interfiram no desenvolvimento ou progressão da dor neuropática. De fato, foi demonstrado que ciclosporina-A, um medicamento imunossupressor, inibe o desenvolvimento de hiperalgesia induzida pela constrição do nervo ciático quando administrado por via

sistêmica no dia da cirurgia e sucessivamente até o 14º dia após a constrição do nervo (Bennett, 2000). Além disso, dexametasona, um fármaco com atividades anti-inflamatória e imunossupressora marcantes, inibe formação de tecido fibrovascular adjacente às ligaduras, infiltração de células inflamatórias e a hiperalgesia térmica quando administrado antes da cirurgia e diariamente após a constrição do nervo ciático de ratos (Clatworthy, Illich *et al.*, 1995). Por outro lado, quando ratos são submetidos a essa constrição e no 10º dia após a cirurgia o nervo ciático é reexposto para colocação de um implante de liberação prolongada de metilprednisolona na proximidade do nervo, efeitos antialodínico e anti-hiperalgésico são observados por 21 dias (Johansson e Bennett, 1997). Esse resultado mostra que um anti-inflamatório esteroide aplicado localmente na periferia do nervo pode reverter a sensibilização mesmo quando esta está plenamente estabelecida. Entretanto, é preciso ressaltar que, nesse estudo, não é possível descartar a possibilidade de efeito sistêmico induzido pela metilprednisolona administrada com uma preparação de liberação modificada.

O papel desempenhado por esteroides endógenos na gênese e persistência da dor neuropática experimental também tem sido estudado. Quando ratos são submetidos à adrenalectomia sete dias antes da constrição do nervo ciático, não há desenvolvimento de hiperalgesia térmica nem de alodínia mecânica até o sétimo dia após a constrição. Os animais submetidos à falsa cirurgia de constrição do nervo não têm sua dor experimental afetada pela adrenalectomia (Wang, Lim *et al.*, 2004). Por outro lado, em animais submetidos à adrenalectomia seguida de constrição e do tratamento com dexametasona (100 µg/kg, via subcutânea, duas vezes ao dia, do dia 0 ao dia 6 após a cirurgia), há desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia.

Wang e colaboradores (2004) mostraram também que existe um paralelo entre o desenvolvimento de dor experimental após constrição do nervo ciático e o aumento da expressão de receptores para glicocorticoides (GR's) no corno dorsal da medula espinhal ipsilateral à constrição do nervo ciático, mas não no corno ventral da medula ou no tálamo contralateral à constrição. Em conjunto, esses resultados indicam que a constrição do nervo ciático leva ao aumento da expressão desses receptores em uma região específica do SNC, e esse fenômeno parece ser mediado pela IL-6. Uma vez com expressão aumentada, esses receptores medeiam a gênese e a progressão da dor neuropática experimental, pois o tratamento com dexametasona por via i.t. exacerba a hiperalgesia e a alodínia induzidas pela constrição do nervo ciático, enquanto um antagonista de GR's, a mifepristona, induz efeitos anti-hiperalgésico e antialodínico (Wang, Lim *et al.*, 2004). Portanto, de maneira aparentemente paradoxal, essas evidências indicam que GR's centrais medeiam a gênese e progressão da dor experimental. Corroborando esses resultados, estudo mais recente demonstrou que a mifepristona induz efeito antialodínico e anti-hiperalgésico em camundongos submetidos à ligação de nervo espinhal quando administrada pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou i.t., mas não pela via i.c.v.. 21-Mesilato de dexametasona – outro antagonista de GR's – induz efeito semelhante quando administrado pela via i.t. (Takasaki, Kurihara *et al.*, 2005). Portanto, as evidências apontam para ações periféricas antinociceptivas e as ações centrais pró-nociceptivas de anti-inflamatórios esteroides.

Embora os resultados de estudos pré-clínicos indiquem que anti-inflamatórios esteroides exógenos previnem a gênese ou retardam a progressão de dores crônicas e evidenciem suas utilidades como ferramentas farmacológicas, estudos

clínicos mostram que esses fármacos são ferramentas terapêuticas pouco úteis (Chen, Yang *et al.*, 2010; Roncoroni, Baillet *et al.*, 2011).

1.3 Aspectos farmacoterapêuticos da dor

Uma vez que dores crônicas associadas com neuropatias ou inflamação representam grande desconforto aos pacientes, diferentes abordagens terapêuticas têm sido usadas com o objetivo de atenuá-la. Uma das abordagens mais comuns é a farmacoterapia. Entre as diferentes classes farmacológicas ou grupos terapêuticos que têm sido usados com o objetivo de aliviar a dor, as alternativas mais convencionais são os FAINE's e os analgésicos opioides (Melnikova, 2010).

Os FAINE's representam uma ferramenta terapêutica útil, mas o seu uso pode ser limitado pela possibilidade de ocorrência de reações adversas graves. Muitas dessas reações estão relacionadas com a inibição da síntese de PGs que exercem funções fisiológicas. A inibição da síntese da PGE₂ e da PGI₂ pode resultar em lesão das mucosas gástrica e intestinal. Essas PGs induzem efeito protetor nesses sítios, pois reduzem a secreção ácida gástrica e aumentam a secreção de muco citoprotetor (Konturek, Obtulowicz *et al.*, 1981). Por sua vez, a inibição da síntese de tromboxano A₂ aumenta o tempo de coagulação, uma vez que esse eicosanoide induz agregação plaquetária e vasoconstrição (Smith, Araki *et al.*, 1980). Foi postulado que coxibes não induziriam as mesmas reações adversas observadas durante o tratamento com os inibidores não seletivos da COX, uma vez que a isoforma 2 da enzima estaria presente principalmente em processos inflamatórios e não apresentaria atividades fisiológicas importantes (Seibert, Zhang *et al.*, 1994). Entretanto, já foi demonstrada a expressão constitutiva do gene para a enzima COX-

2 em diferentes tecidos. Na mucosa estomacal, parte da síntese de PGs, que têm função protetora nesse tecido, é dependente da COX-2 (Zimmermann, Sarbia *et al.*, 1998). No endotélio, a COX-2 também é responsável pela síntese de PGI₂ em condições fisiológicas (Fitzgerald, 2004). Além disso, um estudo no qual foram usados animais deficientes para o gene da COX-2 demonstrou a importância dessa enzima para a manutenção da perfusão renal adequada (Morham, Langenbach *et al.*, 1995). Com a comprovação de que o uso prolongado de coxibes aumenta o risco de ocorrência de doenças tromboembólicas (Mukherjee, Nissen *et al.*, 2001), alguns deles foram retirados do mercado mundialmente, como o rofecoxibe e o valdecoxibe. Além disso, o lumiracoxibe foi retirado do mercado na Austrália, Brasil e outros países e não foi aprovado para comercialização nos EUA. O celecoxibe, o coxibe que apresenta menor seletividade para COX-2 entre os já liberados para comercialização, ainda permanece no mercado.

Entre os fármacos usados para o alívio da dor, os analgésicos opioides são os mais conhecidos e usados há milênios. Apesar da sua utilidade como analgésicos, os opioides podem induzir reações adversas graves. Entre elas, podem ser citadas depressão respiratória e constipação. O uso prolongado desses analgésicos também está associado com o desenvolvimento de tolerância ao efeito analgésico, o que torna necessário o uso de doses elevadas para obtenção do efeito satisfatório, aumentando, assim, o risco de ocorrência de reações adversas. Além disso, esses fármacos apresentam potencial para adição (Shurman, Koob *et al.*, 2010), o que leva a um consumo irracional e elevado desses medicamentos. Outra limitação para o alívio da dor com opioides é o temor excessivo de desenvolvimento de adição após o seu uso – um fenômeno conhecido como opiofobia (Motov e Khan, 2008).

Apesar de existirem várias classes de fármacos úteis no tratamento de pacientes com condições dolorosas, existe uma grande demanda pela busca de novos fármacos com eficácia ou segurança superiores às dos atualmente disponíveis para uso clínico. Além da busca por novos fármacos, têm sido desenvolvidos os novos usos para fármacos já disponíveis para uso clínico, tais como os agonistas de α_2 -adrenoceptores, antagonistas de β -adrenoceptores, anticonvulsivantes e antidepressivos, os quais representam atualmente alternativas terapêuticas menos convencionais (Dray, 2008). Fármacos como o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e paracetamol estão presentes na lista de medicamentos essenciais proposta pela Organização Mundial da Saúde (WHO Model List of Essential Medicines, 2011) na classe de anti-inflamatórios, e morfina e codeína foram incluídos na classe de analgésicos opioides (WHO Model List of Essential Medicines, 2011). Entretanto, esses fármacos têm utilidade muito limitada no tratamento de pacientes com condições dolorosas associadas com neuropatias, condições que têm uma prevalência tão alta quanto 7-8% em países desenvolvidos (Torrance, Smith *et al.*, 2006; Bouhassira, Lanteri-Minet *et al.*, 2008). Ao invés de opioides e FINE's, gabapentina e pregabalina - fármacos anticonvulsivantes - foram aprovados em alguns países para o tratamento de pacientes com dor neuropática (Dray, 2008).

Nesse contexto de reposicionamento de fármacos (Tobinick, 2009), algumas atividades não antibacterianas de derivados da tetraciclina têm sido investigadas (Bastos, de Oliveira *et al.*, 2012). As tetraciclinas foram descobertas no final da década de 1940 e constituem uma família de fármacos naturais ou semissintéticos. Esses antibióticos inibem a síntese proteica bacteriana ao impedir o acoplamento do aminoacil-ácido ribonucleico transportador ao sítio receptor ribossômico. As

tetraciclinas são fármacos que induzem efeito predominantemente bacteriostático, apresentando atividade contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também contra clamídias, micoplasmas, riquetsias e protozoários (Chopra e Roberts, 2001). Doxíciclina e minociclina são as tetraciclinas mais bem absorvidas após administração oral (90-100%), não apresentando interação significativa com alimentos (Perez-Trallero e Iglesias, 2003), e transpõem a barreira hematoencefálica de maneira eficaz (Aronson, 1980).

A minociclina, aprovada para uso clínico como antibiótico desde a década de 1970, é a tetraciclina cujas atividades não antibacterianas são mais amplamente estudadas. Entre essas atividades podem ser citadas as antinociceptiva, anti-inflamatória e neuroprotetora. Os efeitos em modelos experimentais de dor, inflamação e neurodegeneração têm sido associados com inibição da produção de mediadores inflamatórios por células imunes e neurônios. Estudos publicados na última década têm relatado efeitos induzidos por essa tetraciclina de segunda geração em modelos de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática (Raghavendra, Tanga *et al.*, 2003; Ledebouer, Sloane *et al.*, 2005; Bastos, Merlo *et al.*, 2007; Bastos, de Oliveira *et al.*, 2012).

Tetraciclinas quimicamente modificadas despertam interesse por apresentarem segurança potencialmente superior àquela de tetraciclinas convencionais. Baseando-se nisso, Lertvorachon *et al.* (2005) sintetizaram tetraciclinas quimicamente modificadas resultantes da reação de minociclina com hidrazina (Figura 1), chamadas 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina (PMIN) e 11,12-pirazolinominociclina. Modificações nos carbonos 1, 11 e 12 são invariavelmente prejudiciais à atividade antibacteriana (Chopra e Roberts, 2001; Lertvorachon, Kim *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a PMIN induz efeitos

antioxidante (Lertvorachon, Kim *et al.*, 2005; Daood, Hoyson *et al.*, 2012), anti-inflamatório e antinociceptivo (Bastos, Angusti *et al.*, 2008), assim como a minociclina; no entanto, as atividades antibacteriana e quelante de cálcio parecem ser abolidas (Lertvorachon, Kim *et al.*, 2005; Bastos, Angusti *et al.*, 2008).

Mesmo em concentrações altas, a PMIN não induz efeito antibacteriano sobre duas linhagens de *Escherichia coli in vitro* – uma sensível e outra resistente ao fármaco tetraciclina. Por outro lado, a minociclina inibe o crescimento dessas duas linhagens bacterianas (Lertvorachon, Kim *et al.*, 2005). Tanto a minociclina quanto o soro de camundongos tratados com aminociclina inibem o crescimento de bactérias da linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, mas nem a PMIN nem o soro de camundongos tratados com essa substância induzem tal efeito (Bastos, Angusti *et al.*, 2008). Esses dados indicam que é pouco provável que a PMIN seja biotransformada em uma ou mais substâncias que apresentem atividade antibacteriana.

Assim, tetraciclinas quimicamente modificadas não causariam candidíase nem distúrbios gastrintestinais, reações adversas associadas com o uso prolongado (duração média de 10,5 meses) do antibiótico minociclina (Goulden, Glass *et al.*, 1996). Além disso, como substituições nos carbonos 1 e 12 prejudicam a capacidade de quelar cálcio (II), outras vantagens potenciais da PMIN em relação à minociclina seria a possibilidade reduzida de deposição em ossos e indução de deformidades ósseas, descoloração de dentes (prevalência de 3 a 6%), displasia gengival e hipoplasia dental (Sanchez, Rogers *et al.*, 2004). Essas reações adversas são atribuídas à formação de complexo entre minociclina e ortofosfato de cálcio nesses tecidos. Além disso, por causa da interação entre tetraciclinas e cálcio (II),

esses medicamentos não podem ser usados por mulheres grávidas ou nutrizes nem por crianças com idade inferior a 9 anos.

De fato, existe interesse em drogas dessa classe. Estudos clínicos têm sido conduzidos para testar a utilidade clínica da inciclinida, uma tetraciclina quimicamente modificada (também chamada de COL-3 ou CMT-3), no tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer (www.clinicaltrials.gov). Os autores dos vários estudos que investigaram essa droga têm apenas sugerido que ela não apresenta atividade antibacteriana porque modificações químicas no carbono 4 do núcleo tetracíclico seriam prejudiciais à atividade antibacteriana, mas isso parecia não ter sido demonstrado experimentalmente. Em estudo muito recente, foi demonstrado que a inciclinida não afeta o crescimento de *Escherichia coli*, mas inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus in vitro*, com concentração inibitória mínima de 1 mg/ml (Edan, Luqmani *et al.*, 2013). Esse resultado contraria a hipótese de completa ausência de efeito antibacteriano induzido por essa tetraciclina quimicamente modificada. Portanto, é possível que modificações nos carbonos 1 e 12, tais como aquelas que levam à obtenção da PMIN, sejam mais promissoras para a obtenção de derivados desprovidos de atividade antibacteriana do que modificações no carbono 4.

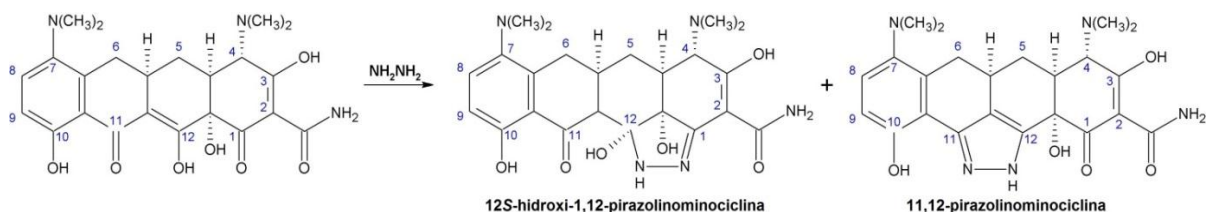


Figura 1. Representação da reação entre minociclina e hidrazina, gerando dois derivados não antibacterianos.

2 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

A dor é a principal queixa de pacientes que procuram serviços de saúde. Estudos epidemiológicos recentes conduzidos em países desenvolvidos mostram que a prevalência de dor neuropática é de aproximadamente 7 a 8% (Torrance, Smith *et al.*, 2006; Bouhassira, Lanteri-Minet *et al.*, 2008). Existe uma projeção de que a prevalência de diabetes dobrará nas próximas duas décadas, mesmo se a prevalência de obesidade se mantiver constante (Wild, Roglic *et al.*, 2004). Com isso, é provável que a prevalência de neuropatia periférica diabética também aumente.

Condições dolorosas crônicas representam uma redução significativa na qualidade de vida. Além disso, geram absenteísmo. Esse quadro gera um gasto anual direto estimado de mais de 100 bilhões de dólares para os serviços de saúde dos EUA, sem contabilizar os prejuízos econômicos indiretos relacionados com o absenteísmo. Dores neuropáticas interferem no sono, libido, atividades recreacionais, mobilidade, trabalho regular e atividade social. Um paciente portador de dor neuropática tem um gasto anual com serviços de saúde três vezes superior àquele de indivíduos não portadores (McCarberg e Billington, 2006).

Atualmente, estuda-se de forma ampla como as células imunes alteram funções de neurônios periféricos e centrais. Assim, as vias de sinalização recíprocas entre essas células têm sido consideradas importantes alvos para intervenções na gênese e na progressão de condições dolorosas crônicas (Scholz e Woolf, 2007; Milligan e Watkins, 2009). No entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não tem sido amplamente estudados os mecanismos pelos quais a dor neuropática experimental se desenvolve, pois a maioria dos estudos sobre dor neuropática

avalia o efeito induzido por drogas ou intervenções não farmacológicas após o pleno estabelecimento da sensibilização.

Apesar de avanços no conhecimento dos fatores etiopatogênicos e dos mecanismos celulares que medeiam as dores de origem neuropática, a descoberta de tratamento adequado ainda representa um grande desafio. Não há agentes curativos ou modificadores de doença disponíveis. FÁRMACOS e doses convencionais de opioides são geralmente ineficientes no tratamento de pacientes com dores neuropáticas crônicas (Kalso, Edwards *et al.*, 2004). Os pacientes são geralmente tratados de maneira empírica com anticonvulsivantes e antidepressivos. Os fármacos de escolha - ou seja, aqueles que já receberam aprovação de agências reguladoras - são gabapentina, pregabalina e duloxetina (Dray, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos principais

Investigar a contribuição da inflamação na gênese da dor neuropática experimental e o potencial efeito supressor de dor neuropática experimental já estabelecida induzido por uma nova substância anti-inflamatória da classe química das tetraciclinas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o curso temporal da sensibilização para estímulos térmico e mecânico após a constrição de nervo ciático em ratos;
- Avaliar o efeito induzido pela administração intraneural de dexametasona – um fármaco anti-inflamatório e imunossupressor – sobre o curso temporal da sensibilização para estímulos térmico e mecânico decorrente da constrição do nervo ciático em ratos;
- Avaliar o efeito induzido pela administração perineural de dexametasona sobre o curso temporal da sensibilização para estímulos térmico e mecânico decorrente da constrição do nervo ciático em ratos;
- Avaliar o efeito induzido pelo implante perineural de dexametasona sobre o curso temporal da sensibilização para estímulo mecânico decorrente da constrição do nervo ciático de ratos e comparar com o efeito observado quando o implante é realizado após sensibilização plena;

- Avaliar o efeito induzido pela minociclina e seu derivado sintético não antibacteriano (PMIN) sobre a alodínia mecânica decorrente da constrição de nervo ciático em camundongos;
- Avaliar o efeito induzido pela PMIN sobre a produção de PGE₂ em culturas primárias de células microgлияis de ratos estimuladas com LPS;
- Avaliar o efeito induzido pela minociclina e PMIN sobre a sinalização via hTLR2 em culturas de células HEK293 transfectadas com esse receptor e estimuladas com PAM3CSK4;
- Avaliar o efeito induzido pela minociclina e PMIN sobre a sinalização via hTLR4 em culturas de células HEK293 transfectadas com esse receptor e estimuladas com LPS;
- Avaliar se os tratamentos mencionados acima interferem na viabilidade das culturas de células utilizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

No presente estudo, foram utilizados ratos Wistar (240-280 g, 10 semanas) machos. Para a obtenção da cultura primária de células microgliciais, foram utilizados ratos Wistar neonatos (dia seguinte ao do nascimento) de ambos os sexos. Camundongos C57BL/6 (17-23 g, 12 semanas) fêmeos foram usados em alguns experimentos com o objetivo de reduzir o consumo de PMIN – uma substância de difícil purificação. A divisão dos animais em grupos experimentais foi realizada em tal modo que as médias de valores de massas corporais dos diferentes grupos fossem muito próximas em todos os protocolos propostos. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h (luz de 07h00min às 19h00min) e ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Ambientação nos aparatos foi feita por quatro dias antes da condução de testes comportamentais (40 min/dia para ratos e 60 min/dia para camundongos). Todos os experimentos foram realizados em temperatura de 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade para ratos (Gordon, 1990). Imediatamente após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de dióxido de carbono. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais não sedados e não anestesiados (Zimmermann, 1983). Estes projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (números de protocolo 168/2009 e 015/2011, anexos 1 e 2, respectivamente).

4.2 Constrição do nervo ciático em ratos ou camundongos

Os procedimentos cirúrgicos de constrição do nervo de ratos são baseados em uma técnica amplamente utilizada (Bennett e Xie, 1988), com pequenas modificações (Motta, Perez *et al.*, 2011). Os ratos foram anestesiados com injeções i.p. de uma associação em dose fixa de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) e, por meio de uma incisão na região do bíceps femoral previamente tricotomizada e higienizada com iodopolividona 10% m/v, uma porção do nervo ciático foi exposta. Foram feitas quatro ligaduras com fio de náilon previamente esterilizado, com espaço de aproximadamente 1 mm entre elas (Figura 2a). A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura superficial epineural. Um grupo controle foi composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia ('falso-operados'), na qual o nervo foi apenas visualizado, e outro grupo controle foi composto por animais não submetidos a qualquer intervenção ('não operados'). Nos experimentos subsequentes, houve comparação apenas entre os operados e os falsamente operados.

A constrição do nervo ciático de camundongos foi realizada de maneira semelhante, com poucas modificações. Foram feitas três ligaduras com fio catagute cromado 5-0 (Figura 2b). As doses de cetamina e xilazina usadas para anestesia de camundongos foram 100 e 10 mg/kg (i.p.), respectivamente.

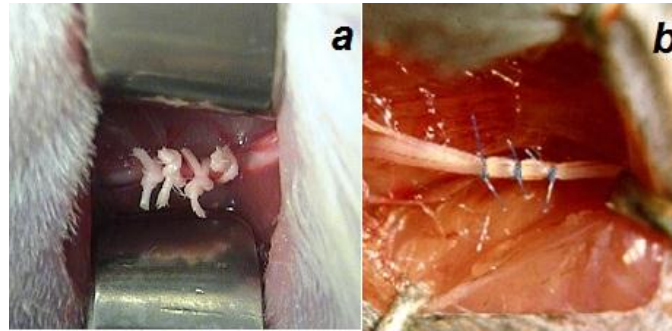


Figura 2. Nervos ciáticos de rato (a) e camundongo (b, aumento de 10X) constringidos por fios de náilon ou categute, respectivamente.

4.3 Hiperalgesia térmica induzida pela constrição do nervo ciático em ratos

Em experimentos preliminares, foi avaliado o desenvolvimento da sensibilidade a um estímulo térmico e a um mecânico induzida pela ligadura de nervo a cada 48 h. A hiperalgesia térmica foi avaliada por meio da aplicação de uma fonte radiante de luz infravermelha no centro da superfície plantar da pata direita posterior de ratos, usando um equipamento digital (Figura 3; Plantar Test, modelo 7371, Ugo Basile, Comerio, Itália). A intensidade do estímulo foi ajustada de modo que a latência para a retirada da pata fosse de aproximadamente 10 s e o tempo de corte foi de 20 s para evitar lesão tecidual. As determinações da latência para retirada foram feitas em triplicata, com um intervalo de ao menos 20 s entre as leituras de cada animal. Esse método foi originalmente proposto por Hargreaves e colaboradores (1988).



Figura 3. Aparato utilizado para a avaliação de hiperalgesia térmica.

4.4 Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em ratos ou camundongos

A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Modelo EFF 301, Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), coloquialmente chamado de “von Frey eletrônico”. Esse equipamento permite a determinação da latência para a retirada da pata e a resposta é expressa em gramas. Uma ponteira de polipropileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada gradualmente, de baixo para cima, no centro da superfície plantar da pata posterior direita dos animais colocados sobre uma grade (Figura 4). Quando a pata foi retirada, resultado indicando o limiar tátil para retirada, expresso no visor, foi anotado. O limiar para essa resposta foi determinado após cinco (ratos) ou nove (camundongos) repetições e, então, o valor médio entre as determinações foi calculado.

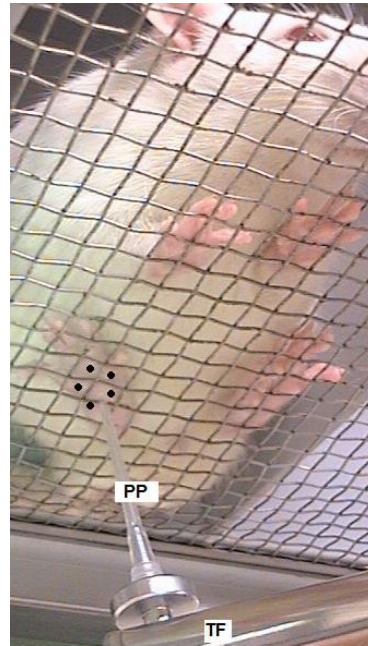


Figura 4. Aparato utilizado para a avaliação dealodínia mecânica. PP - ponteira de polipropileno; TF - transdutor de força. O sítio de estimulação é o centro delimitado pelos pontos pretos.

4.5 Extração de DRG's para determinação da translocação de NF- κ B por meio de *Western blot*

Os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de deslocamento cervical. DRG's adjacentes aos segmentos espinhais L4 e L5 ipsilaterais à constrição do nervo ciático foram imediatamente retirados e armazenados em nitrogênio líquido.

4.6 Preparação de extratos proteicos nucleares das células dos DRG's

A frascos de 2 ml contendo dois DRG's (L4 + L5), foram adicionados 500 μ l de solução tampão RSB 1X (Tris pH 7,4, 10 mM; NaCl, 10 mM; MgCl₂, 3 mM; NaN₃, 0,5 M; DTT, 1 M; PMSF, 200 mM; EGTA, 50 mM; leupeptina, 5 μ g/L; aprotinina, 2,7 μ g/l; DTT, 0,5 mM; NaF, 0,5 M), sendo estes então macerados utilizando um

homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax[®], Campinas, SP, Brasil) por aproximadamente 1 min. Após homogeneização, foram adicionados mais 500 µl do mesmo tampão e foi feita agitação em vórtex. O tecido homogeneizado foi colocado em gelo por 15 min. Quando o tecido não tinha sido completamente homogeneizado, foi feita breve centrifugação (10 s, 1000 rpm) e procedeu-se a extração com o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 100 µl de uma solução de Triton[®] X-100 a 5% e a mistura foi invertida delicadamente por três vezes e deixada em banho de gelo por 5 min. Procedeu-se a centrifugação (6000 rpm, 6 min, 4 °C) e, em seguida, o sobrenadante contendo o extrato proteico citoplasmático foi descartado. O sedimento contendo o extrato nuclear foi lavado com tampão RSB 1X e centrifugado (9000 rpm, 6 min, 4 °C). Todo o sobrenadante foi removido para garantir a retirada do extrato citoplasmático e, então, o extrato nuclear foi ressuspensão em 100 µl de tampão C (NaCl 0,42 M; MgCl₂, 1 M; glicerol 25% v/v, HEPES pH 7,4, 20 mM, EDTA, 0,2 mM; NaN₃, 0,5 M; DTT, 1 M; PMSF, 200 mM; leupeptina, 5 µg/L; aprotinina, 2,7 µg/l), à temperatura de 4 °C. A suspensão resultante foi mantida em gelo por 45 min, período durante o qual esse líquido foi agitado em vórtex por 15 s a cada 5 min. Em seguida, foi realizada a centrifugação e o sobrenadante foi armazenado à - 70 °C. Esses procedimentos foram realizados como previamente descritos (Dignam, Lebovitz *et al.*, 1983), com pequenas modificações (Souza, Amaral *et al.*, 2009).

4.7 Avaliação da translocação de NF-κB (p65/RelA) por meio de *Western blot*

Os extratos nucleares das células dos DRG's foram obtidos como descrito na seção anterior. A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método de

Bradford utilizando o *kit* “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Amostras contendo 15 µg de proteínas totais foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS 10% a 100 V por 1,5 h e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Após transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S para visualização da eficiência da mesma, além da informação prévia sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas, sendo posteriormente bloqueadas por 1 h à temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1X contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado. Após serem lavadas por três vezes em PBS 1X contendo 0,1% de Tween-20, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-p65/RelA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA; diluição 1:1000) ou anti-β-actina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA; diluição 1:5000) em solução de PBS/Tween contendo albumina sérica bovina (5% m/v). As membranas foram lavadas novamente em PBS/Tween por três vezes e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo apropriado (“anticoelho” ou “anticamundongo”) ligado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:3000 em solução PBS/Tween contendo leite em pó desnatado (5% m/v). Após nova série de lavagens (três vezes em PBS/Tween), as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), expostas contra filme de raio X durante períodos que variaram de 30 s a 10 min, e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak, Rochester, NY, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Os *immunoblots* das membranas com o anticorpo anti-β-actina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foram utilizados como controle interno da quantidade de extratos proteicos aplicados às diferentes canaletas. As expressões de p65/RelA foram semiquantificadas utilizando o

programa ImageJ 1.46r (NIH, EUA), sendo os valores normalizados pelos valores da β -actina em cada amostra. Os resultados foram expressos pela divisão entre os valores de p65/RelA e os de β -actina.

4.8 Culturas celulares e testes *in vitro*

Culturas primárias de células microgлияis foram estabelecidas a partir de córtices de ratos Wistar neonatais (um dia após o nascimento), como previamente realizado (De Oliveira, Candelario-Jalil *et al.*, 2008; Bastos, De Oliveira *et al.*, 2011). O marcador imuno-histoquímico ED-1 (Serotech, Raleigh, NC, EUA; diluição 1:1000) foi usado para determinar a pureza da cultura (pelo menos 98% de células microgлияis). Sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 10.000g por 10 min e, então, as concentrações de PGE₂ foram determinadas por meio de imunoenensaio enzimático (Biotrend, Colônia, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Padrões de 39 a 2500 pg/ml foram usados. A sensibilidade do teste foi de 36,2 pg/ml.

Como previamente descrito (Hutchinson, Zhang *et al.*, 2008), células renais embrionárias (HEK293) foram estavelmente transfectadas para expressar o receptor hTLR4 e usadas para avaliar a sinalização via esse receptor. As células HEK293 transfectadas com hTLR4 têm expressão alta desse receptor, bem como das moléculas acessórias MD-2 e CD14, e da de um gene aprimorado sensível à fosfatase alcalina sob o controle de um promotor induzível por fatores de transcrição tais como NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1; Invivogen, San Diego, CA, EUA). Uma linhagem celular paralela (HEK293-hTLR2) foi empregada no presente estudo para avaliar a atividade de derivados de tetraciclina sobre hTLR2. As atividades de

TLR2 ou TLR4 nessas células foram avaliadas por meio da expressão da proteína fosfatase alcalina secretada, a qual é produzida como consequência da ativação dos receptores TLR2 e TLR4 (Hutchinson, Zhang *et al.*, 2008; Kwok, Hutchinson *et al.*, 2012; Lewis, Loram *et al.*, 2012).

A viabilidade celular após os tratamentos de células microgлияis primárias de ratos e células HEK293 foi avaliada pelo teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; Sigma-Aldrich), como previamente descrito (Mosmann, 1983). MTT reage com enzimas mitocondriais de células bioquimicamente funcionais, gerando cristais de formazan, que podem ter a sua absorbância lida para semiquantificação de células viáveis. Essa reação ocorre independentemente da integridade estrutural das células, o que representa uma vantagem desse método em comparação com outros usados para avaliar viabilidade celular.

4.9 Drogas, preparo de soluções, vias de administração e protocolos experimentais

Fosfato de sódio de dexametasona – um sal solúvel em solução fisiológica – foi fornecido pela Sigma-Aldrich. Acetato de dexametasona foi incorporado ao polímero dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) e fornecido pela Doutora Sílvia Ligório Fialho, da Fundação Ezequiel Dias. Essa preparação farmacêutica foi originalmente delineada para implantação intraocular em coelhos (Fialho e da Silva Cunha, 2005; Fialho, Rego *et al.*, 2006). Portanto, ainda não há informações sobre o perfil farmacocinético dessa preparação farmacêutica após o tratamento realizado no presente estudo, ou seja, após administração intramuscular em ratos. Esses

implantes são cilíndricos, com aproximadamente 1 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento, massa média de 6 mg, contendo 40% de acetato de dexametasona e 60% de PLGA, portanto, 2,4 mg de acetato de dexametasona em média.

Quando drogas ou os seus respectivos veículos foram administrados por via intraneural no nervo ciático ou por via perineural sobre o nervo, as duas ligaduras da extremidade foram feitas inicialmente, então a administração foi feita entre elas e, finalmente, as duas últimas ligaduras foram feitas (Wagner, Janjigian *et al.*, 1998). As administrações foram feitas utilizando uma agulha de 30 *gauge* (3 X 13,3 mm), levemente curvada na extremidade próxima ao bisel, e conectada a uma seringa Hamilton (Reno, Nevada, EUA) por meio de um tubo de polietileno-10.

Cetamina e xilazina foram adquiridas da empresa Vetbrands (Paulínia, SP, Brasil). Foram também usados: cloridrato de minociclina (Sigma-Aldrich); LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich); PAM3CSK4 (lipopeptídeo sintético estável que mimetiza exotoxinas bacterianas, formado por três unidades de ácido palmítico, um resíduo de cisteína, um de serina e quatro de lisina; Sigma-Aldrich) e dimetilsulfóxido (DMSO; AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemanha) com grau de pureza apropriado para uso em cultura celular. PMIN foi preparada como descrito previamente (Lertvorachon, Kim *et al.*, 2005) e fornecida para o estudo pelos Doutores Yasuo Konishi e Suwatchai Jarussophon, do Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada (Montreal, Quebec, Canadá). Durante o estudo, análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton e espectroscopia de massa foram feitas e indicaram alta estabilidade química da PMIN (anexos 3 e 4). Soluções e suspensões foram preparadas em salina isotônica imediatamente antes de injeções i.p. (10 ml/kg) ou em salina tamponada com fosfato (PBS, na sigla em inglês) antes das adições em culturas celulares.

Minociclina (1, 10 ou 100 μM), PMIN (0,95, 9,50 ou 95,00 μM) ou PBS foram adicionados ao meio de cultura celular (1% v/v) 30 min antes de LPS (10 ng/ml em células microgliais ou 0,01-100 ng/ml para células HEK293-hTLR4) ou PAM3CSK4 (1, 10 ou 100 ng/ml; células HEK293-hTLR2) e, então, as células foram incubadas durante 24 h antes dos testes. DMSO (5% v/v), usado nos testes de viabilidade celular como controle positivo, foi adicionado aos meios de cultura celular, os quais também foram incubados por 24 h. Antes dessa incubação, as células já haviam sido incubadas por 48 h, com uma densidade inicial de $2 \times 10^5/\text{ml}$.

Para avaliar a viabilidade celular após os tratamentos farmacológicos mencionados, foi realizado o teste de MTT. Foram adicionados 20 μl (1:10) de uma solução contendo MTT (5 mg/ml) às células microgliais ou células HEK293 pré-incubadas como descrito acima e, então, as células foram incubadas por 4 h à 37 °C. Em seguida, foram adicionados 100 μl de DMSO a cada poço para dissolução dos cristais de formazan produzidos pela reação de redução do MTT por enzimas mitocondriais. Trinta minutos após adição de DMSO, tempo necessário para dissolução completa dos cristais, a absorbância foi medida a 570 nm.

4.10 Análise estatística

Análise de variância em duas vias, seguida do teste Bonferroni foi realizada para avaliar os resultados dos testes comportamentais (Figuras 1-8; 10 e 11). Para comparação de apenas dois grupos experimentais, foi usado o teste t (Figura 9d). Quando apropriado, análise de variância simples foi utilizada, seguida do teste Newmann-Keuls (Figuras 9b; 12-15). Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos em comparações entre médias. O programa Prism[®] 5

(GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para tais análises. Para facilitar a leitura, dados estatísticos detalhados foram incluídos na legenda das figuras, mas não na seção 'Resultados'.

5 RESULTADOS

5.1 Hiperalgesia térmica e alodínia mecânica induzidas pela constrição do nervo ciático em ratos

Inicialmente, foi avaliado o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e da alodínia mecânica referidas à pata ipsilateral à constrição do nervo. A sensibilização para estímulo térmico foi detectável três dias após a constrição (Figura 5a), enquanto a sensibilização para estímulo mecânico se desenvolveu após sete dias (Figura 5b).

5.2 Efeitos induzidos pela dexametasona (via intraneural ou perineural) sobre a hiperalgesia e a alodínia induzidas pela constrição do nervo ciático em ratos

Foi testado o efeito induzido pela injeção de uma droga anti-inflamatória e imunossupressora para avaliar o grau de contribuição da inflamação para a gênese da dor neuropática experimental. Assim, foi avaliado o efeito induzido pela dexametasona (26 ou 65 µg, no momento da constrição) sobre o desenvolvimento da sensibilização para os estímulos térmico e mecânico. Observou-se que a injeção intraneural de dexametasona (65, mas não 26 µg) retardou a sensibilização para ambos os estímulos (Figuras 6a e 6b). Por outro lado, os resultados indicam que a administração perineural de dexametasona não alterou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica (Figura 7a) ou alodínia mecânica (Figura 7b) induzidas pela constrição do nervo ciático.

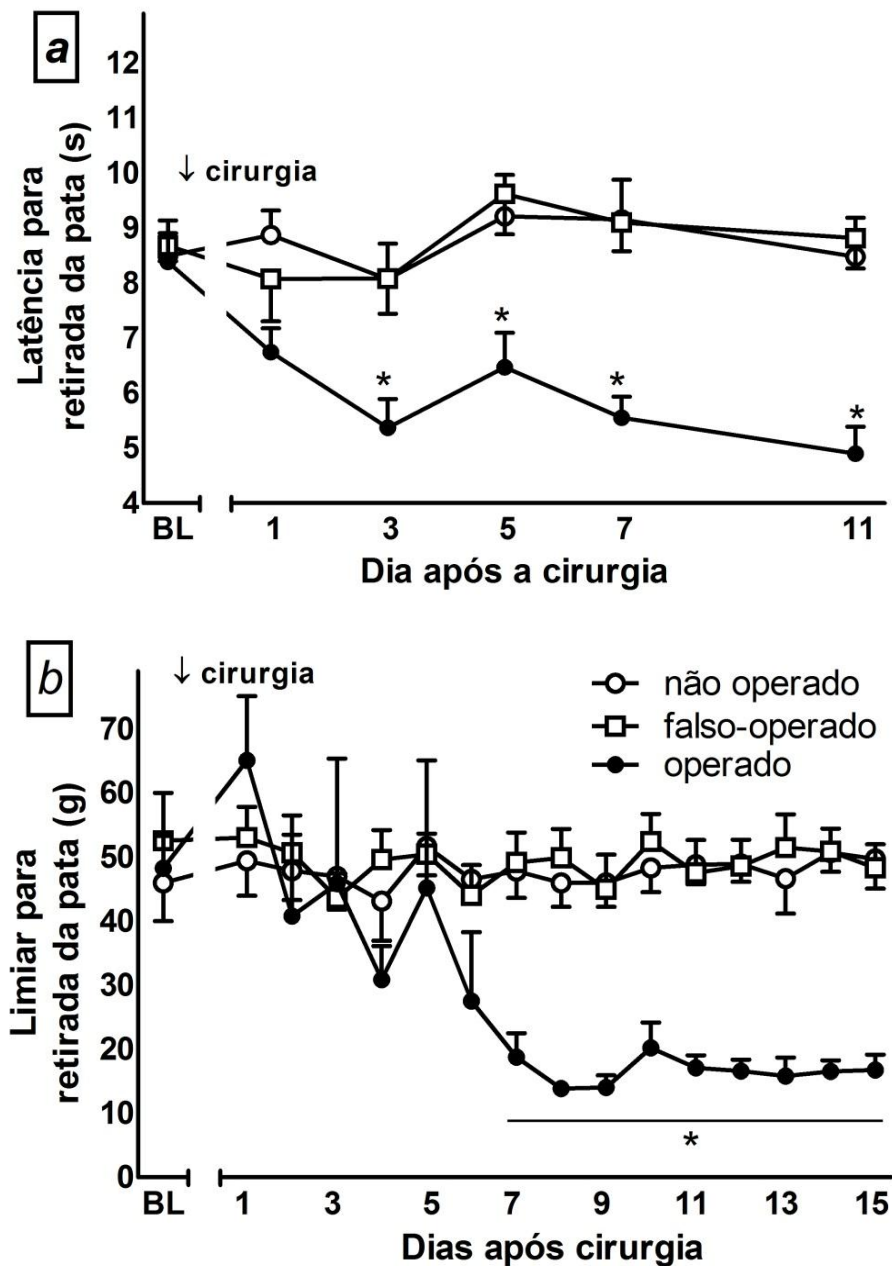


Figura 5. Efeito induzido pela constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (a) e alodínia mecânica (b) em ratos. * indica diferença estatística em comparação com o grupo não operado ($P < 0,05$). BL: determinação basal. (a) Efeito da cirurgia: $F_{(2,100)} = 21,68$, $P < 0,001$; Efeito do tempo: $F_{(5,100)} = 2,64$, $P = 0,0275$; Interação entre os fatores: $F_{(10,100)} = 1,87$, $P = 0,0588$). (b) Efeito da cirurgia: $F_{(2,240)} = 10,66$, $P = 0,0011$; efeito do tempo: $F_{(15,240)} = 3,95$, $P < 0,001$; interação entre os fatores: $F_{(30,240)} = 3,01$, $P < 0,001$. $n = 5-7$.

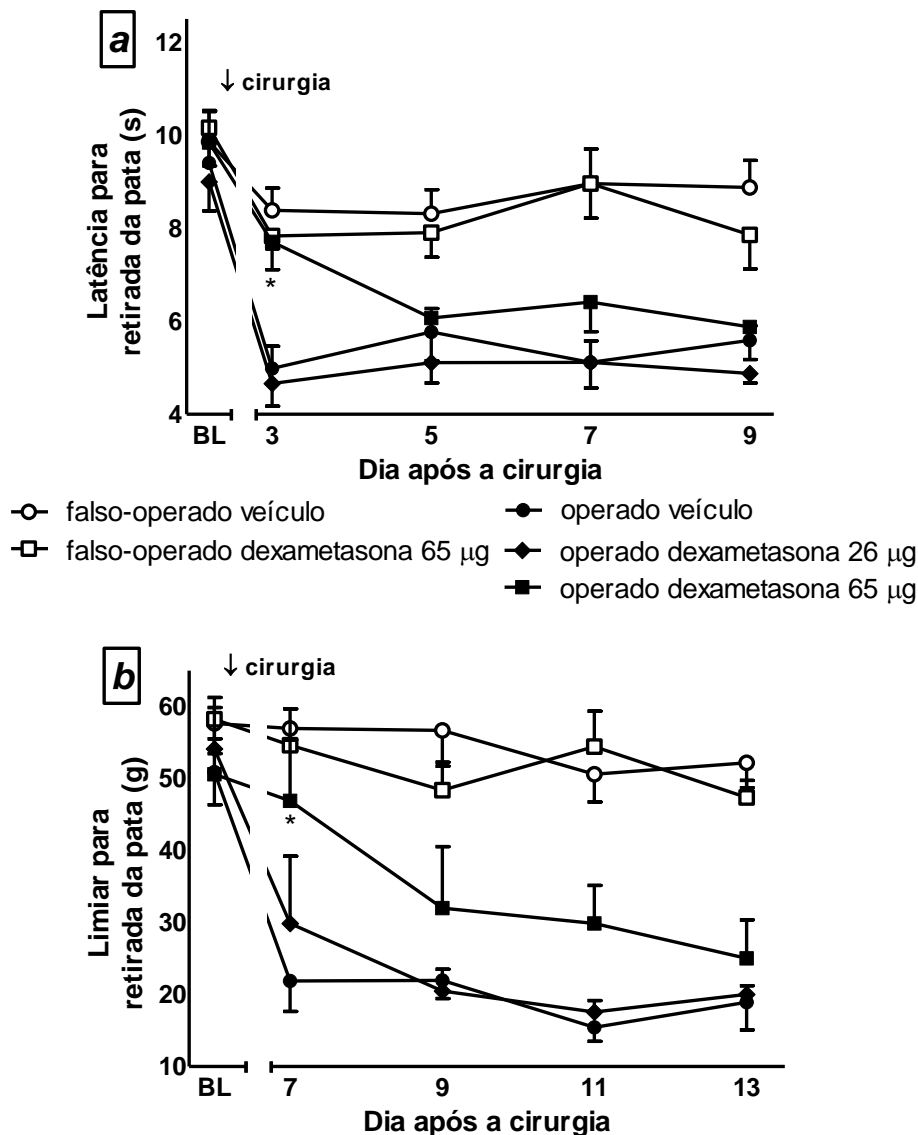


Figura 6. Efeito induzido pela dexametasona (26 ou 65 µg, 10 µl, administração intraneural) no momento da constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (a) e alodínia mecânica (b) em ratos. * indica diferença estatística em comparação com o grupo operado e tratado com veículo ($P < 0,05$). BL: determinação basal. (a) Efeito do tratamento: $F_{(2,68)} = 5,13$, $P = 0,0181$; efeito do tempo: $F_{(4,68)} = 21,08$, $P < 0,0001$; interação entre os fatores: $F_{(8,68)} = 0,88$, $P = 0,5346$. (b) Efeito do tratamento: $F_{(1,52)} = 4,82$, $P = 0,0468$; efeito do tempo: $F_{(4,52)} = 18,94$, $P < 0,001$; interação entre os fatores: $F_{(4,52)} = 3,01$, $P = 0,0261$). Animais falsamente operados não foram afetados pelos tratamentos ao longo do tempo avaliado (todos os valores P superiores a 0,05). $n = 5-8$.

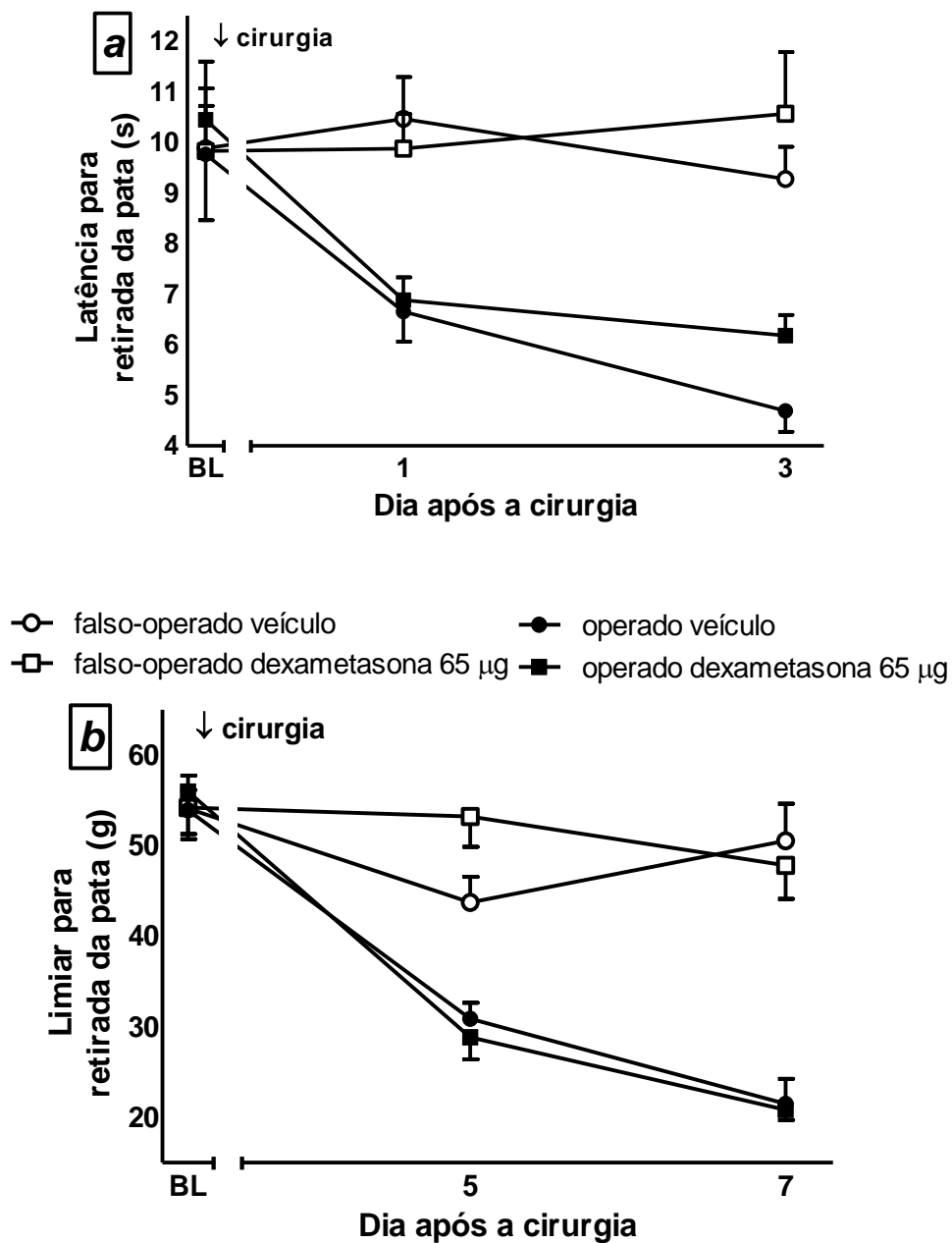


Figura 7. Efeito induzido pela dexametasona (65 µg, 10 µl, administração perineural) no momento da constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de hiperalgesia térmica (a) e alodínia mecânica (b) em ratos. BL: determinação basal. (a) Efeito do tratamento: $F_{(1,22)} = 1,28$, $P = 0,2814$; efeito do tempo: $F_{(2,22)} = 17,91$, $P < 0,0001$; interação entre os fatores: $F_{(2,22)} = 0,31$, $P = 0,7342$. (b) efeito do tratamento: $F_{(1,22)} = 0,01$, $P = 0,9415$; efeito do tempo: $F_{(2,22)} = 78,72$, $P < 0,0001$; interação entre os fatores: $F_{(2,22)} = 0,27$, $P = 0,7628$. Animais falsamente operados não foram afetados pelos tratamentos ao longo do tempo avaliado (todos os valores P superiores a 0,05). $n = 7-8$.

5.3 Efeito induzido pela dexametasona (implante perineural no momento ou 12 dias após a constrição) sobre a alodínia mecânica e o ganho de massa corporal após constrição do nervo ciático em ratos

O implante perineural para liberação modificada contendo 2,4 mg de dexametasona (dia 0) retardou o desenvolvimento de alodínia após constrição do nervo ciático em ratos (Figura 8a) por um período superior a duas semanas. No entanto, não se observou qualquer alteração no limiar para retirada de pata durante uma semana (avaliação realizada até dia 19) quando a implantação foi realizada 12 dias após a constrição, quando a alodínia já estava plenamente estabelecida (Figura 8b).

A colocação do implante de dexametasona no dia da constrição do nervo ciático impediu o ganho de massa corporal, mas a colocação do implante contendo apenas PLGA não induziu tal efeito. As massas corporais basais médias foram 249,0 g (PLGA apenas) e 261,1 g (dexametasona). Cinco semanas após a implantação de PLGA ou dexametasona, as massas corporais médias foram 377,0 e 258,7 g, respectivamente.

Quando a implantação foi realizada no 12º dia após a constrição, o tratamento com dexametasona impediu ganho de massa corporal até o 19º dia após a constrição, mas a colocação do implante contendo apenas PLGA não induziu tal efeito. As massas corporais no 12º dia foram 285,0 g (PLGA apenas) e 287,5 g (dexametasona). No 19º dia, ou seja, sete dias após a implantação de PLGA ou dexametasona, as massas corporais médias foram 309,2 e 283,0 g, respectivamente.

5.4 Efeito induzido pela dexametasona (implante perineural no momento da constrição) sobre a translocação de NF- κ B em células dos DRG's induzida pela constrição do nervo ciático em ratos

Como esperado, houve aumento da translocação de NF- κ B (p65/RelA) em células dos DRG's (segmentos L4 e L5) em ratos no 15^o dia após a constrição do nervo ciático em comparação com os animais não operados ou com os falsamente operados (Figuras 9a e 9b).

Considerando a importância do fator de transcrição NF- κ B para a expressão de mediadores inflamatórios e o efeito já relatado de anti-inflamatórios esteroides sobre a sua translocação, investigamos a associação entre a prevenção de desenvolvimento de alodínia e efeito antineuroinflamatório periférico. De fato, verificou-se que os ratos submetidos à implantação de dexametasona (2,4 mg) no momento da constrição tiveram a translocação reduzida em comparação com aqueles que receberam o implante contendo apenas o veículo (Figuras 9c e 9d).

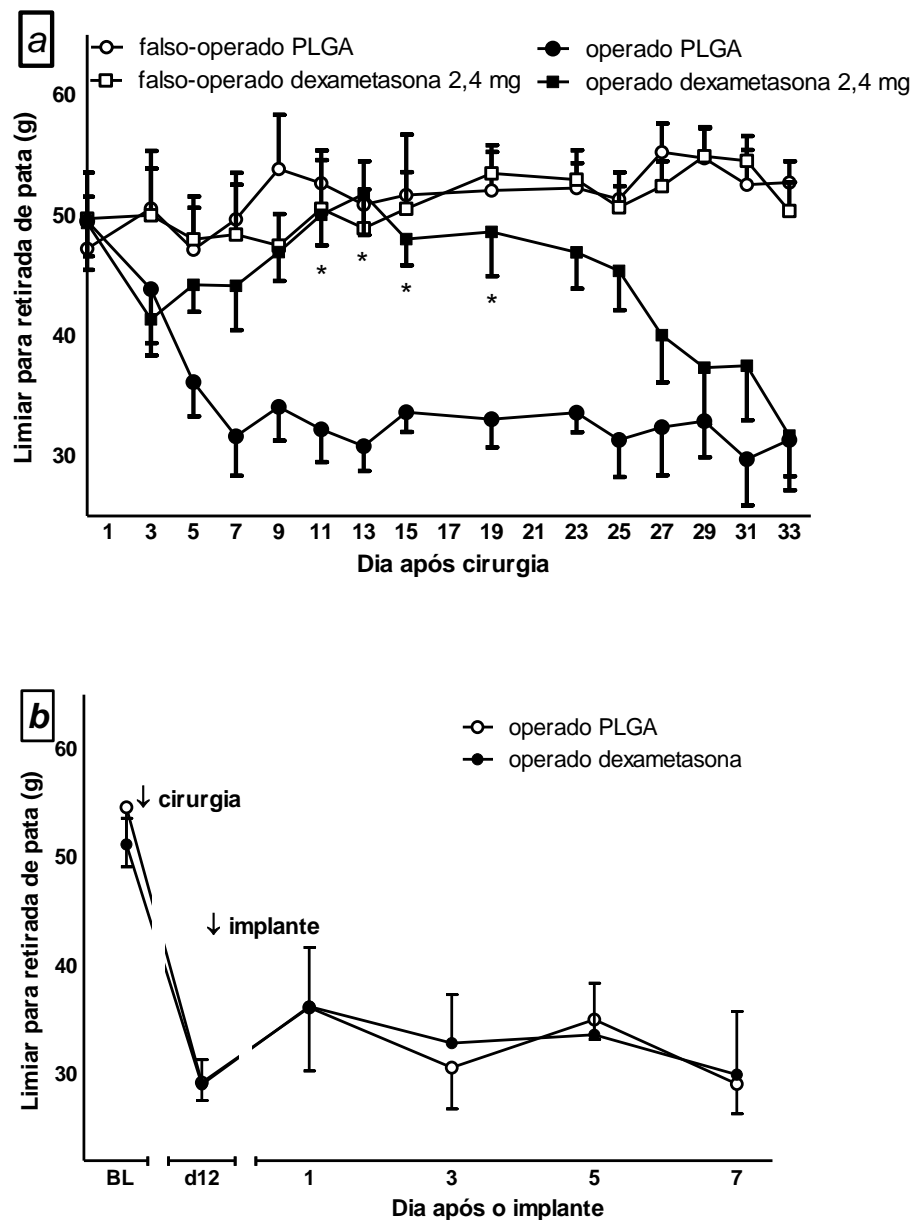


Figura 8. Efeito induzido pela dexametasona (implante perineural contendo 2,4 mg no momento da constrição do nervo ciático (a) ou no 12^o dia (b) após essa cirurgia) sobre o desenvolvimento de alodínia mecânica em ratos. BL: determinação basal. * indica diferença estatística em comparação com o grupo operado e tratado com veículo. (a) Efeito do tratamento: $F_{(1,224)} = 26,11$, $P < 0,001$; efeito do tempo: $F_{(14,224)} = 3,81$, $P < 0,001$; interação entre os fatores: $F_{(14,224)} = 2,54$, $P = 0,0022$). Animais falsamente operados não foram afetados pelos tratamentos ao longo do tempo avaliado (todos os valores P superiores a 0,05). (b) Todos os valores P superiores a 0,05. $n = 6-7$.

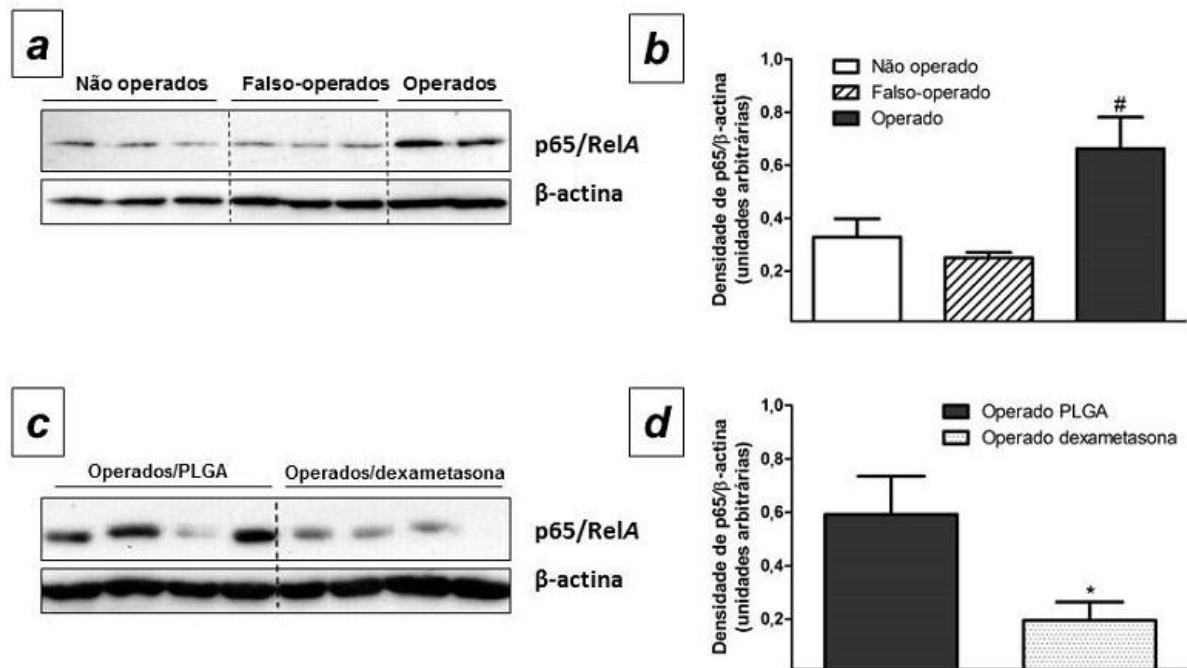


Figura 9. Efeito induzido pela constrição do nervo ciático sobre a translocação de NF- κ B em células dos DRG's (extratos nucleares dos segmentos L4 e L5) no 15^o dia após a constrição (a e b) e efeito induzido pela dexametasona (implante perineural contendo 2,4 mg no momento da constrição do nervo ciático) sobre essa translocação (c e d) no mesmo momento. (a e c) *Immunoblots*. (c e d) Análises densitométricas semiquantitativas dos *immunoblots* correspondentes. (c) # indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo 'operado' e os grupos 'não operado' e 'falso-operado' ($P < 0,05$). (d) * indica diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P < 0,05$). $n = 2-4$.

5.5 Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos

Inicialmente, foi avaliado o curso temporal do desenvolvimento de alodínia após a constrição de nervo ciático em camundongos. A alodínia foi observada uma semana após a constrição do nervo ciático em camundongos e se manteve ainda mais consistente ao longo das duas semanas subsequentes (Figura 10).

5.6 Efeitos induzidos pela minociclina ou pela PMIN sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático de camundongos

Em camundongos com alodínia plenamente estabelecida, a administração i.p. de minociclina (100 mg/kg) ou PMIN (23,75; 47,50 ou 95,00 mg/kg) no 21º dia após a cirurgia induziu efeito antialodínico (Figuras 11a e 11b, respectivamente). O efeito antialodínico induzido pela PMIN foi claramente dependente da dose.

5.7 Efeito induzido pela PMIN sobre a produção de PGE₂ por células microgliais primárias de ratos estimulada com LPS

Foi observado que a PMIN (0,95, 9,50 ou 95,00 µM) reduziu a produção de PGE₂ por células microgliais primárias de ratos estimuladas com LPS de uma maneira dependente da concentração (Figura 12). O efeito induzido pela PMIN não foi comparado com aquele induzido pela minociclina no presente estudo porque este já foi demonstrado anteriormente (Bastos, de Oliveira *et al.*, 2011).

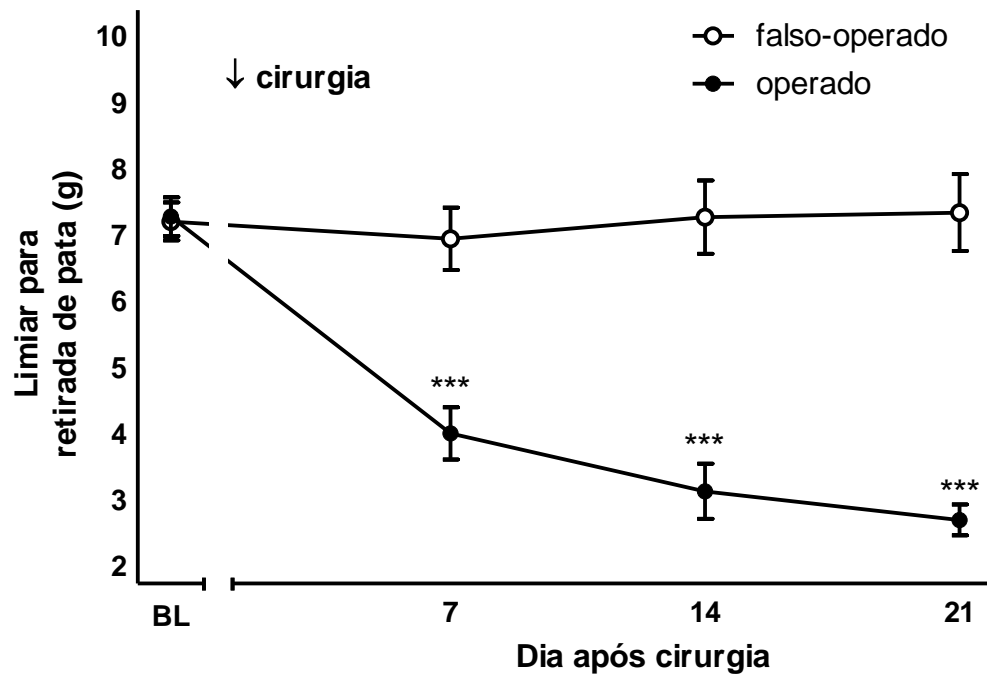


Figura 10. Efeito induzido pela constrição do nervo ciático sobre o desenvolvimento de alodínia mecânica em camundongos. *** indica diferença estatística em comparação com o grupo falso-operado ($P < 0,001$). BL significa determinação basal. Efeito da cirurgia: $F_{(1,30)} = 105,95$, $P < 0,001$; Efeito do tempo: $F_{(3,30)} = 11,49$, $P < 0,001$; Interação entre os fatores: $F_{(3,30)} = 12,29$, $P < 0,001$). $n = 6$.

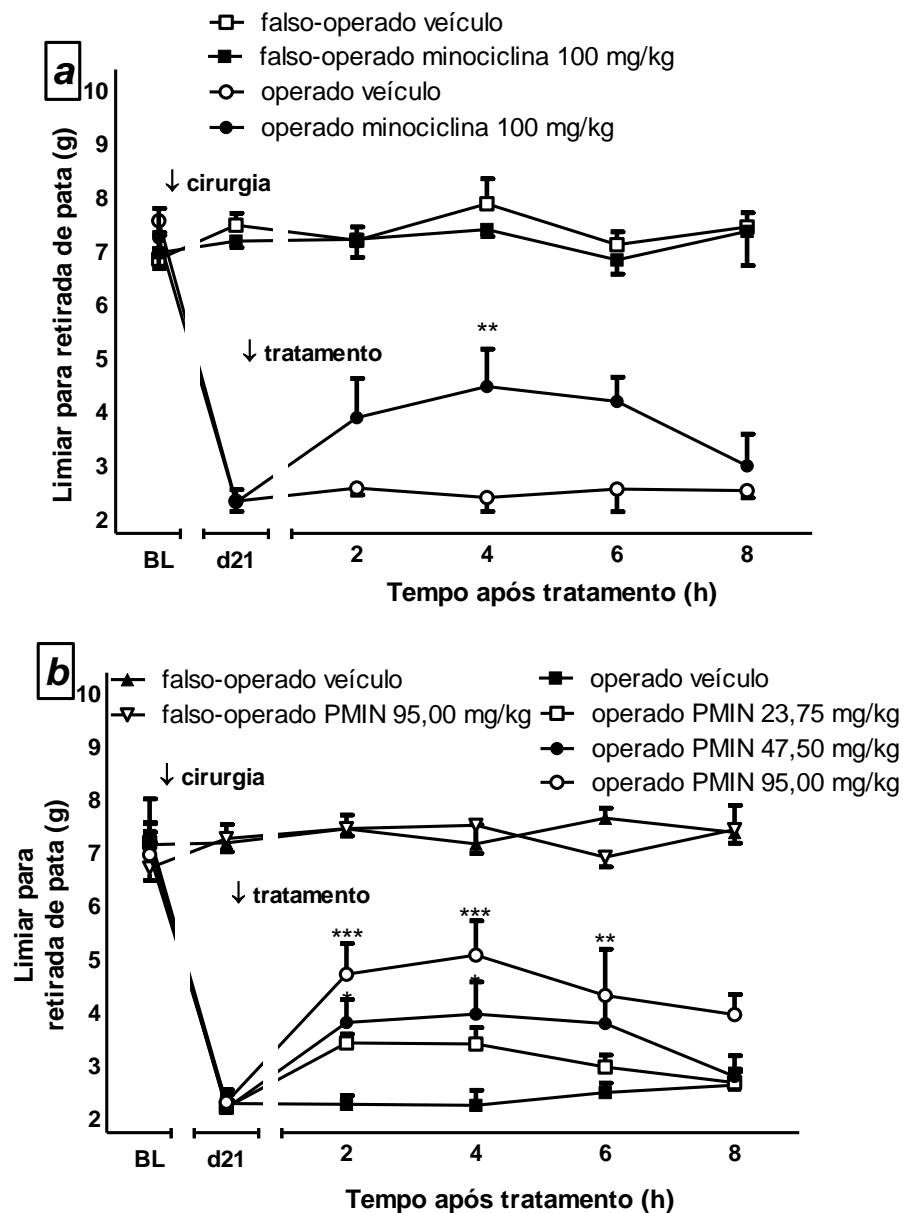


Figura 11. Efeito induzido pela minociclina (a; 100 mg/kg) ou pela 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina (b; PMIN; 23,75, 47,50 ou 95,00 mg/kg) sobre a alodínia mecânica 21 dias após a constrição do nervo ciático em camundongos. (a) Efeito do tratamento, $F_{(1,40)} = 5,15$, $P = 0,0467$; efeito do tempo, $F_{(4,40)} = 4,56$, $P = 0,0039$; interação, $F_{(4,40)} = 3,74$, $P = 0,0112$). (b) Efeito do tratamento, $F_{(3,80)} = 5,60$, $P = 0,0059$; efeito do tempo, $F_{(4,80)} = 14,90$, $P < 0,001$; interação, $F_{(12,80)} = 2,71$, $P = 0,0041$). Animais falsamente operados não foram afetados pelos tratamentos. BL = determinação basal. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo operado e tratado com veículo, após análise de variância de duas vias seguida do teste de Bonferroni, sendo tempo e tratamento os fatores principais. $n = 6$.

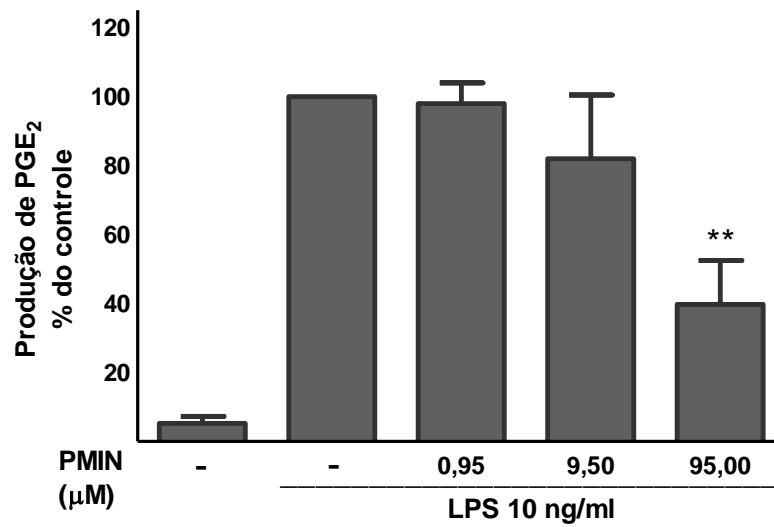


Figura 12. Efeito induzido pela 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominciclina (PMIN; 0,95; 9,50 ou 95,00 μM) sobre a produção de prostaglandina E₂ por células microgliais de ratos, induzida por LPS. PMIN (ou veículo) foi adicionada ao meio celular 30 min antes do LPS (10 ng/ml, 24 h de incubação). ** P < 0,01 em comparação com o grupo tratado apenas com LPS. n = 4 experimentos independentes.

5.8 Efeito induzido pela minociclina ou pela PMIN sobre a sinalização intracelular via hTLR2 ou TLR4 em células HEK293 transfectadas

Tanto a minociclina (1, 10 ou 100 μM) quanto a PMIN (0,95; 9,50 ou 95,00 μM) inibiram a sinalização intracelular via TLR2 ou TLR4 em células HEK293 transfectadas com hTLR2 ou com hTLR4, respectivamente, como avaliado por teste da fosfátase alcalina secretada (Figuras 13 e 14).

5.9 Efeito induzido pela minociclina ou pela PMIN sobre a viabilidade de células microgliais primárias de ratos ou HEK293 transfectadas

É importante ressaltar que citotoxicidade parece não ser a razão pela qual ambos os derivados de tetraciclina inibiram respostas inflamatórias *in vitro*, uma vez que esses tratamentos não afetaram a viabilidade celular, como avaliado pelo teste de MTT. Por outro lado, DMSO 5% v/v, usado como controle positivo, reduziu a viabilidade quase completamente (Figura 15).

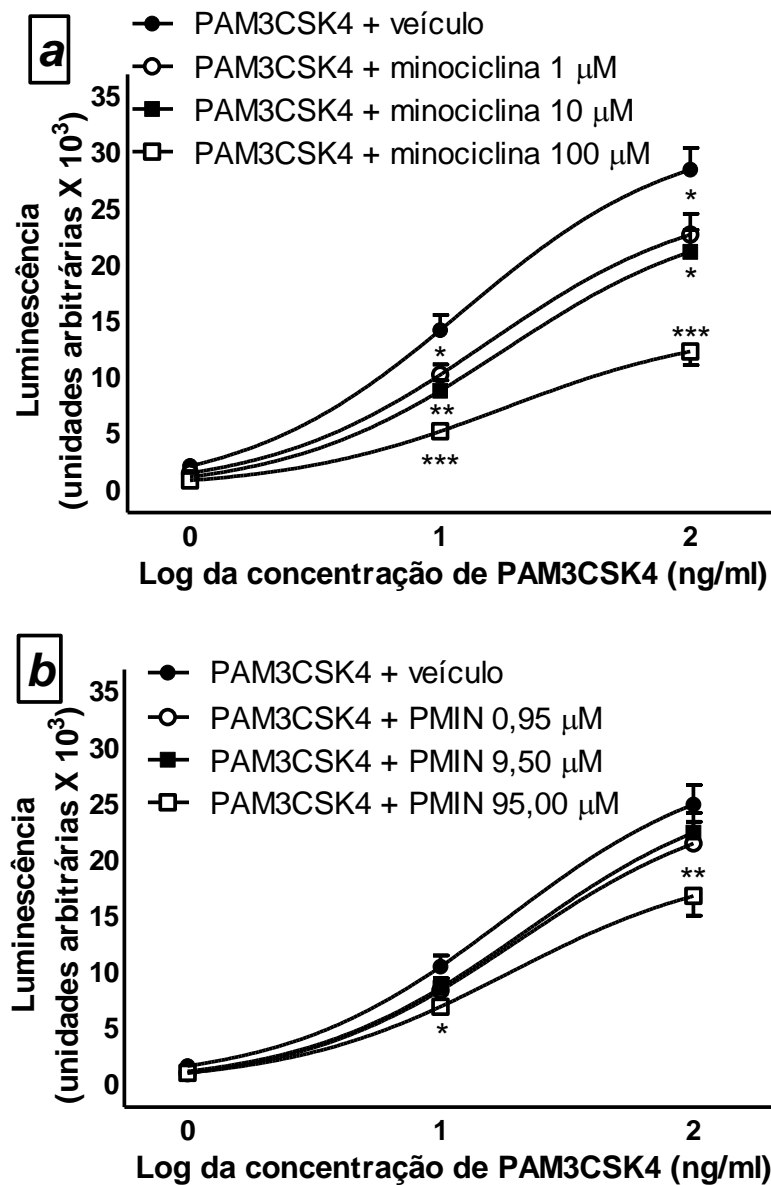


Figura 13. Efeito induzido pela minociclina (a) ou pela 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina (PMIN; b) sobre a sinalização via hTLR2 induzida por PAM3CSK4 em células HEK293-hTLR2, avaliado por meio do ensaio de fosfatase alcalina secretada. Minociclina ou PMIN (ou veículo) foram adicionadas à cultura celular 30 min antes do composto PAM3CSK4 (1, 10 e 100ng/ml, 24 h de incubação). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em comparação com o controle (PAM3CSK4). $n = 4$ experimentos independentes.

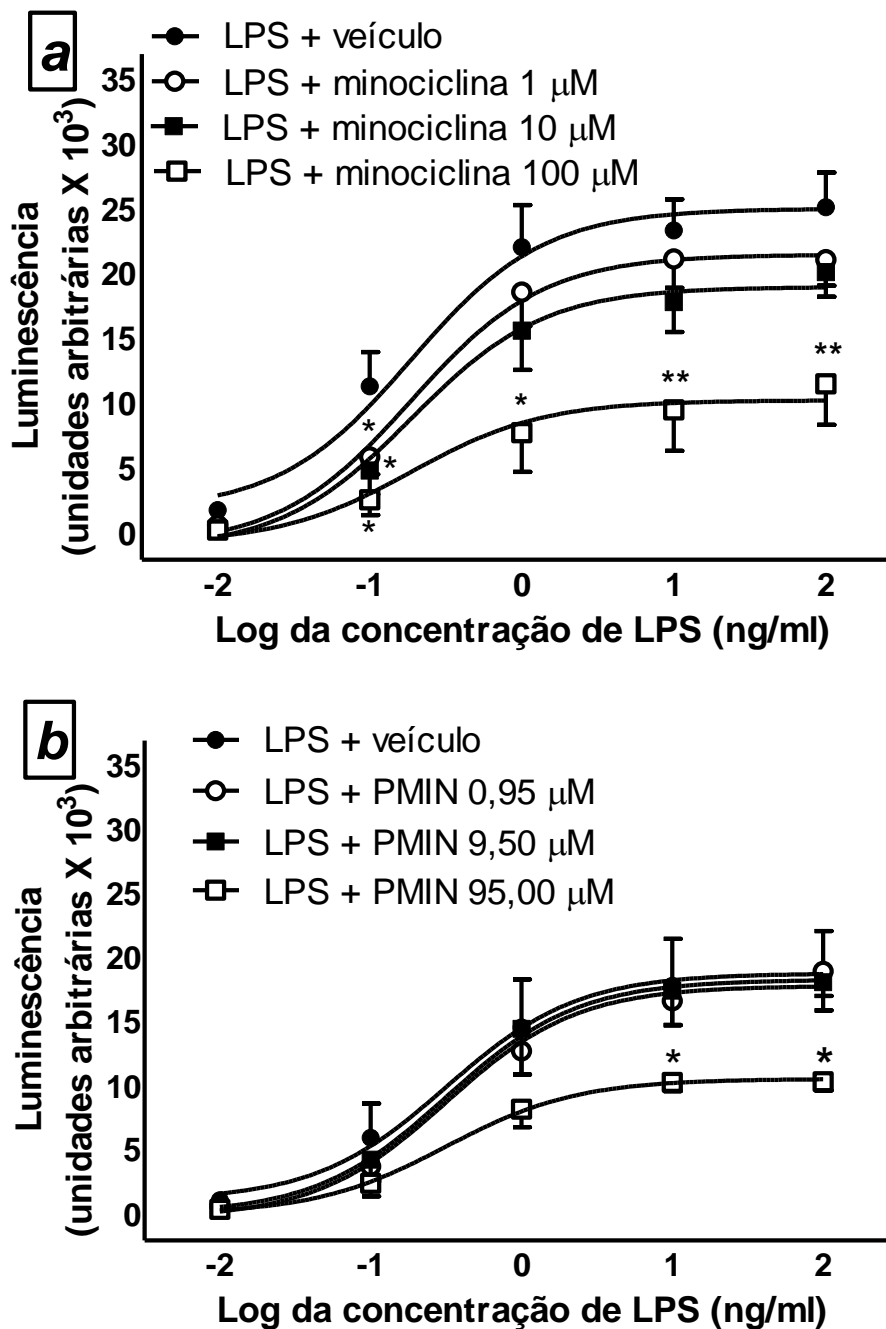


Figura 14. Efeito induzido pela minociclina (a) ou pela 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina (PMIN; b) sobre a sinalização via hTLR4 induzida por LPS em células HEK293-hTLR4, avaliado por meio de ensaio de fosfatase alcalina secretada. Minociclina ou PMIN (ou veículo) foram adicionadas à cultura celular 30 min antes do LPS (1, 10 e 100 ng/ml, 24 h de incubação). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em comparação com o controle (LPS). $n = 4$ experimentos independentes.

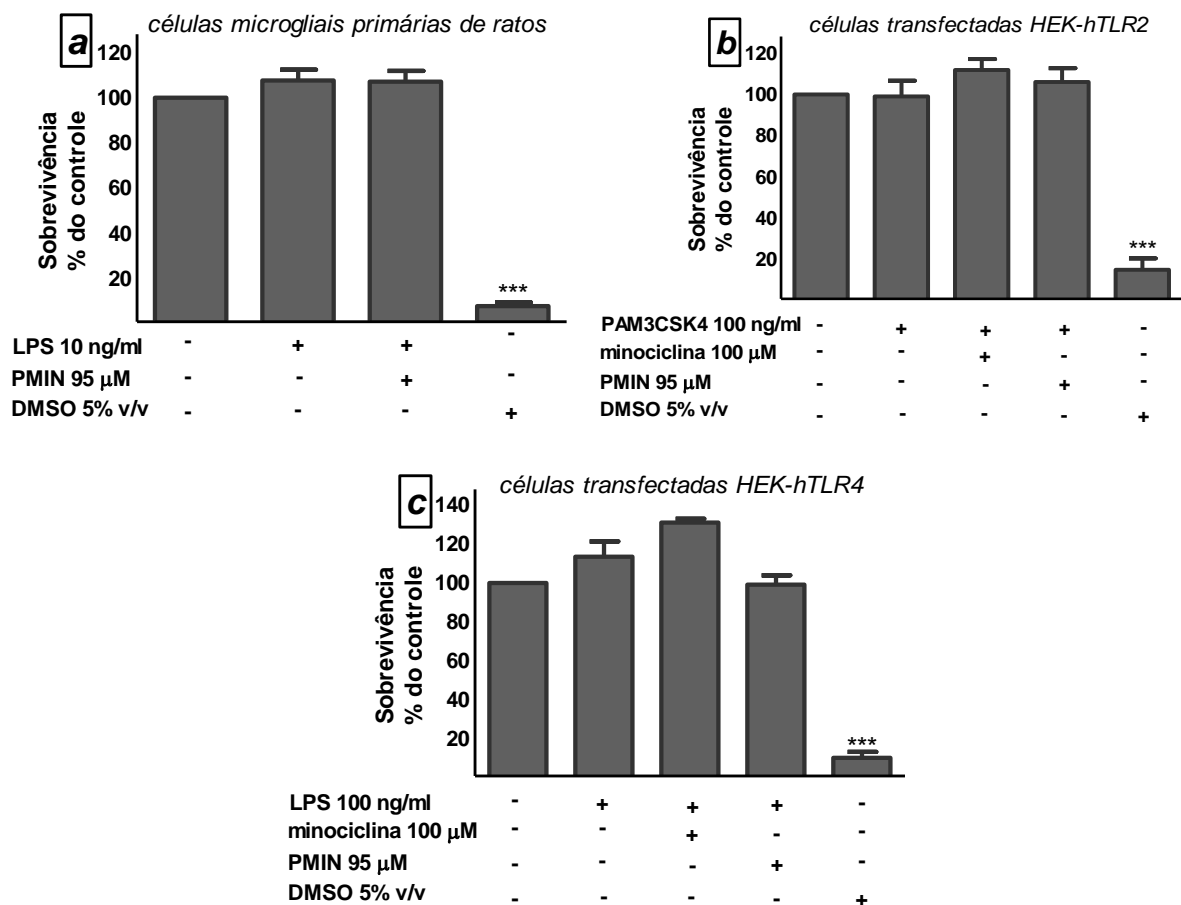


Figura 15. Efeito induzido pela 12S-hidróxi-1,12-pirazolinominociclina (PMIN; a, b e c) ou pela minociclina (b e c), em associação ou não com LPS ou PAM3CSK4, sobre a viabilidade de células microgliais ou células HEK293 transfectadas com hTLR2 ou hTLR4. Minociclina ou PMIN (ou veículo) foram adicionadas ao meio de cultura celular 30 min antes do LPS (a; 10 ng/ml em células microgliais – c; 100 ng/ml em células HEK293-hTLR4, incubação por 24 h) ou PAM3CSK4 (b; 100 ng/ml, células HEK293-hTLR2, incubação por 24 h). Dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v, usado como um controle positivo, reduziu a viabilidade celular ($P < 0,001$ em comparação com a porcentagem do controle). $n = 4$ experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a administração intraneural de dexametasona no momento da constrição do nervo ciático retardou o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e da alodínia mecânica em ratos. Por outro lado, tal efeito não foi observado quando a administração da mesma dose foi realizada pela via perineural. Embora não avaliado neste estudo, supomos que a administração intraneural, mas não a perineural, inibiu a infiltração de células inflamatórias no nervo e pode também ter inibido a produção de mediadores inflamatórios por células de Schwann. É pouco provável que os efeitos anti-hiperalgésico e antialodínico observados após administração intraneural se devam a um efeito sistêmico, uma vez que tais efeitos não foram observados após administração perineural. Já foi demonstrado que a dexametasona tem um tempo de meia-vida de eliminação de 2,3 h após administração intravenosa ou intramuscular em ratos (Samtani e Jusko, 2005). No entanto, parece não haver informação sobre o perfil farmacocinético dessa droga após administração intraneural. Supondo que a dexametasona seja eliminada e biotransformada tão rapidamente após administração intraneural, é muito provável que essa droga já tenha sido eliminada nos dias em que os efeitos anti-hiperalgésico e antialodínico foram observados. Esse resultado é condizente com a demonstração de que o anti-inflamatório esteroide triancinolona, administrado em nervos linguais em furões, reduz potenciais elétricos induzidos, associados com a lesão desse nervo, mesmo quando essa resposta é avaliada três meses após a lesão (Yates, Smith *et al.*, 2004).

Com o objetivo de avaliar se a inibição prolongada da resposta imune/inflamatória retardaria o desenvolvimento da alodínia e da hiperalgesia por um período mais longo do que aquele observado após injeção intraneural, foi feita a implantação perineural de dexametasona para liberação modificada e sistêmica desse fármaco. Uma evidência de que esse tratamento com dexametasona induz efeitos sistêmicos é a observação de que houve atenuação do ganho de massa corporal nos ratos com implante contendo dexametasona ao longo das cinco semanas que sucederam a implantação.

Foi observado um retardo no desenvolvimento da alodínia mecânica quando a implantação foi realizada no momento da constrição. No entanto, reversão da alodínia já estabelecida não foi observada quando a implantação de dexametasona foi realizada no 12^o dia após a constrição do nervo ciático em ratos. Por outro lado, em um estudo semelhante em que foi realizada a implantação de metilprednisolona ao invés de dexametasona, efeitos antialodínico e anti-hiperalgésico foram observados (Johansson e Bennett, 1997) e os autores desse estudo supõem que metilprednisolona altere propriedades eletrofisiológicas de neurônios aferentes primários nesse contexto experimental.

O retardo no desenvolvimento de alodínia induzido pela implantação de dexametasona está associado com efeito antineuroinflamatório periférico, uma vez que houve redução da translocação de NF- κ B em DRG's de ratos submetidos à implantação perineural de dexametasona simultaneamente à constrição. A redução da translocação desse fator de transcrição foi avaliada no 15^o dia após a constrição simultânea à implantação – período durante o qual o efeito máximo sobre a prevenção do desenvolvimento de alodínia é observado.

Em conjunto, todos os resultados discutidos acima mostram que existe um período crítico para que uma intervenção anti-inflamatória possa impedir a gênese das alterações patológicas que levam ao desenvolvimento de dor neuropática experimental causada por lesão de nervo. Sabe-se que mediadores inflamatórios induzem uma série de alterações plásticas em neurônios aferentes primários, neurônios da medula espinhal e estruturas supraespinhais e que essas alterações levam à cronicidade da dor neuropática (Costigan, Scholz *et al.*, 2009). É provável que a dexametasona induza efeitos antialodínico e anti-hiperalgésico por meio de múltiplos mecanismos. As ações de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e mastócitos, que normalmente se infiltram no nervo após constrição (Perkins e Tracey, 2000; Okuda, Ishida *et al.*, 2006), podem ser suprimidas por dexametasona (Yarwood, Nourshargh *et al.*, 1993; Clatworthy, Illich *et al.*, 1995; Franchimont, Galon *et al.*, 2000; Kassel, Sancono *et al.*, 2001; Kamberi, Brummer *et al.*, 2002). Além disso, células de Schwann são ativadas após constrição de nervo (Fu, Zhang *et al.*, 2010) e a sua produção de citocinas e quimiocinas é inibida pela dexametasona *in vitro* (Rutkowski, Tuite *et al.*, 1999). É difícil elaborar hipóteses sobre os sítios de ação da dexametasona no contexto em que sua administração foi sistêmica (implantação perineural), mas é plausível supor que esse anti-inflamatório esteroide tenha ações indiretas sobre a translocação de NF- κ B em DRG's relacionadas com a inibição da infiltração de macrófagos e linfócitos T para esse sítio, bem como pode-se pensar em ações diretas sobre células residentes nos DRG's, tais como neurônios e células satélites gliais.

Os mediadores inflamatórios produzidos pelas células mencionadas no parágrafo anterior sensibilizam ou ativam nociceptores, aumentando assim respostas nociceptivas (Costigan, Scholz *et al.*, 2009). Considerando as amplas atividades

anti-inflamatórias genômicas e não genômicas apresentadas pela dexametasona (Barnes, 2006), é plausível afirmar que a prevenção de eventos inflamatórios em resposta à constrição do nervo pode retardar o desenvolvimento subsequente da hiperalgesia e da alodínia. Além da ação em células imunes, é possível também que ações genômicas e não genômicas diretamente em neurônios possam explicar a atividade antinociceptiva da dexametasona. Corroborando ações genômicas, a exposição pré-natal de ratos a dexametasona diminui a expressão de receptores P2X3 em DRG's e medula espinhal (Wang, Zhou *et al.*, 2008), embora o efeito induzido pela dexametasona sobre a expressão desses canais em ratos adultos parece não ter sido investigada.

Os resultados reforçam as evidências de que interações neuro-imunes são essenciais para desencadear alterações fisiopatológicas necessárias para o desenvolvimento de hiperalgesia e alodínia que ocorre em modelos de lesão de nervo. Esse estudo apresenta uma abordagem metodológica localizada que abre oportunidades para a investigação detalhada de mecanismos celulares e moleculares pelos quais neuropatias periféricas levam a estados persistentes de dor. O estudo detalhado da sequência de eventos inflamatórios que levam à gênese da dor neuropática pode levar à elucidação de estratégias terapêuticas que, se usadas no momento certo, podem prevenir o estabelecimento ou a progressão da dor neuropática.

Concluimos com o presente estudo que, embora a dexametasona tenha sido uma ferramenta farmacológica útil para compreender um pouco melhor a contribuição da inflamação para o desenvolvimento de dor neuropática, esse anti-inflamatório esteroide não desperta grande interesse como ferramenta terapêutica. Teoricamente, é possível que a dexametasona seja útil no tratamento de pacientes

com dores de origem neuropática em estágios iniciais. No entanto, é mais relevante buscar ferramentas terapêuticas eficientes mesmo quando a dor de origem neuropática está plenamente estabelecida. Por isso, como a administração sistêmica de dexametasona não induziu efeito antialodínico quando a sensibilização estava plenamente estabelecida e considerando a nossa experiência prévia com o estudo de efeitos supressores de dor experimental induzido por tetraciclinas, tivemos o interesse de investigar o efeito induzido pela administração sistêmica de PMIN sobre a dor neuropática experimental plenamente estabelecida.

O presente estudo mostrou que a PMIN – um derivado não antibacteriano e não quelante de cálcio da minociclina – inibe a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos C57BL/6 de uma maneira dependente da dose. Essa demonstração se soma às evidências de supressão de ambas as fases do comportamento de lambida induzido pelo formaldeído e do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos da linhagem Swiss (Bastos, Angusti *et al.*, 2008). Além disso, uma investigação inicial dos efeitos anti-inflamatórios *in vitro* foi conduzida e mostrou que a produção de PGE₂ induzida por LPS em células microgliais de rato é inibida por essa tetraciclina quimicamente modificada (presente estudo), bem como pela minociclina (Bastos, De Oliveira *et al.*, 2011). As sinalizações via hTLR2 ou hTLR4 também foram inibidas tanto pela minociclina quanto pela PMIN. É importante ressaltar que a viabilidade das culturas celulares utilizadas não foi afetada por essas tetraciclinas sob as condições experimentais do presente estudo. Essa parece ser a primeira demonstração de efeito antialodínico induzido por esse membro da classe das tetraciclinas quimicamente modificadas em modelo de dor neuropática.

A administração sistêmica de PMIN reverteu a alodínia induzida pela constrição do nervo de camundongos. Raghavendra et al. (2003) mostraram que administração sistêmica de minociclina previne o desenvolvimento de alodínia mecânica e de hiperalgesia térmica após ligação de nervo espinhal ao nível de L5. No entanto, não foi observado efeito sobre a alodínia mecânica ou hiperalgesia térmica nesse estudo quando o tratamento foi iniciado cinco dias após ligação. No modelo de constrição de nervo, a mesma ausência de efeito sobre alodínia já estabelecida foi observada (Ledeboer, Sloane *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado o efeito antialodínico induzido pela minociclina quando injeções intratecais dessa tetraciclina foram realizadas um, três ou sete dias após a ligação de nervo espinhal, mas não quando foram realizadas 10 ou 21 dias após essa ligação (Mei, Xu *et al.*, 2011). No presente estudo, foi demonstrado que administração única de PMIN reverteu parcialmente a alodínia quando administrada 21 dias após a constrição de nervo ciático de camundongos. De fato, podem ser observadas diferenças na eficácia antinociceptiva de drogas em diferentes modelos de dor neuropática (Decosterd, Allchorne *et al.*, 2004; Erichsen, Hao *et al.*, 2005). Portanto, mesmo considerando essas diferenças metodológicas que dificultam comparações, nossos resultados corroboram os resultados de estudos recentes que mostram reversão de dor neuropática experimental com derivados de tetraciclinas. Naturalmente, é mais relevante em um paradigma terapêutico que um candidato a fármaco analgésico reverta a dor já estabelecida ao invés de apenas prevenir a sua gênese.

As concentrações séricas de minociclina 3 h e 6 h após uma administração i.p. única em camundongos – momentos entre os quais efeitos supressores de dor experimental e anti-inflamatórios são observados – são aproximadamente 66 e 43

μM , respectivamente (Bastos, Angusti *et al.* 2008), portanto, dentro da faixa de concentrações usadas nos presentes estudos *in vitro* (isto é, de 1 a 100 μM). Por outro lado, essa estimativa não pode ser feita para a PMIN porque o seu perfil farmacocinético parece não ter sido estudado até o momento.

É possível que existam diferenças quantitativas determinadas pelo sexo na magnitude dos efeitos induzidos pela PMIN, mas diferenças qualitativas são pouco prováveis, pois PMIN induz efeitos supressivos de dor experimental tanto em camundongos machos (Bastos, Angusti *et al.*, 2008) quanto em fêmeos (presente estudo). O mesmo se observa para minociclina e doxiciclina, que também induzem efeitos em animais machos e fêmeos (Bastos, Merlo *et al.*, 2007; Willemen, Eijkelkamp *et al.*, 2010; Nakamae, Ochi *et al.*, 2011). Essa característica é um ponto positivo, pois mulheres são mais acometidas por doenças dolorosas crônicas do que homens e, portanto, estudos pré-clínicos devem considerar essas possíveis diferenças (Mogil e Chanda, 2005). Portanto, é necessário incluir animais fêmeos em estudos pré-clínicos na tentativa de aumentar o valor preditivo dos mesmos, aumentando assim a chance de desenvolvimento de fármacos analgésicos efetivos e seguros.

Levando em consideração estudos prévios (Tikka, Usenius *et al.*, 2001; Bastos, Merlo *et al.*, 2007; Bastos, Angusti *et al.*, 2008) e o presente estudo, os resultados indicam que a doxiciclina, a minociclina e a PMIN induzem efeitos semelhantes em modelos de dor e inflamação, independentemente de apresentarem atividades antibacteriana e quelante de cátions bivalentes. Portanto, é plausível supor que esses derivados de tetraciclina compartilham mecanismos semelhantes relacionados com a supressão de dor experimental.

Entre as tetraciclina, a minociclina é a mais estudada porque ela transpõe a barreira hematoencefálica de maneira mais eficiente que os demais derivados de tetraciclina já estudados (Aronson, 1980). Administrações sistêmicas de minociclina, doxiciclina ou PMIN induzem efeitos antiedematógenos de magnitudes semelhantes (Bastos, Merlo *et al.*, 2007; Bastos, Angusti *et al.*, 2008). Além disso, minociclina e doxiciclina inibem alodínia e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal também induzidas pela carragenina (Bastos, Merlo *et al.*, 2007). Por outro lado, quando a minociclina é administrada pela via i.t., a hiperalgesia induzida pela injeção i.pl. de carragenina (Hua, Svensson *et al.*, 2005) ou IL-1 β (Willemen, Eijkelkamp *et al.*, 2010) também é inibida. Micro-injeção de minociclina diretamente no bulbo rostroventromedial de ratos também inibe tanto a alodínia quanto a hiperalgesia induzidas por carragenina em ratos (Roberts, Ossipov *et al.*, 2009).

A minociclina, direta ou indiretamente, previne ativação de várias enzimas envolvidas na síntese de múltiplos mediadores inflamatórios em macrófagos/micróglia ou células neuronais ou em testes *in vitro* sem células. Entre as enzimas inibidas, podem ser citadas: fosfolípase A₂ (Pruzanski, Greenwald *et al.*, 1992), diferentes isoformas de proteína cínase C (Webster, Toso *et al.*, 1994; Nikodemova, Duncan *et al.*, 2006), proteínas cínases ativadas por múltiplos mitógenos (Tikka, Fiebich *et al.*, 2001; Nikodemova, Duncan *et al.*, 2006; Piao, Cho *et al.*, 2006), cínase-3 de fosfatidilinositol/Akt (Pi, Li *et al.*, 2004), sintétase induzível de óxido nítrico (Amin, Attur *et al.*, 1996), COX-2 (Kim, Kong *et al.*, 2004), mPGES-1 (Bastos, De Oliveira *et al.*, 2011), 5-lipo-oxigénase (Song, Wei *et al.*, 2006) e polimérise 1 de póli-(ADP-ribose) (Alano, Kauppinen *et al.*, 2006). Além de inibir a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos, células microgliais e neurônios, ações diretas sobre a excitabilidade de neurônios aferentes primários têm

sido propostas para explicar inibição de dor experimental pela minociclina (Kim, Kim *et al.*, 2011). Portanto, como mencionado acima, as evidências indicam tanto ações periféricas quanto centrais da minociclina.

Elaboramos a hipótese de que a inibição periférica e central da produção de PGE₂ e da sinalização via receptores TLR2 e TLR4 em diferentes tipos celulares pode também ajudar a explicar os efeitos antialodínicos induzidos por derivados de tetraciclina em modelos de dor neuropática. PGE₂ é o principal prostanoide inflamatório e desempenha vários papéis no estabelecimento e manutenção de dor neuropática experimental, age em células imunes e neurônios, tanto no SNC quanto na periferia (Matsunaga, Kawamoto *et al.*, 2007; Kawabata, 2011). O fato de que a minociclina (Bastos, De Oliveira *et al.*, 2011) ou a PMIN inibem a produção de PGE₂ não ajudaria a explicar muito bem os seus efeitos antialodínicos em modelos de dor neuropática. De fato, FAINE's tradicionais ou seletivos de COX-2 inibem a produção de PGE₂, mas induzem efeito muito modesto em dor neuropática experimental plenamente desenvolvida (Padi e Kulkarni, 2004; Inoue, Ito *et al.*, 2009) e têm pouca utilidade no tratamento de pacientes com dor neuropática (Dray, 2008). Por outro lado, esses mecanismos ajudam a explicar melhor os efeitos previamente observados sobre a segunda fase do comportamento de lambida induzido pelo formaldeído e sobre o edema induzido pela carragenina em camundongos (Bastos, Angusti *et al.*, 2008), porque a PGE₂ desempenha um papel mais importante em modelos de dor inflamatória do que em modelos de dor neuropática (Kawabata, 2011).

Ao inibirem a sinalização via TLR2 ou TLR4, é provável que a minociclina e a PMIN inibam a ação de substâncias endógenas que medeiam a gênese e a progressão da dor neuropática experimental. Como mencionado, essas substâncias

são β -defensinas, fibronectina, proteínas de choque térmico e *high mobility group box 1* (HMGB1) – coletivamente conhecidos como padrões moleculares associados com perigo ou simplesmente “alarminas”. A inibição da sinalização via TLR2 ou TLR4 impede a translocação de NF- κ B, o que leva à inibição da produção de vários mediadores inflamatórios. De fato, já foi demonstrada a inibição da translocação de NF- κ B por minociclina em células microgliais (Nikodemova, Duncan *et al.*, 2006). Portanto, é possível que a PMIN também induza tal efeito. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar essas questões.

O produto bruto (não purificado) da reação entre minociclina e hidrazina também induz efeito antialodínico e anti-hiperalgésico 12 dias após a constrição do nervo ciático de ratos, além de suprimir dor experimental em modelos de dor nociceptiva e inflamatória (dados não mostrados). Esse produto parece não apresentar atividade antimicrobiana, pois não reduz o crescimento de *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* nem de 11 linhagens de *Candida albicans in vitro*, mesmo em concentrações (mg/ml) centenas ou milhares de vezes superior à de minociclina. Por outro lado, como esperado, as linhagens de bactérias aeróbias e anaeróbias supracitadas são sensíveis à minociclina em concentrações baixas, enquanto as linhagens fúngicas são sensíveis em concentrações altas. Esses resultados indicam que esse produto não purificado não deve conter compostos antimicrobianos, mas contém produtos anti-inflamatórios. Embora o interesse por esse produto não purificado seja pequeno por causa do desconhecimento de sua composição completa, esses resultados mostram que a busca por derivados não antimicrobianos de tetraciclinas é promissora.

Em suma, o presente estudo mostra efeitos antialodínico e anti-inflamatório induzidos pela PMIN, um derivado da minociclina desprovido de atividade

antibacteriana e que não quela cálcio (II) nem magnésio (II), o que demonstra que esse derivado apresenta eficácia parecida com aquela de tetraciclinas convencionais, mas segurança potencialmente mais alta. Essa parece ser a primeira demonstração de efeito antialodínico induzido por uma tetraciclina quimicamente modificada em modelo de dor neuropática, representando, portanto, uma oportunidade de desenvolvimento de fármacos.

7 CONCLUSÕES, LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO E PERSPECTIVAS

A presente tese reforça as evidências do papel essencial da inflamação para desencadear as alterações patológicas que levam à gênese de dor neuropática experimental. Existem evidências na literatura de que mediadores inflamatórios são responsáveis pelas alterações plásticas neuronais que levam à manutenção da dor neuropática. Dexametasona, usada neste estudo como ferramenta farmacológica para inibir a inflamação/resposta imune, não reverteu a dor neuropática experimental já estabelecida. Reversão da dor neuropática experimental pode ser obtida com minociclina, mas os seus efeitos antimicrobianos e quelantes de cátions bivalentes diminuem o interesse pelos seus possíveis efeitos analgésicos. Nesse contexto, demonstramos o efeito supressor de dor neuropática experimental induzido por um derivado não antibacteriano e não quelante da minociclina, que parece ser mais promissor como candidato a fármaco analgésico do que a minociclina por causa da sua segurança potencialmente superior.

Ainda há muitas lacunas no conhecimento sobre a contribuição da inflamação para a gênese e progressão da dor neuropática. Por exemplo, sabe-se pouco sobre o papel de citocinas e quimiocinas nesses fenômenos. Portanto, uma das limitações do presente estudo foi a impossibilidade de condução de experimentos para a investigação detalhada de aspectos mecanísticos do processo inflamatório na dor neuropática. Outra limitação deste estudo foi a não obtenção de dados sobre o perfil farmacocinético da dexametasona após os tratamentos com esse fármaco.

Quanto à proposta de potencial utilidade terapêutica da PMIN, é preciso ressaltar que os resultados ainda são preliminares. É importante continuar investigando os efeitos induzidos pela PMIN em mais modelos de dor neuropática e

iniciar estudos sobre o seu perfil toxicológico, para possivelmente viabilizar estudos clínicos para avaliação objetiva da utilidade terapêutica desse derivado da minociclina.

REFERÊNCIAS¹

ALANO, C. C. et al. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 103, n. 25, p. 9685-90, Jun 2006.

AMIN, A. R. et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 93, n. 24, p. 14014-9, Nov 1996.

ARONSON, A. L. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**,v. 176, n. 10, p. 1061-1068, 1980.

BARNES, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. **The European Respiratory Journal**,v. 27, n. 2, p. 413-26, Feb 2006.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R.;SCHWARTZ, J. H., *et al* (Ed.). **Principles of neural science**. 4th ed. New York; London: McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000. cap. 24, p.472-491. ISBN 0071120009.

BASTOS, L. F. S. et al. A novel non-antibacterial, non-chelating hydroxypyrazoline derivative of minocycline inhibits nociception and oedema in mice. **British Journal of Pharmacology**,v. 155, n. 5, p. 714-721, Nov 2008.

BASTOS, L. F. S. et al. Minocycline reduces prostaglandin E synthase expression and 8-isoprostane formation in LPS-activated primary rat microglia. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**,v. 33, n. 3, p. 576-580, Sep 2011.

BASTOS, L. F. S. et al. Tetracyclines and pain. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**,v. 385, n. 3, p. 225-41, Mar 2012.

BASTOS, L. F. S. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. **European Journal of Pharmacology**,v. 576, n. 1-3, p. 171-179, Dec 2007.

BENNETT, G. J. A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy. **The Clinical Journal of Pain**,v. 16, n. 3 Suppl, p. S139-43, Sep 2000.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

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, Apr 1988.

BERDAN, R. C.; EASAW, J. C.; WANG, R. Alterations in membrane potential after axotomy at different distances from the soma of an identified neuron and the effect of depolarization on neurite outgrowth and calcium channel expression. **Journal of Neurophysiology**,v. 69, n. 1, p. 151-64, Jan 1993.

BETTONI, I. et al. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. **Glia**,v. 56, n. 12, p. 1312-9, Sep 2008.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. **The Journal of Neuroscience**,v. 28, n. 52, p. 14062-73, Dec 2008.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**,v. 136, n. 3, p. 380-7, Jun 2008.

CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-13, Apr 14 2000.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**,v. 389, n. 6653, p. 816-24, Oct 1997.

CHACUR, M. et al. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. **Pain**,v. 94, n. 3, p. 231-44, Dec 2001.

CHEN, N. et al. Corticosteroids for preventing postherpetic neuralgia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, p. CD005582, 2010.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**,v. 65, n. 2, p. 232-60, Jun 2001.

CLATWORTHY, A. L. et al. Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**,v. 184, n. 1, p. 5-8, Jan 1995.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 1-32, Mar 2009.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765-7, Nov 1991.

CUNHA, F. Q. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 45-50, Jan 1999.

DAOOD, M. J.; HOYSON, M.; WATCHKO, J. F. Lipid peroxidation is not the primary mechanism of bilirubin-induced neurologic dysfunction in jaundiced Gunn rat pups. **Pediatric Research**, Aug 2012.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Regulation of prostaglandin E₂ synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. **Glia**, v. 56, n. 8, p. 844-55, Jun 2008.

DECOSTERD, I.; ALLCHORNE, A.; WOOLF, C. J. Differential analgesic sensitivity of two distinct neuropathic pain models. **Anesthesia and Analgesia**, v. 99, n. 2, p. 457-463, Aug 2004.

DIGNAM, J. D.; LEOVITZ, R. M.; ROEDER, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 5, p. 1475-89, Mar 1983.

DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 48-58, Jul 2008.

DURRENBERGER, P. F. et al. Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. **BMC Neurology**, v. 6, p. 1, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/6/1>>. Acesso em 04 Apr. 2013.

EDAN, R. A.; LUQMANI, Y. A.; MASOCHA, W. COL-3, a chemically modified tetracycline, inhibits lipopolysaccharide-induced microglia activation and cytokine expression in the brain. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57827, Feb 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0057827>>. Acesso em: 29 Jul 2013.

EDDLESTON, J. et al. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 1, p. 115-22, Jan 2007.

ELIAV, E. et al. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. **Pain**,v. 83, n. 2, p. 169-82, Nov 1999.

ERICHSEN, H. K. et al. Comparative actions of the opioid analgesics morphine, methadone and codeine in rat models of peripheral and central neuropathic pain. **Pain**,v. 116, n. 3, p. 347-358, Aug 2005.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**,v. 334, n. 6184, p. 698-700, Aug 1988.

FIALHO, S. L.; DA SILVA CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug Delivery**,v. 12, n. 2, p. 109-16, Mar-Apr 2005.

FIALHO, S. L. et al. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Current Eye Research**,v. 31, n. 6, p. 525-34, Jun 2006.

FITZGERALD, G. A. Coxibs and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**,v. 351, n. 17, p. 1709-11, Oct 2004.

FRANCHIMONT, D. et al. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. **Journal of Immunology**,v. 164, n. 4, p. 1768-74, Feb 2000.

FU, E. S. et al. Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. **Pain**,v. 148, n. 3, p. 509-18, Mar 2010.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; BARTOLINI, A. Involvement of potassium channels in amitriptyline and clomipramine analgesia. **Neuropharmacology**,v. 40, n. 1, p. 75-84, Jan-Feb 2001.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology and Behavior**,v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990.

GOULDEN, V.; GLASS, D.; CUNLIFFE, W. J. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. **British Journal of Dermatology**,v. 134, n. 4, p. 693-5, Apr 1996.

HAO, S. et al. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. **Molecular Pain**,v. 2, p. 6, Feb 2006.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**,v. 32, n. 1, p. 77-88, Jan 1988.

HOMMA, Y.; BRULL, S. J.; ZHANG, J. M. A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. **Pain**,v. 95, n. 3, p. 239-46, Feb 2002.

HU, H. J. et al. The Kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. **Neuron**,v. 50, n. 1, p. 89-100, Apr 2006.

HUA, X. Y. et al. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. **European Journal of Neuroscience**,v. 22, n. 10, p. 2431-40, Nov 2005.

HUTCHINSON, M. R. et al. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). **European Journal of Neuroscience**,v. 28, n. 1, p. 20-9, Jul 2008.

INOUE, N. et al. Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. **Journal of Pharmacological Sciences**,v. 109, n. 4, p. 600-5, Apr 2009.

IGNATOWSKI, T. A. et al. Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain. **Brain Research**,v. 841, n. 1-2, p. 70-7, Sep 1999.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**,v. 25, n. 1, p. 1-28, Feb 2011.

JOHANSSON, A.; BENNETT, G. J. Effect of local methylprednisolone on pain in a nerve injury model. A pilot study. **Regional Anesthesia**,v. 22, n. 1, p. 59-65, Jan-Feb 1997.

KALSO, E. et al. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**,v. 112, n. 3, p. 372-80, Dec 2004.

KALTSCHMIDT, B.; WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta**,v. 1745, n. 3, p. 287-99, Sep 2005.

KAMBERI, M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Regulation of bronchoalveolar macrophage proinflammatory cytokine production by dexamethasone and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after stimulation by *Aspergillus* conidia or lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 19, n. 1, p. 14-20, Jul 2002.

KASSEL, O. et al. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 7108-16, Dec 2001.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain - an update. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170-3, Aug 2011.

KAWAHARA, H. et al. A prostaglandin E2 receptor subtype EP1 receptor antagonist (ONO-8711) reduces hyperalgesia, allodynia, and c-fos gene expression in rats with chronic nerve constriction. **Anesthesia and Analgesia**, v. 93, n. 4, p. 1012-7, Oct 2001.

KAWASAKI, Y. et al. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5189-94, May 2008.

KIM, D. et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14975-83, May 2007.

KIM, D. et al. Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. **Molecular Pain**, v. 7, p. 74, 2011.

KIM, S. S. et al. Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E₂ in BV2 microglial cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 3, p. 314-8, Mar 2004.

KIM, T. H. et al. Effects of minocycline on Na(+) currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, v. 1370, p. 34-42, Jan 2011.

KONTUREK, S. J. et al. Distribution of prostaglandins in gastric and duodenal mucosa of healthy subjects and duodenal ulcer patients: effects of aspirin and paracetamol. **Gut**, v. 22, n. 4, p. 283-9, Apr 1981.

KUANG, X. et al. Effects of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 676, n. 1-3, p. 51-6, Feb 15 2012.

KWOK, Y. H. et al. Increased responsiveness of peripheral blood mononuclear cells to in vitro TLR 2, 4 and 7 ligand stimulation in chronic pain patients. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44232, 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0044232>>. Acesso em: 04 Apr 2013.

LEDEBOER, A. et al. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. **Glia**, v. 30, n. 2, p. 134-42, Apr 2000.

LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 71-83, May 2005.

LERTVORACHON, J. et al. 1,12-substituted tetracyclines as antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4627-37, Aug 2005.

LEVINE, S. J.; WENZEL, S. E. Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, n. 4, p. 232-7, Feb 16 2010.

LEWIS, S. S. et al. (+)-Naloxone, an opioid-inactive toll-like receptor 4 signaling inhibitor, reverses multiple models of chronic neuropathic pain in rats. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 5, p. 498-506, May 2012.

LINDENLAUB, T. et al. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. **Brain Research**, v. 866, n. 1-2, p. 15-22, Jun 2000.

LIU, T.; GAO, Y. J.; JI, R. R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. **Neuroscience Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 131-44, Apr 2012.

MA, C. et al. Similar electrophysiological changes in axotomized and neighboring intact dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 89, n. 3, p. 1588-602, Mar 2003.

MA, W.; BISBY, M. A. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. **Brain Research**,v. 797, n. 2, p. 243-54, Jun 1998.

MA, W.; EISENACH, J. C. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 691-704, Oct 2003a.

MA, W.; EISENACH, J. C. Four PGE₂ EP receptors are up-regulated in injured nerve following partial sciatic nerve ligation. **Experimental Neurology**,v. 183, n. 2, p. 581-92, Oct 2003b.

MABUCHI, T. et al. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is required for neuropathic pain. **Neuroreport**,v. 15, n. 9, p. 1395-8, Jun 28 2004.

MACPHERSON, L. J. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 42, p. 11412-5, Oct 17 2007.

MATSUNAGA, A. et al. Intrathecally administered COX-2 but not COX-1 or COX-3 inhibitors attenuate streptozotocin-induced mechanical hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**,v. 554, n. 1, p. 12-7, Jan 2007.

MAVES, T. J. et al. Possible chemical contribution from chromic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**,v. 54, n. 1, p. 57-69, Jul 1993.

McCARBERG, B. H.; BILLINGTON, R. Consequences of neuropathic pain: quality-of-life issues and associated costs. **The American Journal of Managed Care**,v. 12, n. 9 Suppl, p. S263-8, Jun 2006.

McMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**,v. 192, n. 2, p. 444-62, Apr 2005.

McNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 104, n. 33, p. 13525-30, Aug 2007.

MEI, X. P. et al. Post-injury administration of minocycline: an effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain. **Neuroscience Research**,v. 70, n. 3, p. 305-12, Jul 2011.

MELNIKOVA, I. Pain market. **Nature Reviews. Drug Discovery**,v. 9, n. 8, p. 589-90, Aug 2010.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews. Neuroscience**,v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009.

MOGIL, J. S.; CHANDA, M. L. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. **Pain**,v. 117, n. 1-2, p. 1-5, Sep 2005.

MORHAM, S. G. et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**,v. 83, n. 3, p. 473-82, Nov 3 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**,v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983.

MOTOV, S. M.; KHAN, A. N. Problems and barriers of pain management in the emergency department: Are we ever going to get better? **Journal of Pain Research**,v. 2, p. 5-11, 2008.

MOTTA, P. G. et al. Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. **Pharmacology**,v. 88, n. 1-2, p. 18-25, 2011.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA: the journal of the American Medical Association**,v. 286, n. 8, p. 954-9, Aug 22-29 2001.

NAKAMAE, T.; OCHI, M.; OLMARKER, K. Pharmacological inhibition of tumor necrosis factor may reduce pain behavior changes induced by experimental disc puncture in the rat: an experimental study in rats. **Spine**,v. 36, n. 4, p. E232-6, Feb 2011.

NICOTRA, L. et al. Toll-like receptors in chronic pain. **Experimental Neurology**,v. 234, n. 2, p. 316-29, Apr 2012.

NIKODEMOVA, M.; DUNCAN, I. D.; WATTERS, J. J. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and I κ B degradation in a stimulus-specific manner in microglia. **Journal of Neurochemistry**,v. 96, n. 2, p. 314-23, Jan 2006.

OCANA, M.; BARRIOS, M.; BAEYENS, J. M. Cromakalim differentially enhances antinociception induced by agonists of $\alpha(2)$ adrenoceptors, gamma-aminobutyric

acid(B), mu and kappa opioid receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**,v. 276, n. 3, p. 1136-42, Mar 1996.

OH, S. B. et al. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **The Journal of Neuroscience**,v. 21, n. 14, p. 5027-35, Jul 2001.

OKUDA, T. et al. The autotomy relief effect of a silicone tube covering the proximal nerve stump. **Journal of Orthopaedic Research**,v. 24, n. 7, p. 1427-37, Jul 2006.

PADI, S. S.; KULKARNI, S. K. Differential effects of naproxen and rofecoxib on the development of hypersensitivity following nerve injury in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**,v. 79, n. 2, p. 349-58, Oct 2004.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to Na_v1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 100, n. 5, p. 2923-8, Mar 2003.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews. Drug Discovery**,v. 8, n. 1, p. 55-68, Jan 2009.

PEREZ-TRALLERO, E.; IGLESIAS, L. [Tetracyclines, sulfonamides and metronidazole]. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**,v. 21, n. 9, p. 520-8, Nov 2003.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**,v. 101, n. 3, p. 745-57, 2000.

PI, R. et al. Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. **Journal of Neurochemistry**,v. 91, n. 5, p. 1219-30, Dec 2004.

PIAO, Z. G. et al. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. **Pain**,v. 121, n. 3, p. 219-31, Apr 2006.

POOLE, S. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **British Journal of Pharmacology**,v. 115, n. 4, p. 684-8, Jun 1995.

PRUZANSKI, W. et al. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A₂ by minocycline and doxycycline. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 1165-70, Sep 1992.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624-30, Aug 2003.

ROBERTS, J.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Glial activation in the rostroventromedial medulla promotes descending facilitation to mediate inflammatory hypersensitivity. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 229-41, Jul 2009.

RONCORONI, C. et al. Efficacy and tolerance of systemic steroids in sciatica: a systematic review and meta-analysis. **Rheumatology**, v. 50, n. 9, p. 1603-11, Sep 2011.

RUTKOWSKI, J. L. et al. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 101, n. 1, p. 47-60, Nov 1999.

SAMTANI, M. N.; JUSKO, W. J. Comparison of dexamethasone pharmacokinetics in female rats after intravenous and intramuscular administration. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 26, n. 3, p. 85-91, Apr 2005.

SANCHEZ, A. R.; ROGERS, R. S., 3RD; SHERIDAN, P. J. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. **International Journal of Dermatology**, v. 43, n. 10, p. 709-15, Oct 2004.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5 Suppl, p. 1062-7, Nov 2002.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, Nov 2007.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12013-7, Dec 1994.

SHI, X. Q.; ZEKKI, H.; ZHANG, J. The role of TLR2 in nerve injury-induced neuropathic pain is essentially mediated through macrophages in peripheral inflammatory response. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 231-41, Feb 2011.

SHURMAN, J.; KOOB, G. F.; GUTSTEIN, H. B. Opioids, pain, the brain, and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain. **Pain Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1092-8, Jul 2010.

SIEMENS, J. et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208-12, Nov 2006.

SMITH, J. B.; ARAKI, H.; LEFER, A. M. Thromboxane A₂, prostacyclin and aspirin: effects on vascular tone and platelet aggregation. **Circulation**, v. 62, n. 6 Pt 2, p. V19-25, Dec 1980.

SOMMER, C. et al. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. **Brain Research**, v. 913, n. 1, p. 86-9, Sep 2001.

SONG, Y. et al. Minocycline protects PC12 cells against NMDA-induced injury via inhibiting 5-lipoxygenase activation. **Brain Research**, v. 1085, n. 1, p. 57-67, Apr 2006.

SOUZA, D. G. et al. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 4, p. 1309-18, Apr 2009.

SWEITZER, S.; MARTIN, D.; DELEO, J. A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 529-39, Mar 2001.

TAKASAKI, I. et al. Effects of glucocorticoid receptor antagonists on allodynia and hyperalgesia in mouse model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 524, n. 1-3, p. 80-3, Nov 2005.

TAL, M.; DEVOR, M. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. **Brain Research**, v. 579, n. 1, p. 148-51, May 1992.

TIKKA, T. et al. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 2580-8, Apr 2001.

TIKKA, T. et al. Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1409-14, Sep 2001.

TOBINICK, E. L. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. **Drug News & Perspectives**, v. 22, n. 2, p. 119-25, Mar 2009.

TORRANCE, N. et al. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 4, p. 281-9, Apr 2006.

UCEYLER, N. et al. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. **Pain**, v. 132, n. 1-2, p. 195-205, Nov 2007.

UCEYLER, N. et al. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 8, p. 2656-64, Aug 2006.

VERRI, W. A., JR. et al. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by endothelin (ET) acting on ETB receptors in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 609-15, Nov 2005.

VERRI, W. A., JR. et al. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 710-7, Aug 2004.

VILLARREAL, C. F. et al. The role of Na_v1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. **Neuroscience Letters**, v. 386, n. 2, p. 72-7, Sep 2005.

WAGNER, R.; JANJIGIAN, M.; MYERS, R. R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 35-42, Jan 1998.

WAGNER, R.; MYERS, R. R. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport**, v. 7, n. 18, p. 2897-901, Nov 1996.

WANG, H. et al. Transient changes in P2X3 but not TRPV1 mRNA expression in rat after prenatal exposure to glucocorticoids. **Autonomic Neuroscience**, v. 141, n. 1-2, p. 112-6, Aug 2008.

WANG, S. et al. Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 39, p. 8595-605, Sep 2004.

WEBSTER, G. F.; TOSO, S. M.; HEGEMANN, L. Inhibition of a model of in vitro granuloma formation by tetracyclines and ciprofloxacin. Involvement of protein kinase C. **Archives of Dermatology**,v. 130, n. 6, p. 748-52, Jun 1994.

WHO Model List of Essential Medicines. Geneva, Switzerland: World Health Organization: 41 p. 2011.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**,v. 27, n. 5, p. 1047-53, May 2004.

WILLEMEN, H. L. et al. Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1beta-induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling. **Pain**,v. 150, n. 3, p. 550-60, Sep 2010.

WOODHAMS, P. L. et al. Localisation and modulation of prostanoid receptors EP1 and EP4 in the rat chronic constriction injury model of neuropathic pain. **European Journal of Pain**,v. 11, n. 6, p. 605-13, Aug 2007.

WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**,v. 121, n. 3, p. 417-24, Jun 1997.

YAN, J. E. et al. Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of Toll-like receptor 4 expression. **Neuroscience Letters**,v. 526, n. 1, p. 54-8, Sep 2012.

YANG, N.; ZHANG, W.; SHI, X. M. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. **Journal of Cellular Biochemistry**,v. 103, n. 6, p. 1760-71, Apr 2008.

YANG, Y. H. et al. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. **Journal of Immunology**,v. 183, n. 2, p. 1435-45, Jul 2009.

YARWOOD, H. et al. Effect of dexamethasone on neutrophil accumulation and oedema formation in rabbit skin: an investigation of site of action. **British Journal of Pharmacology**,v. 108, n. 4, p. 959-66, Apr 1993.

YATES, J. M.; SMITH, K. G.; ROBINSON, P. P. The effect of triamcinolone hexacetonide on the spontaneous and mechanically-induced ectopic discharge following lingual nerve injury in the ferret. **Pain**,v. 111, n. 3, p. 261-9, Oct 2004.

ZELENKA, M.; SCHAFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**,v. 116, n. 3, p. 257-63, Aug 2005.

ZHANG, N. et al. A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 102, n. 12, p. 4536-41, Mar 2005.


ZIMMERMANN, K. C. et al. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. **Molecular Pharmacology**,v. 54, n. 3, p. 536-40, Sep 1998.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**,v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.

ZIV, N. E.; SPIRA, M. E. Spatiotemporal distribution of Ca²⁺ following axotomy and throughout the recovery process of cultured Aplysia neurons. **European Journal of Neuroscience**,v. 5, n. 6, p. 657-68, Jun 1993.

ANEXOS

Anexo 1: certificado concedido pelo CETEA referente ao protocolo 168/2009



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 168/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Papéis das interleucinas 4 e 10 sobre nocicepção e alterações fisiopatológicas plásticas neurais associadas com a constrição do nervo ciático em ratos*", que tem como responsável(is) **Márcio Flávio Dutra Moraes**, 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 **28/ 10/2009**.

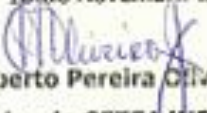
Este certificado expira-se em **28/ 10/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 168/2009**, related to the project entitled "*Roles played by interleukins 4 and 10 in nociception and pathophysiological neuroplastic alterations related to constriction of sciatic nerve in rats*", under the supervisors of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 28, 2009**.

This certificate expires in **October 28, 2014**.


Belo Horizonte, 18 de Novembro de 2009.


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) 3400-4532
www.ufmg.br/bioeticas/cetea - cetea@ufmg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo 2: certificado concedido pelo CETEA referente ao protocolo 015/2011



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 15/2011, relativo ao projeto intitulado *"Avaliação de possíveis efeitos induzidos pela 11,12- Pirazolminociclina em modelos experimentais de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática"*, que tem como responsável(is) **Márcio Flávio Dutra Moraes**, 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 **13/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **13/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 15/2011, related to the project entitled *"Evaluation of possible effects induced by 11,12-Pyrazolminocycline in experimental models of nociceptive, inflammatory and neuropathic pain"*, under the supervisors of **Márcio Flávio Dutra Moraes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **April 13, 2011**.

This certificate expires in **April 13, 2016**.

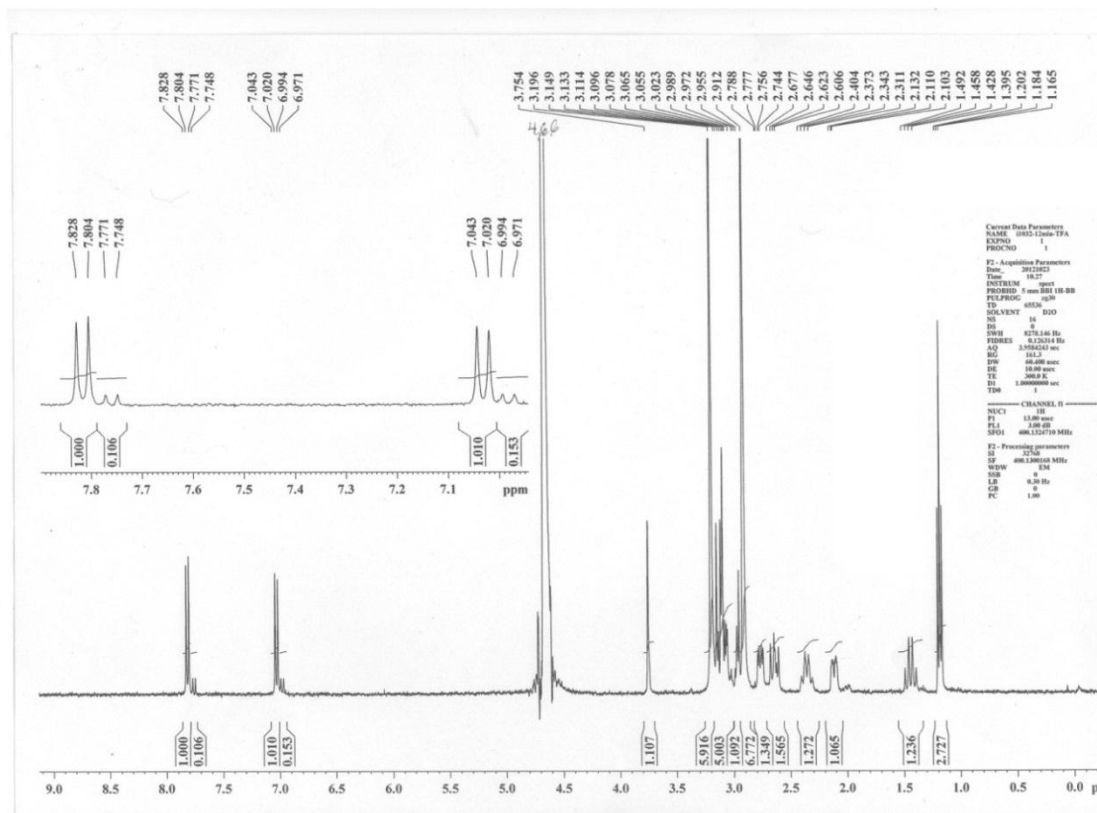
Belo Horizonte, 18 de Abril de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora 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) 3489-4216
www.ufmg.br/bioetica/ufmg - ufmg@p.ics.ufmg.br

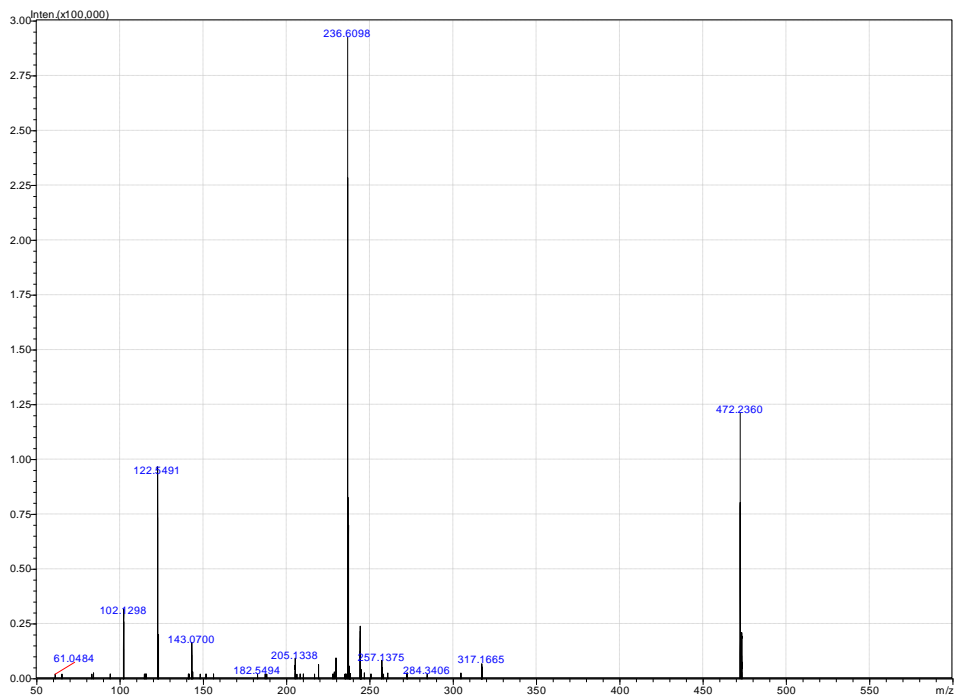
Modelo Cert. v1.03

Anexo 3: espectro de ressonância magnética nuclear de próton da substância PMIN

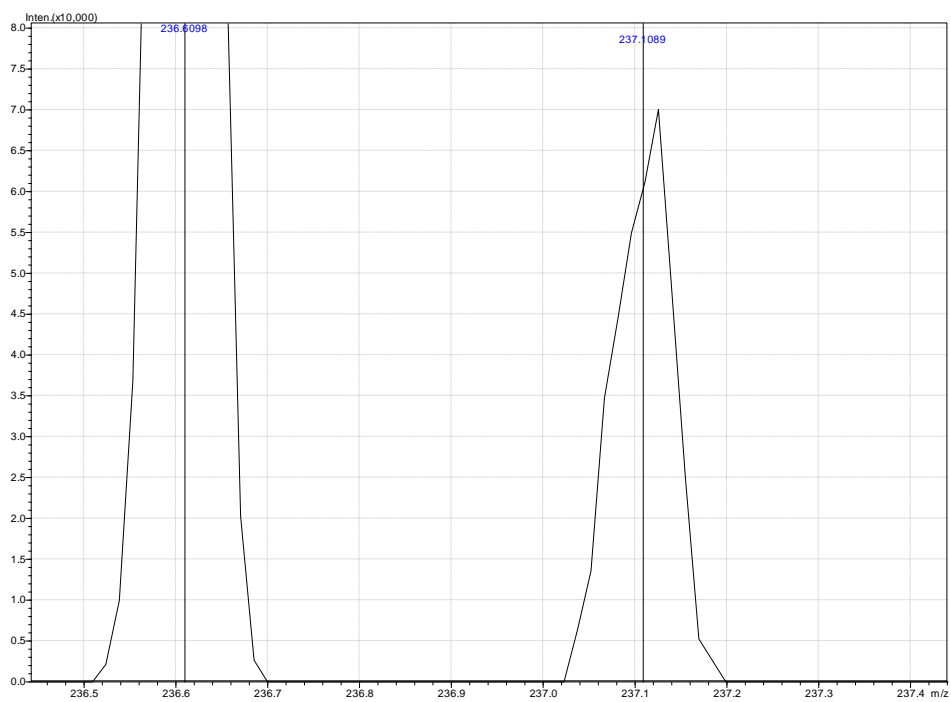


Anexo 4: espectro de massas da substância PMIN

Positivo



Região ampliada (positivo)



Negativo

