

Átila Savernini Lopes

**ESTUDO DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
ULTRASOM TERAPÊUTICO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL, EM
RATOS**

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2006

Átila Savernini Lopes

**ESTUDO DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
ULTRASOM TERAPÊUTICO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL, EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Salete de Abreu Castro, ICB/UFMG.

Co-orientadora: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos, ICB/UFMG.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2006

**ESTUDO DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ULTRASOM
TERAPÊUTICO NO MODELO EXPERIMENTAL DE DOR
NEUROPÁTICA TRIGEMINAL, EM RATOS**

ÁTILA SAVERNINI LOPES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 06 de julho de 2006, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE



PROF. DR. MÁRCIO MATTOS COELHO



PROFA. DRA. MARIA SALETE DE ABREU CASTRO
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 06 de JULHO de 2006.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho existisse.

À Professora Maria Salete, a quem chamarei com todo respeito e carinho de Sassá, precisaria de uma página inteira para lhe agradecer adequadamente. Obrigado pela orientação, dentro e fora do laboratório, pela amizade, pela experiência emprestada, pelo carinho. Enfim, obrigado por você!

À Professora Virgínia, que esteve conosco no início desta jornada, minha gratidão irrestrita. Se este trabalho hoje existe, muito devo a você.

Ao Professor Igor, agradeço pelas “dicas” e pela co-orientação informal de fundamental importância.

Meu agradecimento sincero ao Prof. Mauro e ao colega Flávio Almeida Amaral pela ajuda imprescindível na realização dos testes imunohistoquímicos.

Aos meus amigos Sílvia, Teresa, Cíntia, Baretta, Gustavo, Gustavão e Wal, Juliana e Marcelo, Juninho, João, Ana Paula, Cristina e todos de dentro e fora do laboratório que sempre me apoiaram, só posso dizer obrigado pelo carinho, amizade e pelo aprendizado que tive e continuo tendo com vocês. Aos Irmãos “Sentinelas”, muito obrigado por tudo!

Agradeço a todos os funcionários do Departamento e do CEBIO, que anonimamente tanto contribuem para que nossos trabalhos se concretizem.

À minha irmã Natascha, que tanto me incentivou a buscar estes rumos e, por fim, me trouxe ao Laboratório, e à minha irmã Érika, com suas opiniões acadêmicas sempre pertinentes, não tenho palavras para dizer o que vocês representam para mim. Muito obrigado nunca será o bastante.

Obrigado aos meus irmãos Adebald (de coração) e Antônio (de sangue) que representam um forte ponto de apoio, de força e amizade.

À minha Mãe Sílvia, obrigado por tudo. Ao meu Pai Antônio, onde você estiver, sei que está feliz por perceber que seguimos suas pegadas. Obrigado por tê-las deixado e saiba que elas jamais se apagarão.

À Mônica, minha amiga e companheira, quero expressar minhas desculpas pelas ausências, pelos finais de semana no laboratório, pelas intermináveis horas de leitura e escrita. Mas, sobretudo, agradeço pelo prazer de tê-la sempre ao meu lado.

Por fim, mas não menos importante, obrigado a Deus, a quem pedimos sabedoria, força e persistência para continuarmos sempre de pé na busca incessante do “algo mais” que nos permita visualizar melhor a beleza de Sua Obra. Graças a Ele, nossos trabalhos transcorreram justos e perfeitos (dentro de suas imperfeições) e espero que assim continuem.

"Sedare Dolorum Opus Divinum Est"

Hipócrates (460-377 a.C)

Resumo

A neuralgia do trigêmeo (NT) é considerada uma das condições dolorosas mais excruciantes, em que o tratamento empregado é, muitas vezes, tão debilitante quanto a própria patologia. O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia da aplicação do ultrassom terapêutico (USt) - modo pulsado - em um modelo experimental de dor neuropática trigeminal (Nervo Infraorbitário - Lesão por constricção crônica do nervo - CCI-ION), em ratos. Para isso, foi desenvolvido um método de avaliação termonociceptiva facial, o termoalgesímetro, que avalia o tempo de latência para a retirada da cabeça após a aplicação de um estímulo térmico padronizado na região vibrissal de ratos. Após a cirurgia de CCI-ION, observou-se a redução do tempo de latência em função do tempo pós-operatório (basal = $11,29 \pm 0,27$ s; 23º dia = $4,60 \pm 0,13$ s; $p < 0,001$); os animais submetidos à cirurgia falsa (*sham*) e sem procedimento (*naïve*) não apresentaram as mesmas variações. O USt-modo pulsado foi capaz de aumentar o tempo de latência de animais CCI-ION após as aplicações (ERA 1 cm^2 , pulso 1:5, frequência 100 Hz, intensidades $0,4 \text{ W/cm}^2$ e $0,3 \text{ W/cm}^2$). Três aplicações seriadas no lado ipsilateral à lesão, feitas com intervalo de 2 horas, determinaram um efeito antinociceptivo evidente já na primeira avaliação, feita 2 h após a 1ª aplicação (2ª h = $6,79 \pm 0,15$ s; $p < 0,05$). O aumento no limiar termonociceptivo atingiu valores máximos na 24ª h, onde a latência foi maior que os valores basais pré-cirúrgicos (24ª h = $14,29 \pm 0,67$ s; $p < 0,001$), evidenciando um efeito hipalgésico. A magnitude do efeito antinociceptivo foi diretamente proporcional à intensidade da onda ultrasônica. A massagem com o cabeçote do aparelho desligado não alterou os valores basais. O

pré-tratamento com Naltrexona (5 mg/Kg; s.c.) foi incapaz de bloquear o efeito antinociceptivo do USt nas primeiras 8 horas, embora a administração do antagonista opióide feita na 23^a ½ h tenha bloqueado completamente o efeito hipoalgésico observado na 24^a h ($5,05 \pm 0,56$ s; $p < 0,05$), indicando que as vias opioidérgicas estão envolvidas apenas na fase tardia (hipoalgésica) do efeito do USt-modo pulsado. No ensaio imunohistoquímico, verificou-se aumento significativo nos níveis de mieloperoxidase (MPO) no nervo infraorbitário após 3 dias de cirurgia CCI-ION, indicativo da presença de neutrófilos ($\Delta\%$ MPO = $729,30 \pm 88,25$; $p < 0,001$). Estes níveis retornaram a valores estatisticamente semelhantes aos basais no 15^o dia ($\Delta\%$ MPO = $320,67 \pm 157,01$, $p > 0,05$), não sendo modificados pela aplicação do USt. Conclui-se que o USt-modo pulsado pode ser um recurso potencialmente útil e eficaz no tratamento da neuralgia do trigêmeo, embora mais pesquisas sejam necessárias para elucidar os mecanismos pelos quais o USt produz antinocicepção.

Summary

The trigeminal neuralgia (TN) is considered one of the most painful conditions, where the pharmacological treatment can be as debilitating as the pathology itself. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of pulsed Therapeutic Ultrasound (USt) on an experimental model of trigeminal neuropathic pain (Infraorbital Nerve - Chronic Constriction Injury; CCI-ION), in rats. An apparatus for evaluation of facial thermonociception was developed and named of "termoalgesímetro": a constant heat source is applied on the vibrissal pad of rats and time spent for head withdraw-reaction is evaluated in seconds. This method was able to detect the increase (hypoalgesia) or decrease (hyperalgesia) of basal values. After the surgery of CCI-ION, a gradual reduction in head-withdrawal latencies was observed within the postoperative period. The values became constants from the 14th-16th day post-CCI (pre-CCI= $11.29 \pm 0.27s$; post-CCI= $4.60 \pm 0.13s$; $p < 0.001$). No changes on withdrawal-latencies were observed on sham-operated or naïve animals. Three ipsilateral applications of USt (ERA 1 cm², pulse 1:5, frequency 100 Hz, intensity 0.4 W/cm² e 0.3 W/cm²) on post-CCI rats were able to increase the head-withdrawal latencies. This antinociceptive effect was evident since the first evaluation, made 2h after de 1st USt application ($6.79 \pm 0.15s$; $p < 0.05$). The antinociception reached maximum values at 24th h, when the latency was greater than preoperative basal values ($14.29 \pm 0.67s$; $p < 0.001$), evidencing a hypoalgesic effect. The magnitude of the antinociceptive effect was directly proportional to the intensity of the ultrasonic wave. There was no effect when the massage was done with not powered (off) US-apparatus (USt-). Pre-treatment with Naltrexone (5mg/kg;

s.c.) was unable to block the antinociceptive effect of the USt during the first 8 h (9.41 ± 0.64 , $p < 0.05$), although post-treatment with the opioid antagonist, given at the 23th ½ h, completely blocked the hypoalgesic effect, bringing the values back to the USt- levels (UST- = 4.48 ± 0.25 ; USt+NLF_{23th} = 5.05 ± 0.56 s). These results indicate that an opioidergic mechanism is involved only on the latter phase of USt effects. The levels of MPO in the infraorbital nerve were increased on the 3rd day post-surgery and were back to basal values by the 15th day (3rdday = $729,30 \pm 88,25$; 15thday = $320,67 \pm 157.0$ Δ%, taking mean pre-surgery values as 100%), suggesting that neutrophils are present only in acute pos-surgical phase. The USt did not modify the MPO levels. We concludes that the USt is a potentially useful and efficient resource in the treatment of trigeminal neuralgia. Nevertheless, more research is necessary to elucidate the mechanisms involved in antinociception induced by USt.

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HT – serotonina

AINE – antiinflamatório não esteroide

ANOVA – análise de variância

CCI – lesão por constrição crônica

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Clit – contralateral

d – dias

E.P.M. – erro padrão da média

GABA – ácido γ -aminobutírico

GMPc – monofosfato cíclico de guanosina

h – horas

Hz – Hertz

HVA – (canais de cálcio) ativados por alta voltagem

i.m. – via intramuscular

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

IL – interleucina

ION – nervo infraorbitário

Ipsi – ipsilateral

MHz – Mega Hertz

MPO – mieloperoxidase

Morf – Morfina

Nalt – Naltrexona

NGF – Fator de crescimento do nervo

NK – neurocinina

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido Nítrico

NOS – Sintase do Óxido Nítrico

NRM – núcleo magno da rafe

NT – neuralgia do trigêmeo

NTS – núcleo do trato solitário

Op – operados

PAG – substância cinzenta periaquedutal

PBN – núcleo parabraquial

PG – prostaglandina

PKC – proteína quinase C

PMN – polimorfonucleares

s.c. – via subcutânea

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

s – segundos

ST – sem tratamento

TENS – estimulação elétrica transcutânea do nervo

TNF – fator de necrose tumoral

TTX – tetrodotoxina

USt – ultrassom terapêutico

W/cm² – Watts por centímetro quadrado

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Principais vias de dor e temperatura.....	25
Figura 2 - Distribuição do nervo trigêmeo	31
Figura 3 - Representação esquemática da anatomia da área cirúrgica do nervo infraorbitário	58
Figura 4 - A) Representação esquemática do termoalgesímetro B) Demonstração da avaliação termoalgesimétrica	60
Figura 5 - Aparelho de Ultrassom terapêutico.....	62
Figura 6 - Esquema da avaliação temporal do desenvolvimento de hiperalgesia térmica facial após cirurgia de CCI-ION.....	63
Figura 7 - Esquema da avaliação temporal do efeito antinociceptivo decorrente das aplicações seriadas do USt em diferentes intensidades	65
Figura 8 - Esquema da avaliação da sensibilidade do termoalgesímetro na detecção de variações nociceptivas advindas da aplicação de um analgésico opióide e determinação do tempo de duração do efeito do antagonista naltrexona	67
Figura 9 - Esquema da investigação da participação das vias opioidérgicas no efeito antinociceptivo do USt.....	68
Figura 10 - Esquema da avaliação da presença de PMN neutrófilos em decorrência da cirurgia CCI-ION e em função do uso do USt, realizadas em diferentes tempos.....	69

Figura 11 - Desenvolvimento temporal da resposta neuropática de hiperalgesia térmica após cirurgia de CCI-ION	74
Figura 12 - Efeito antinociceptivo decorrente de 03 aplicações seriadas de USt na intensidade de onda de 0,4 W/cm ² em ratos submetidos à cirurgia de CCI-ION.....	76
Figura 13 - Influência da aplicação local do USt, na intensidade de onda de 0,3 W/cm ² , sobre o limiar termonociceptivo facial de ratos submetidos a cirurgia de CCI-ION.....	77
Figura 14 - Ausência de efeito do USt, nas duas diferentes intensidades, sobre o limiar termonociceptivo facial do lado contralateral ao nervo lesado de ratos submetidos à CCI-ION.....	78
Figura 15 - Ausência de efeito do USt, nas duas diferentes intensidades, sobre o limiar termonociceptivo facial de ratos submetidos à cirurgia “sham” e em ratos “naïve”	79
Figura 16 - Influência da intensidade de onda (0,3 W/cm ² e 0,4 W/cm ²) sobre o efeito antinociceptivo do USt.....	80
Figura 17 - Determinação do tempo de bloqueio do efeito da morfina pelo antagonista naltrexona	81
Figura 18 - Avaliação do efeito da naltrexona sobre a antinocicepção induzida pelo USt	82
Figura 19 - Avaliação da presença de neutrófilos em tecido homogeneizado do nervo infraorbitário ipsilateral de ratos submetidos à cirurgia CCI-ION	84
Figura 20 - Avaliação da presença de mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) em tecido homogeneizado do nervo infraorbitário ipsilateral de ratos submetidos à cirurgia CCI-ION após as aplicações do USt	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Dor: conceitos gerais.....	21
2.2 Aspectos neurofisiológicos da dor.....	22
2.3 Dor neuropática.....	26
2.4 Neuralgia do Trigêmeo.....	30
2.4.1 Aspectos gerais.....	30
2.4.2 Provável envolvimento de canais iônicos no processo da NT.....	33
2.5 Modelos experimentais de nocicepção facial.....	35
2.5.1 Nocicepção por estímulos químicos.....	35
2.5.2 Modelo experimental de dor neuropática por constrição crônica do nervo.....	36
2.5.2.1 Avaliação da nocicepção facial.....	41
2.5.2.2 Avaliação comportamental de nocicepção.....	42
2.5.2.3 Avaliação de nocicepção mecânica.....	43
2.5.2.4 Avaliação de nocicepção térmica.....	43
2.6 Tratamento da NT.....	45
2.6.1 Recursos farmacológicos.....	45
2.6.2 Recursos não farmacológicos.....	48
2.7 Ultrassom terapêutico.....	49
3 OBJETIVOS.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Animais.....	56

4.2	Drogas.....	56
4.3	Cirurgia.....	57
4.4	Avaliação da hiperalgesia térmica.....	59
4.5	Aplicação do Ultrassom terapêutico.....	62
4.6	Protocolos Experimentais.....	63
4.6.1	Desenvolvimento da resposta nociceptiva ao estímulo térmico no modelo experimental de dor neuropática decorrente da lesão por constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION), em ratos	63
4.6.2	Efeito da aplicação local do USt – modo pulsado – (ERA 1 cm ² , 1 MHz, pulso 1:5, frequência de onda 100 Hz, intensidade da onda ultrasônica de 0,4 W/cm ²) sobre a resposta nociceptiva neuropática	64
4.6.3	Efeito da variação da intensidade de onda sobre a resposta antinociceptiva determinada pela aplicação local do USt pulsado no modelo de dor neuropática por CCI-ION, em ratos.....	66
4.6.4	Investigação da participação de mecanismos opioidérgicos na antinocicepção induzida pelo USt pulsado	67
4.6.5	Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos no tecido nervoso (nervo infraorbitário) de animais submetidos à CCI-ION	69
4.7	Análise Estatística	71
5	RESULTADOS	72
5.1	Efeito induzido pela lesão por constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) sobre o limiar termonociceptivo facial dos ratos	73
5.2	Efeito do Ultrassom terapêutico (USt) sobre o limiar termonociceptivo facial de ratos operados “CCI-ION”, “sham”, e “naïve”	75
5.3	Ação da naltrexona sobre o efeito antinociceptivo do USt	81

5.4 Avaliação da presença de neutrófilos após a cirurgia de CCI-ION e aplicações do USt	83
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÕES	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I	107

1 – INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A dor representa um importante ganho do ponto de vista evolutivo, pois funciona como um mecanismo sinalizador contra danos teciduais ou elementos potencialmente prejudiciais ao organismo, evocando uma resposta sensorial e motora de proteção. Esta definição aplica-se mais corretamente ao quadro de dor induzida por estímulos nociceptivos, ou seja, quando se trata da chamada dor aguda (AGUGGIA, 2003; CORTELLI & PIERANGELI, 2003).

Entretanto, existem situações patológicas nas quais ocorre a sensação de dor mesmo na ausência de injúrias teciduais ou de estímulos nociceptivos evidenciáveis. A dor neuropática enquadra-se nesta condição, em que muitas vezes percebe-se um sintoma intenso de dor sem que seja possível identificar qualquer tipo de lesão associada (MACFARLANE et al., 1997; SERRA,1999; CHONG & BAJWA, 2003).

Dentre os vários tipos de dor neuropática existe um quadro doloroso chamado *tic douloureux* ou neuralgia do trigêmeo (NT). Esta patologia produz uma sensação de dor repentina, excruciante, de curta duração e geralmente disparada por estímulos inócuos atuando sobre regiões na face denominadas pontos de gatilho. A dor se espalha na área de distribuição do nervo trigêmeo, V par de nervo craniano (MACFARLANE et al., 1997; KITT et al., 2000).

A terapia farmacológica tem sido a principal forma de tratamento para a NT, sendo que alguns anticonvulsivantes como a carbamazepina e a fenitoína são as drogas de primeira escolha (MACFARLANE et al., 1997; COLOMBO et al., 2003).

Entretanto, pesquisas por novos tratamentos têm sido conduzidas devido aos efeitos colaterais significativos advindos do uso destas drogas (STEINHOFF et al., 2003).

A opção cirúrgica geralmente é levada a efeito apenas em pacientes resistentes à farmacoterapia, envolvendo desde a descompressão microvascular até a rizotomia (MACFARLANE et al., 1997).

Como alternativas à opção cirúrgica, existem ainda outras modalidades menos invasivas para o tratamento da NT, entre elas o uso da estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS) (MACFARLANE et al., 1997) e, mais comumente, a acupuntura (CHONG & BAJWA, 2003).

Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura sobre o uso do Ultrassom terapêutico (USt) na NT, existem sugestões que este recurso possa vir a ser uma ferramenta útil no tratamento e controle desta patologia (HSIEH, 2006). Neste afã, pesquisas para determinar a eficácia e funcionalidade desta manobra e sua aplicabilidade na terapia da NT são extremamente importantes.

Mesmo que seu uso racional seja controverso devido à falta de dados experimentais conclusivos que o embasem (BAKER et al., 2001, PHILADELPHIA PANEL, 2001), o USt é um recurso amplamente usado na prática fisioterapêutica, que apresenta facilidade de uso, resultados clínicos promissores no controle dos processos de dor, poucas contra-indicações, praticamente desprovido de efeitos adversos e pouco oneroso, merecendo assim pesquisas que abonem ou não seu uso com bases científicas (ROBERTSON, 2002).

A eficácia do USt foi basicamente avaliada em pesquisas clínicas, com pouco respaldo em pesquisas básicas, deixando uma lacuna importante a ser preenchida. Há uma grande dificuldade de padronizar variáveis experimentais nas pesquisas envolvendo humanos, tais como idade, peso, gênero, controle efetivo de fatores ambientais, uso de

medicamentos, uniformidade dos grupos estudados quanto ao tipo, estágio e gravidade da patologia, gerando deficiências metodológicas que tornam difícil determinar parâmetros confiáveis e estabelecer a segurança e a eficácia de um recurso terapêutico (PHILADELPHIA PANEL, 2001).

Desta maneira, é imprescindível a utilização de modelos animais, e em particular modelos experimentais de dor neuropática, para a determinação da ocorrência de efeito analgésico e estabelecimento de prováveis mecanismos de ação para o USt, obtendo assim informações que embasem o uso deste recurso e demonstrem sua segurança e eficácia na prática clínica.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Dor: conceitos gerais

Em 1979, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu dor como sendo a percepção consciente, pelo indivíduo, de impulsos nociceptivos modulados que originam uma experiência emocional e sensorial ou cognitiva desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão. A complexidade que existe na compreensão e na formulação deste conceito nos dá uma idéia da dimensão dos problemas existentes durante o estudo e o tratamento da dor.

A dor não pode ser entendida ou tratada como uma entidade única, uma vez que se manifesta de diferentes maneiras, sendo os dois principais tipos as dores neuropáticas e inflamatórias (BESSON, 1999). Cada tipo possui características próprias e necessita de manejo específico, sendo, portanto, imprescindível o entendimento preciso de cada um deles. A compreensão destes mecanismos, dos mediadores envolvidos e das adaptações que sofre o organismo é fundamental para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas e manobras outras, que atuem no controle específico deste sintoma.

Entender a origem da dor significa buscar conhecer sua causa e o seu papel evolutivo. A dor aguda apresenta um valor biológico adaptativo, uma vez que se desenvolve em resposta a um estímulo potencialmente nocivo ao tecido. Sendo assim, é um importante sinalizador da integridade de todos os tecidos, incitando

respostas protetoras (SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CORTELLI & PIERANGELI, 2003).

Já a dor crônica não possui esta característica. A sua duração excede a do simples reconhecimento natural de um estímulo e pode estar presente mesmo na ausência de qualquer agente indutor identificável (MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CHONG & BAJWA, 2003). Isto gera sérias implicações, pois a convivência prolongada com uma sensação dolorosa desencadeia distúrbios de personalidade, interfere em vários setores da vida do indivíduo e pode até levá-lo a um quadro de depressão endógena grave (MACFARLANE et al., 1997; HARDEN, 1999; JENSEN, 2002).

2.2 - Aspectos neurofisiológicos da dor

A percepção nociceptiva envolve complexos mecanismos neurofisiológicos, ao mesmo tempo em que sofre influência de experiências pessoais (MACFARLANE et al., 1997). Dor é uma sensação, relatada a partir da percepção consciente do indivíduo. Mais ainda, é um sintoma e não uma doença em si. Além disso, qualquer sensação muito desagradável que gera algum sofrimento tende a ser descrita pelo paciente em termos de dor, mesmo que não esteja associada à ativação das vias nociceptivas clássicas. Isto se torna mais evidente na dor neuropática, com a demonstração que, em alguns casos, as fibras mielínicas de largo diâmetro (fibras A β), normalmente envolvidas na condução de estímulos táteis, podem ser recrutadas para a condução de mensagem nociceptiva (SERRA, 1999). Neste contexto, as fibras A β apresentam mesmo uma mudança fenotípica, passando

a expressar substância P (SP) e Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) após lesão persistente em um nervo periférico (COLOMBO et al., 2003).

Quer seja encarada de uma perspectiva anatômica ou funcional, a nocicepção é uma modalidade sensorial extremamente complexa, mesmo porque em decorrência da importância da informação sobre a vigência de situações potencialmente perigosas ou lesivas para a sobrevivência do indivíduo, as vias e os mecanismos envolvidos na nocicepção são redundantes e ubíquos.

A transmissão da mensagem nociceptiva se dá primariamente através das fibras mielínicas A δ e fibras amielínicas C (BESSON, 1999; AGUGGIA, 2003). Após a ativação dos nociceptores específicos ou mecanoreceptores de alto limiar, produz-se dor percebida de forma localizada, com intensidade proporcional à magnitude do estímulo e duração correspondente à vigência do estímulo doloroso. Uma estimulação mais intensa leva à ativação de nociceptores polimodais (fibras C) que desencadeiam uma sensação de dor difusa e persistente, que perdura após o término do estímulo doloroso agudo. Nesta fase, já há o aparecimento dos aspectos emocionais da dor, que se tornam mais importantes nos quadros de dor crônica (AGUGGIA, 2003).

A transmissão aferente do estímulo nociceptivo relaciona informações vindas da periferia em direção ao córtex, sendo estreitamente dependente da integração em três níveis do sistema nervoso: a medula espinhal, o tronco cerebral e o telencéfalo. As principais vias nociceptivas, à semelhança do que ocorre com outras modalidades de sensações somáticas, compreendem um sistema em relé de três neurônios que conectam a periferia ao córtex.

A ascensão do estímulo nociceptivo através desta cadeia de neurônios inicia-se pelos neurônios de primeira ordem, constituídos por fibras A δ e C, cujos

corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal e que recebem informações vindas da superfície corporal (exceto a face). Estes neurônios conectam-se sinapticamente com os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem ao nível da comissura anterior, os quais estão localizados nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam para o lado oposto da medula espinhal e ascendem em direção ao córtex através do trato espinotalâmico ânterolateral, a principal via ascendente para informação sobre dor e temperatura. Estas fibras conectam-se então com os neurônios talâmicos de terceira ordem, que se projetam para o córtex somatosensorial primário e o sistema límbico, conferindo à dor suas propriedades cognitivas e emocionais (PURVES et al., 2001; AGUGGIA, 2003) (fig. 1A).

No caso de estímulos nociceptivos e térmicos provenientes da face e da boca, a ascensão ao tálamo se dá por uma via diferente. Os neurônios trigeminiais de primeira ordem têm seus corpos celulares localizados no gânglio trigeminal, também chamado gânglio de Gasser. Os axônios destes neurônios entram no tronco encefálico na região da ponte e, após sua entrada, estas fibras trigeminiais descendem para a medula, formando o trato espinhal trigeminal. O trato espinhal trigeminal se divide em três subnúcleos: subnúcleo oral, subnúcleo interpolar e subnúcleo caudado. Os neurônios trigeminiais de primeira ordem fazem sinapse com as fibras dos neurônios de segunda ordem nos subnúcleos interpolar e caudado. Os axônios destes neurônios de segunda ordem cruzam a linha média, ascendendo contralateralmente em direção ao tálamo, através do lemnisco trigeminal. São estas fibras que constituem o trato trigemino-talâmico (fig. 1B).

Além dos impulsos vindos do nervo trigêmeo, o trato espinhal trigeminal também conduz informações de nociceptores faciais e termoreceptores de gânglios

associados com os nervos cranianos VII (nervo facial), IX (nervo glossofaríngeo) e X (nervo vago) e este fato pode ter grande importância clínica para o entendimento dos mecanismos de dor envolvendo a região da face, cabeça e pescoço (OKESON, 1998; PURVES et al., 2001).

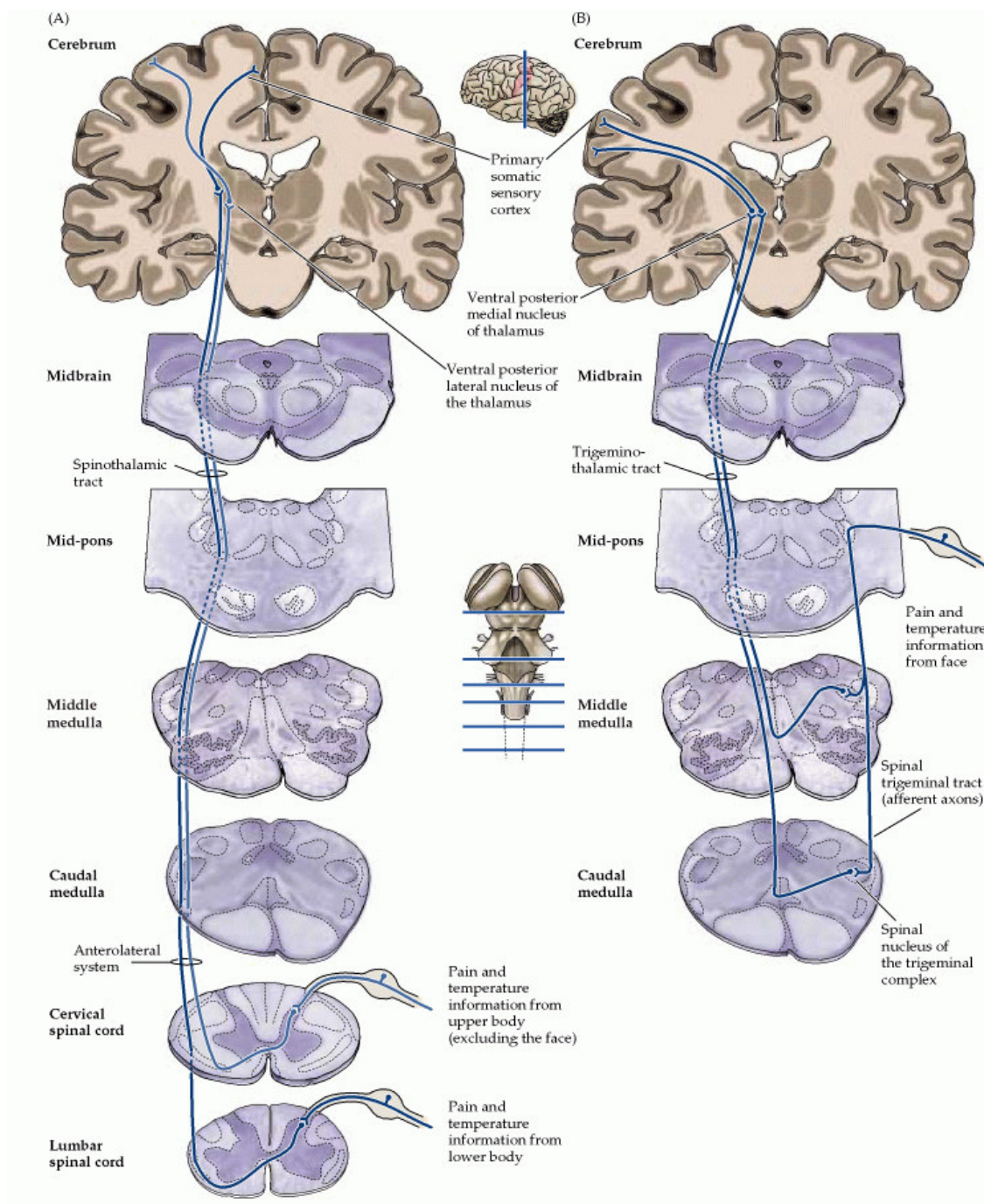


FIGURA 1 - Principais vias de dor e temperatura. (A) Sistema Espinotalâmico. (B) Sistema trigemino-talâmico, que conduz informações de dor e temperatura vindas da face.

Fonte: PURVES et al., 2001.

A informação nociceptiva específica e a vicerossensorial são processadas por diferentes vias de acesso ao sistema nervoso central (SNC). Impulsos nociceptivos periféricos ativam os neurônios específicos na lâmina I do corno dorsal da medula espinhal, o qual se projeta via trato espinotalâmico lateral, ao passo que os impulsos aferentes viscerais são conduzidos em um modo viscerotópico para o núcleo do trato solitário (NTS), do qual partem projeções para o núcleo parabraquial (PBN).

Todavia, a lâmina I envia projeções para o NTS e PBN, fornecendo um substrato para a integração de entradas somáticas e viscerais. Projeções da lâmina I entram em contato com áreas do tronco cerebral envolvidas no controle autonômico, endócrino, antinociceptivo e comportamental. Ela também se projeta para a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo magno da rafe (NRM), determinando que a transmissão da informação nociceptiva seja simultânea à ativação das vias descendentes de controle de dor (CORTELLI & PIERANGELI, 2003).

Estes caminhos e associações mostram como o estímulo nociceptivo é capaz de produzir respostas autonômicas, endócrinas, antinociceptivas e comportamentais integradas.

2.3 - Dor neuropática

Em 1994, pela primeira vez, a IASP propôs a classificação de dor neuropática, como sendo uma dor de origem neural devido a uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso (MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999; CHONG & BAJWA, 2003). Esta condição pode surgir como resultado de lesão a um nervo

periférico (amputações, deafferentações), infecções (neuralgia pós-herpética), compressão do nervo (acidentes, cirurgias, tumores), infarto, distúrbios metabólicos (neuralgia diabética) ou ser idiopática. Em geral, a dor neuropática é classificada de acordo com sua causa intrínseca (tal como neuralgia pós-herpética) ou pela presumível localização da lesão nervosa, central ou periférica (CHONG & BAJWA, 2003).

A despeito da grande variação etiológica, as manifestações clínicas desta condição geralmente são uniformes (MACFARLANE et al., 1997), sendo comuns as queixas de “queimação”, “hipersensibilidade local”, “dor lancinante” ou “disparos de dor” (MACFARLANE et al., 1997; CHONG & BAJWA, 2003).

O mecanismo que resulta na dor neuropática difere daquele envolvido na gênese da dor nociceptiva que surge em resposta à ativação dos nociceptores por um estímulo potencialmente nocivo. Assim, a dor nociceptiva tende a ser localizada e finita, deixando de existir com a remoção ou término do estímulo nociceptivo (CHONG & BAJWA, 2003). Já na dor neuropática, a sensação dolorosa persiste mesmo após a retirada do estímulo nociceptivo, podendo ocorrer mesmo quando este é indetectável (MACFARLANE et al., 1997; SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003; CHONG & BAJWA, 2003). Isto se dá em função de alterações nos neurônios e nas fibras que conduzem a mensagem nociceptiva. A estimulação repetitiva das fibras aferentes amielínicas C produz uma sensibilização dos neurônios de segunda ordem, com subsequente redução no seu limiar de ativação, levando à ocorrência de atividade espontânea através de um foco irritável no SNC, sendo este o fenômeno conhecido por sensibilização central (MACFARLANE et al., 1997; CORTELLI & PIERANGELI, 2003).

A liberação de SP e neurocinina A (NKA) na medula espinhal e a super-expressão de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) parecem ser cruciais na indução da sensibilização central (MACFARLANE et al., 1997). Estes neuropeptídeos ligam-se a receptores NK₁ e NK₂, disparando a liberação de cálcio intracelular. O aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ leva à excitabilidade neuronal, deslocando o íon magnésio que bloqueia fisicamente o canal do receptor NMDA. Uma vez desbloqueado, a ativação do receptor NMDA por aminoácidos excitatórios, como o glutamato, leva a um influxo de Ca²⁺ e Na⁺ para a célula, aumentando ainda mais a excitabilidade neuronal. Além disso, o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ permite que este íon atue como segundo mensageiro em mecanismos que contribuem para a manutenção do estado de dor persistente. Dentre estes mecanismos estão a ativação de proteína quinase C, ativação da Sintase do Óxido Nítrico (NOS) e da Fosfolipase C, levando à produção espinhal de óxido nítrico (NO) e prostanóides, que contribuem para o desenvolvimento da sensibilização (MACFARLANE et al., 1997; BESSON, 1999). Também pode ocorrer acúmulo e uma nova expressão de canais de sódio na periferia e redução da inibição GABAérgica (JENSEN, 2002).

Tem sido sugerido ainda que a resposta inflamatória desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática decorrente de lesão periférica do nervo (CLATWORTHY et al., 1995; BENOLIEL et al., 2002; MA et al., 2002).

De fato, observa-se que a sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores do processo inflamatório pode ser importante no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia primária, fenômeno limitado à área da lesão e imediatamente adjacente, em que a redução do limiar de dor resulta da participação

de bradicinina, serotonina (5-HT), SP e subprodutos do ácido araquidônico (TREEDE et al., 1992; CAMU et al., 2003), além da liberação de citocinas e fatores de crescimento do nervo (CLATWORTHY et al., 1995; ANDERSON & RAO, 2001; CAMU et al., 2003).

Subsequentemente à manutenção deste estado, ocorrem alterações neuroplásticas nos neurônios do corno dorsal com conseqüente sensibilização central que leva ao desenvolvimento da hiperalgesia secundária, característica da dor neuropática, na qual a dor pode ser desencadeada por estímulos nociceptivos aplicados em regiões não lesadas, fora mesmo do sítio da lesão (TREEDE et al., 1992; PERTOVAARA et al., 1997; CAMU et al., 2003).

Além disso, tem-se demonstrado que a redução do controle inibitório descendente exercido pela PAG sobre a transmissão da resposta nociceptiva pode ter papel fundamental no desenvolvimento da hiperalgesia seguida à lesão do nervo (PERTOVAARA et al., 1997), indicando uma função fundamental da PAG na modulação de estímulos nociceptivos originados no complexo trigeminal (KNIGHT et al., 2002).

A farmacoterapia é a principal base de tratamento das dores neuropáticas. Como a resposta da dor neuropática aos analgésicos primários pode ser total ou parcialmente inefetiva, frequentemente é indicado o uso de fármacos analgésicos adjuvantes, isto é, drogas cuja primeira indicação não é analgesia. Assim, o tratamento das dores neuropáticas utiliza comumente agentes ditos “estabilizadores de membrana” como alguns antiarrítmicos e antiepilépticos, que inibem descargas ectópicas em membranas neurais danificadas, e drogas que aumentam a inibição ao nível do corno dorsal, como os antidepressivos tricíclicos (CHONG & BAJWA, 2003).

2.4 - Neuralgia do Trigêmeo

2.4.1 – Aspectos gerais

A neuralgia do trigêmeo (NT) é um tipo de dor neuropática cranial (COLOMBO et al., 2003), comumente relacionada à compressão crônica neurovascular de algum dos ramos do nervo trigêmeo (V par de nervo craniano), que leva a um processo de desmielinização e hiperatividade das fibras nervosas (PENNISI et al., 1991; MACFARLANE et al., 1997; KITT et al., 2000). Ela pode ser considerada sintomática quando surge como resultado de complicações de neoplasias, mal-formações arteriovenosas, doenças inflamatórias e/ou autoimunes do SNC, como a esclerose múltipla (COLOMBO et al., 2003) ou ser idiopática, quando não existe uma causa aparente evidente (OKESON, 1998).

Esta condição patológica é talvez a mais excruciante das síndromes de dor neuropática, por isso também conhecida por *tic douloureux*. Em geral, observa-se uma maior incidência na população idosa, afetando principalmente as mulheres. Porém, acredita-se que seja a idade o principal fator de risco e o fato de atingir mais a população feminina seja decorrente do aumento da proporção de mulheres na população com o avanço da idade (MACFARLANE et al., 1997, KITT et al., 2000).

A NT é caracterizada por sintomas específicos de dor, que inclusive servem para o diagnóstico diferencial entre outros tipos de dor na face, como as odontalgias, dores inflamatórias articulares e musculares. Estes sintomas incluem episódios de dor lancinante de duração breve seguida por períodos livres de dor, disparos abruptos unilaterais geralmente decorrentes de estímulos não nociceptivos, descargas tardias e irradiação espacial da dor para a região inervada pelo ramo

afetado, a partir das zonas de disparo chamadas de “*trigger points*” ou pontos de gatilho.

A dor acontece na área inervada pelo nervo trigêmeo (fig. 2), na maior parte das vezes envolvendo o terceiro ramo (ramo mandibular), com possibilidade de combinação com o segundo ramo (ramo maxilar) (PENNISI et al., 1991; MACFARLANE et al., 1997). Pode ser observada ainda a ocorrência de zonas de disparo fora do ramo trigeminal afetado (KITT et al., 2000).

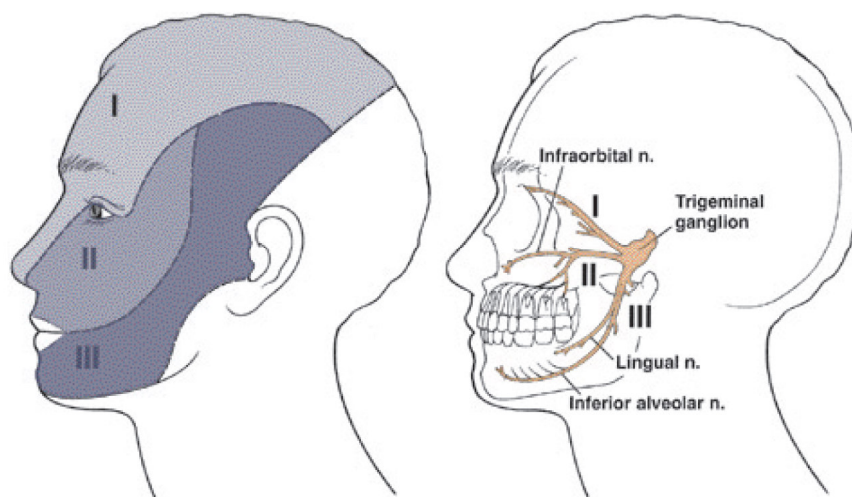


FIGURA 2 - Distribuição do nervo trigêmeo. À esquerda, a área cutânea de distribuição da inervação de cada uma das três divisões do nervo trigêmeo. À direita, os três ramos do nervo trigêmeo ao surgirem do gânglio trigeminal ou gânglio de Gasser. I: nervo oftálmico; II: nervo maxilar; III: nervo mandibular.

Fonte: FRIED et al., 2001, p. 156.

A dor trigeminal apresenta algumas características clínicas semelhantes às da dor visceral, como a possível dissociação de lesão tecidual, dor profunda, difusa e pobremente localizada, acompanhada por reflexos motor e autonômico (CORTELLI & PIERANGELI, 2003).

O nervo trigêmeo possui características singulares que podem ser a base das diferenças na resposta a injúrias quando comparado aos nervos espinhais, tais como a sua origem embrionária, a proporção e distribuição de fibras mielínicas,

amielínicas e simpáticas, além de características anatômicas. O fato de alguns dos ramos do nervo trigêmeo estarem localizados dentro de canais ósseos confere certa proteção, mas por outro lado vulnerabiliza o nervo às lesões por compressão, que podem surgir em razão de edema ou mesmo do deslocamento de um fragmento ósseo após fratura (FRIED et al., 2001; PENNISI et al., 1991).

Mesmo que a compressão neurovascular seja considerada a principal causa identificável da NT, o mecanismo que leva à hiperexcitabilidade neuronal ainda não está elucidado, embora sejam sugeridas semelhanças com os mecanismos que envolvem a gênese da sensibilização central.

Em outras neuropatias pode ser observada uma alodínia táctil provocada por estímulos não nociceptivos como o leve toque de um pincel, o que fornece boas evidências da ativação de mecanorreceptores de baixo limiar (fibras A β). Todavia, esta alodínia não se compara à dor paroxística provocada pelo leve toque na NT (KITTEL et al., 2000), evidenciando a necessidade de mais estudos para determinar o mecanismo que leva a esta condição.

Muitas hipóteses têm sido propostas a este respeito, como a mudança qualitativa e/ou quantitativa na expressão de alguns neuropeptídeos, a modificação na condutância de alguns canais iônicos (principalmente canais de sódio) e a participação de uma resposta simpática potencializando o quadro de dor (FRIED et al., 2001). Pesquisas têm sido desenvolvidas com base nestas hipóteses e tratamentos estão sendo propostos, porém a etiologia da NT ainda está por ser esclarecida.

2.4.2 – Provável envolvimento de canais iônicos no processo da NT

Principalmente através da análise dos mecanismos envolvidos na ação das drogas usadas no tratamento da NT verifica-se a importância do envolvimento de diferentes canais iônicos na transmissão e modulação da resposta nociceptiva. Sabe-se, por exemplo, que a ativação de canais de sódio voltagem-dependentes parece desempenhar papel crucial na transmissão da mensagem nociceptiva. A tetrodotoxina (TTX), uma toxina guanidina, bloqueia seletivamente estes canais, impedindo a geração e propagação de potenciais de ação em fibras musculares e nervosas (BAKER & WOOD, 2001). Os canais de sódio tetrodotoxina-resistentes (TTX-r) estão presentes em maior concentração em neurônios de pequeno diâmetro nos gânglios da raiz dorsal, que são os corpos celulares das fibras A δ e C, primariamente nociceptivas. Entretanto, os canais de sódio tetrodotoxina-sensíveis (TTX-s) parecem ser essenciais para a transmissão do potencial de ação nas fibras C (BAKER & WOOD, 2001). Observa-se que vários mediadores hiperalgésicos que alteram o limiar de nocicepção, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a 5-HT, aumentam as correntes TTX-r e reduzem o limiar de ativação de neurônios sensoriais na dor inflamatória (BAKER & WOOD, 2001). Já nos estados de dor neuropática esta relação se altera e uma possível acumulação de canais de sódio TTX-s em neurônios do gânglio da raiz dorsal de nervos periféricos lesados pode ter papel crítico na geração de descargas ectópicas e manutenção da alodínia mecânica em animais experimentais (LYU et al., 2000; SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

Os canais de cálcio voltagem-dependentes geram pulsos rápidos e breves de influxo de cálcio e estão relacionados à liberação de neurotransmissores

(JONES, 1998). Este íon está envolvido na regulação de diversos processos biológicos e as diferentes expressões e arranjos das subunidades de seus canais estão ligadas ao desenvolvimento de algumas doenças (McENERY et al., 1998; KNIGHT et al., 2002). A participação de canais de cálcio ativados por alta voltagem (HVA) na modulação da nocicepção tem sido estabelecida, principalmente dos tipos N e P/Q, enquanto a participação do tipo L permanece incerta. Existem evidências que os opióides induzem analgesia a partir da ativação de receptores próprios que levam à redução da concentração intracelular de cálcio, principalmente relacionado aos canais de cálcio tipo L e N (PRADO, 2001). Estudos recentes demonstraram a participação fundamental dos canais de cálcio tipo T no efeito antinociceptivo dos opióides e seu papel no desenvolvimento da tolerância aos efeitos antinociceptivos destes medicamentos (DOGRUL et al., 2002).

Os canais de potássio também parecem ter importância fundamental na modulação da dor. Existem evidências que a ativação destes canais participam do efeito antinociceptivo periférico e central da morfina (RODRIGUES & DUARTE, 2000; TAKEDA et al., 2004) e da dipirona (ALVES & DUARTE, 2002). Demonstrou-se também que esta ativação possivelmente está relacionada à via do GMPc-NO (SOARES & DUARTE, 2001). Observa-se, também, que drogas que estimulam o aumento do GMPc e liberação de NO periféricamente induzem analgesia em um modelo inflamatório (DUARTE et al., 1990) e, ao menos em parte, o efeito antinociceptivo periférico e central da morfina acontece através desta via (FERREIRA et al., 1991; DUARTE & FERREIRA, 1992).

2.5 - Modelos experimentais de nociceção facial

Modelos experimentais específicos são necessários para as pesquisas na área de dor neuropática, especialmente quando se trata da neuralgia do trigêmeo, por se tratar de um nervo que apresenta características peculiares, como foi descrito anteriormente.

Assim sendo, vários modelos experimentais de nociceção na região facial, que avaliam o desenvolvimento da dor inflamatória e neuropática, têm sido testados recentemente na tentativa de elucidar os mecanismos da condução da mensagem nociceptiva na região do complexo trigeminal e, mais especificamente, de mimetizar um processo algésico que se assemelhe à neuralgia do trigêmeo, fornecendo substrato para avaliar a eficácia de intervenções farmacológicas ou não-farmacológicas.

2.5.1 – Nociceção por estímulos químicos

Um dos métodos mais frequentemente utilizados é a adaptação do teste da formalina para a região orofacial de ratos e camundongos. A injeção subcutânea deste agente fornece um bom modelo para o estudo da dor, a qual é avaliada por uma gama de respostas comportamentais estereotipadas que se desenvolve em duas fases: uma primeira fase neurogênica de curta duração que, após pequeno intervalo de quiescência, é sucedida pela segunda fase, marcada pelo aparecimento da resposta inflamatória (TJØLSEN et al., 1992). Este teste, originalmente descrito por Dubuisson & Dennis (1977) para a pata de ratos, tem sido adaptado com sucesso para a região

orofacial, tornando-se uma ferramenta útil para pesquisa de processos de dor tônica na região trigeminal (CADET et al., 1995; ROVERONI et al., 2001).

Todavia, o teste da formalina orofacial mimetiza condições algésicas agudas, não servindo para o estudo da dor crônica nem de condições dolorosas craniofaciais profundas (ROVERONI et al., 2001; RABOISSON & DALLEL, 2004).

Uma outra limitação deste teste é não permitir a avaliação de um quadro de hipoalgesia, uma vez que a antinocicepção máxima que pode ser vista é o retorno do comportamento ao basal. Além disso, drogas que alterem a “performance” motora do animal podem gerar confusão e inexatidões, uma vez que as alterações da resposta nociceptiva são avaliadas por comportamentos motores (RABOISSON & DALLEL, 2004).

Outro teste para mimetizar a dor trigeminal envolve a aplicação de Adjuvante Completo de Freund na porção orbital do nervo infraorbitário, o que induz uma resposta de hiperalgesia que se desenvolve cerca de 3 dias após a aplicação e se mantém por mais 3 dias (BENOLIEL et al., 2002).

2.5.2 – Modelo experimental de dor neuropática por constricção crônica do nervo

O modelo de injúria por constricção crônica (CCI) é citado como um dos principais métodos de estudo de dor neuropática (WANG & WANG, 2003), sendo sua adaptação para o nervo infraorbitário (ION) um dos principais modelos de estudo da neuralgia do trigêmeo. Este método foi desenvolvido inicialmente por Bennett & Xie (1988) para nervo ciático e adaptado por Vos et al. (1994) para o nervo infraorbitário em ratos. A cirurgia de acesso ao nervo infraorbitário segue uma técnica descrita por Gregg (1973), adaptada por Vos et al. (1994), na qual o nervo

infraorbitário é interceptado próximo à porção caudal do forame, por um acesso através da órbita, sendo realizadas duas ligaduras parciais ao redor deste. Conforme descrito na técnica original, a ligadura não pode ocluir totalmente a passagem do estímulo nervoso, sendo requerido algum grau de inervação para que a neuropatia se desenvolva (ANDERSON & RAO, 2001).

É interessante notar que a despeito de compartilharem mecanismos comuns aos processos de neuropatia, os modelos de dor neuropática de ciático e trigêmeo possuem características próprias que fazem com que sejam necessários estudos específicos em cada um destes complexos.

Uma destas diferenças relevantes relatada é que o modelo de ciático pode não modificar o limiar de nocicepção térmica ao calor (PERTOVAARA et al., 1997), ao passo que a redução do limiar termonociceptivo é uma característica do modelo de neuropatia trigeminal (IMAMURA et al., 1997). Cita-se ainda que o modelo de neuropatia trigeminal é menos sensível à estímulos mecânicos que o modelo do ciático (TAL & DEVOR, 1992). Deste modo, a avaliação de nocicepção térmica pode estar mais indicada para o modelo de neuropatia trigeminal.

Como resultado à CCI-ION, os animais desenvolvem hiper-responsividade à estimulação mecânica (VOS et al., 1994; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999) e térmica (IMAMURA et al., 1997), além de alterações comportamentais, como o aumento do “grooming” direcionado a área inervada pelo ramo lesado (KRYZHANOVSKII et al., 1993; VOS et al., 1998; DESEURE & ADRIAENSEN, 2002, 2004). Este comportamento é sugestivo da hiperalgesia que se segue após a lesão no nervo.

Relatam-se ainda alterações imunohistoquímicas no gânglio trigeminal (BENOLIEL et al., 2001, 2002) e nos neurônios da raiz dorsal da medula espinhal

(VOS & STRASSMAN, 1995), além do aumento dos níveis de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6) e fator de crescimento do nervo (NGF), que estão super-expressos no sítio do nervo lesado (ANDERSON & RAO, 2001). Também observam-se alterações bioelétricas no córtex somatosensorial (KRYZHANOVSKII et al., 1993) e eletrofisiológicas, vistas através do aumento da atividade espontânea nos neurônios do gânglio trigeminal do lado ipsilateral ao nervo lesado (CHUDLER & ANDERSON, 2002).

Verificou-se que a resposta inflamatória circunjacente ao local da constrição do nervo pode ter papel central no aparecimento da neuralgia no modelo de CCI (CLATWORTHY et al., 1995) e que a utilização de manobras que limitariam este processo pode reduzir o desenvolvimento da hiperalgesia (CHUDLER & ANDERSON, 2002). Tem-se demonstrado ainda que citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento estão super-expressos no desenvolvimento da hiperalgesia nos modelos de CCI (CLATWORTHY et al., 1995; ANDERSON & RAO, 2001; OKAMOTO et al., 2001).

Algumas células inflamatórias e do sistema imune parecem estar implicadas no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática seguida à lesão periférica do nervo. É provável que os polimorfonucleares (PMN) neutrófilos estejam envolvidos nas fases iniciais de desenvolvimento da neuropatia (PERKINS & TRACEY, 2000), enquanto mastócitos e macrófagos podem ser os principais responsáveis pela liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β e NGF. No SNC este papel parece ser desempenhado também por leucócitos hematógenos e por células microgliais residentes. A participação dos macrófagos nas fases iniciais e tardias do desenvolvimento da hiperalgesia térmica subsequente à CCI parece ser crucial (MARCHAND et al., 2005).

O acúmulo inicial de neutrófilos pode estar sendo mediado pela liberação de IL-1 β a partir da ativação de receptores NK₁ por taquicininas endógenas, através de um mecanismo pró-inflamatório associado à inflamação neurogênica (PINTÉR et al., 2002). Isto constituiria uma alça amplificadora em que a inflamação neurogênica potencializa a resposta inflamatória e esta, por sua vez, participa ativamente do início e desenvolvimento da neuropatia.

O aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão intimamente relacionados ao surgimento da hiperalgesia mecânica e térmica seguida à CCI no nervo ciático de ratos, enquanto o aumento dos níveis de IL-10 parece estar ligado à resolução do processo (OKAMOTO et al., 2001). Do mesmo modo, observa-se o aumento dos níveis de IL-6 e de NGF no nervo infraorbitário lesado e no tronco cerebral de ratos, sendo também correlacionados ao desenvolvimento da alodínia mecânica no modelo de CCI do trigêmeo (ANDERSON & RAO, 2001).

Demonstrou-se que a aplicação de IL-1 β e TNF- α recombinante de rato no nervo ciático, em doses fisiológicas, induz intenso infiltrado de macrófagos no epineuro e é capaz de mimetizar um quadro comportamental semelhante ao da dor neuropática, sem que haja alterações morfológicas no nervo (ZELENKA et al., 2005). Entretanto, observa-se também que a despeito da importância das citocinas no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, sua presença parece ser insuficiente, por si só, para manter por longo período este estado (ANDERSON & RAO, 2001).

A utilização sistêmica de IL-10 tem demonstrado ser efetiva no controle dos sinais sugestivos de hiperalgesia em modelos experimentais de dor neuropática. Deste modo, o pré-tratamento com a IL-10 reduziu de maneira significativa, em ratos, os sinais de incapacitação da articulação de joelho induzida pela administração intra-articular de zimosan, independente de ativação de vias

opioidérgicas (VALE et al., 2003). De maneira semelhante, a administração intratecal de IL-10 reduz o desenvolvimento da alodínia no modelo de neuropatia induzida por dinorfina (LAUGHLIN et al., 2000). Além disto, manobras terapêuticas que determinam um aumento da produção de IL-10, como a terapia gênica intratecal, têm se mostrado eficazes no tratamento da dor neuropática em modelos animais, nos quais a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica foram prevenidas ou mesmo revertidas a partir deste recurso, sem que, contudo, se alterasse o limiar nociceptivo mecânico e térmico nos animais “sham” operados (MILLIGAN et al., 2005).

Assim sendo, acredita-se que pelo menos parte do efeito antinociceptivo induzido pela IL-10 se deve à inibição da liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-1 β e a TNF- α (LAUGHLIN et al., 2000, VALE et al., 2003).

Embora não se negue a importância relativa da inflamação inicial, é provável que outros fatores estejam envolvidos no desenvolvimento e na manutenção do estado de dor seguido à lesão do nervo (CLATWORTHY et al., 1995; CHUDLER & ANDERSON, 2002), já que também se observa o aparecimento da hiperalgesia seguida à CCI de ciático mesmo utilizando-se o fio de seda inerte (OKAMOTO et al., 2001), contrariando o conceito que a resposta inflamatória induzida diretamente pelo material do fio utilizado para a constrição seria imprescindível para o desenvolvimento da hiperalgesia.

Outro argumento em favor da hipótese de que a inflamação, *de per se*, não pode ser responsabilizada pela neuropatia reside na observação de que nos modelos de estudo em que a hiperalgesia decorre basicamente da resposta inflamatória, houve um curto período de avaliação do desenvolvimento da hiperalgesia e um tempo reduzido de estabilidade desta resposta quando

comparado ao modelo de CCI, no qual se observa o desenvolvimento gradual dos sinais de hiperalgesia, que perduram por mais de 60 dias após a lesão (VOS et al., 1994; DESEURE & ADRIAENSEN, 2002).

Finalmente, o desenvolvimento da neuropatia associado à resposta inflamatória pode ser explicado pelo fato de a CCI reduzir em mais de 50% o fluxo sanguíneo no nervo, o que é suficiente para causar degeneração isquêmica de algumas fibras, levando à cascata de eventos inflamatórios que resultam no aumento dos níveis de interleucinas e fatores de crescimento do nervo (OKAMOTO et al., 2001).

Os testes com o modelo experimental de CCI-ION mostram comportamento de nocicepção semelhante à neuralgia do trigêmeo, apresentando respostas até certo ponto equivalentes às esperadas pelos medicamentos normalmente utilizados no tratamento desta patologia (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). Desta forma, este modelo tem sido um importante instrumento de pesquisa para esta patologia.

2.5.2.1 – Avaliação da nocicepção facial

Tão importante quanto a caracterização de um modelo de nocicepção semelhante à neuralgia de trigêmeo em humanos, é o desenvolvimento de métodos adequados de mensuração da hiperalgesia proveniente da lesão periférica ao nervo. Métodos eficazes de avaliação de hiperalgesia na área trigeminal ainda são um desafio (NEUBERT et al., 2005).

As características desejáveis de um método de avaliação são reprodutibilidade, ser quantificável e não invasivo (LE BARS et al., 2001). Assim sendo, a escolha do teste de avaliação deve passar por critérios objetivos múltiplos, tais como aplicabilidade, custo, facilidade de execução da técnica e, principalmente,

adequação ao modelo estudado e ao objetivo proposto, uma vez que todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens.

2.5.2.2 – Avaliação comportamental de nocicepção

Entre os modelos comportamentais, a avaliação do "grooming" como resposta nociceptiva mostra-se um método eficaz, porém de interpretação complexa. Além disso, esta avaliação comportamental sofre importantes variações na resposta dependendo das condições ambientais (BENOLIEL et al., 2001; DESEURE & ADRIAENSEN, 2004). Observa-se que, após a cirurgia, os animais submetidos à CCI-ION apresentam comportamento aversivo e "grooming" assimétrico espontâneo direcionado ao sítio da lesão, sugestivo de hiperalgesia (KRYZHANOVSKII et al., 1993; VOS et al., 1994, 1998; DESEURE & ADRIAENSEN, 2002, 2004). A dificuldade encontrada em vários métodos de avaliação comportamental de nocicepção é que, em muitos casos, a resposta avaliada faz parte do repertório natural de ações do animal e podem estar alteradas em situações distintas da nocicepção, como é o caso do "grooming". Desta forma, é necessário criar mecanismos outros que diferenciem com maior exatidão o que é um comportamento normal de um comportamento nociceptivo ou nocifensivo. É importante salientar que este método não permite a avaliar a ocorrência de hipotalgesia, à semelhança do que acontece com a avaliação pelo método da formalina orofacial.

2.5.2.3 – Avaliação de nocicepção mecânica

A estimulação mecânica mostra-se eficaz para avaliar as alterações do limiar nociceptivo seguido a CCI-ION. A utilização dos monofilamentos de von Frey (estesiometria) detecta alterações no limiar de nocicepção mecânica. Por este modelo, observa-se inicialmente o desenvolvimento de hipoalgesia no lado lesado que gradualmente é substituída por uma resposta hiperalgésica (VOS et al., 1994; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). Mais uma vez, as limitações deste método residem nas nuances de sua execução e na sua relativa baixa sensibilidade.

2.5.2.4 – Avaliação de nocicepção térmica

A utilização de um teste térmico traz algumas vantagens sobre estímulos mecânicos e elétricos pelo fato ativar basicamente nociceptores específicos ou polimodais, ao passo que a estimulação mecânica pode ativar também mecanoreceptores de baixo limiar (fibras A β) e produzir desta maneira, uma falsa resposta exacerbada de dor, enquanto a estimulação elétrica relaciona-se inicialmente aos receptores de baixo limiar, ativando os nociceptores apenas em um segundo momento (LE BARS et al., 2001). Assim, a nocicepção térmica é tida como uma estimulação específica, inequívoca e que não produz lesões teciduais graves se adequadamente controlada (MORRIS et al., 1982).

Desta maneira, vários testes de estimulação térmica têm sido propostos para a região orofacial. Morris et al. (1982) desenvolveram um método no qual um aparato é montado na cabeça do rato mantendo um filamento em contato com a pele do animal. Este filamento então se aquece e produz uma resposta

característica, que é o de levar as patas dianteiras ou traseiras diretamente ao local estimulado, sendo este o ponto de corte. A temperatura neste momento marca a medida da nocicepção. Este método trás como principal desvantagem o tempo requerido, o custo e a logística necessária para sua aplicação, sendo assim pouco atrativo para testes de ação de drogas e outras manobras antinociceptivas.

Imamura et al. (1997) descreveram um modelo de avaliação térmica facial a partir de uma adaptação do teste proposto por Hargreaves et al. (1988) para patas de ratos. O teste consiste da aplicação de uma fonte de calor radiante sobre o centro da região das vibrissas do rato. Neste modelo, os ratos ficam contidos em uma caixa própria, em que apenas a região avaliada fica exposta, mas com espaço suficiente para o recuo da cabeça do animal. O ponto de corte deste método é o tempo de latência, ou seja, o tempo que o animal leva para perceber o estímulo térmico como estímulo nociceptivo e recuar a cabeça. Este teste mostrou-se eficiente em detectar uma redução no limiar termonociceptivo após a cirurgia de CCI-ION.

Outro modelo térmico recentemente descrito utiliza um dispositivo térmico no qual o rato toca ao acessar o bebedouro. Neste método é avaliado o número de vezes que o animal toca o dispositivo e o tempo em que permanece em contato com este. Este método mostra-se eficiente em demonstrar alterações no limiar nociceptivo após a aplicação de um agente pró-inflamatório, a carragenina, e a subsequente reversão da hiperalgesia através da administração de morfina (NEUBERT et al., 2005). Em nossa avaliação, este método é pouco viável para avaliações crônicas, como as que se fazem necessárias no modelo de CCI, além do fato de poder induzir desidratação no animal, com conseqüências difíceis de serem avaliadas.

2.6 - Tratamento da NT

2.6.1 – Recursos farmacológicos

Na prática clínica, a principal forma de tratamento da NT consiste do uso de algumas drogas anticonvulsivantes como a carbamazepina (medicamento de primeira escolha), fenitoína, gabapentina e lamotrigina. Os analgésicos primários, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e os opióides, geralmente não estão relacionados entre as drogas de primeira escolha no tratamento da NT (MACFARLANE et al., 1997; KITT et al., 2000; JENSEN, 2002; CHONG & BAJWA, 2003; COLOMBO et al., 2003).

A carbamazepina é tão eficaz no tratamento da NT que em algumas situações a resposta positiva ou não da dor frente ao uso do medicamento é inclusive considerada para efeito de diagnóstico diferencial (KITT et al., 2000). Atribui-se o sucesso da carbamazepina no tratamento desta patologia à sua habilidade de bloquear canais de Na⁺. Isto explicaria o alívio do aspecto lancinante da dor, mas o exato mecanismo pelo qual isto ocorre não é completamente compreendido (MACFARLANE et al., 1997). A oxcarbazepina, um ceto-análogo da carbamazepina com o mesmo mecanismo de ação, tem sido utilizada com o mesmo sucesso no alívio da dor, apresentando menos efeitos colaterais. Os principais efeitos colaterais da carbamazepina são dose-dependentes e incluem náuseas, dificuldade de concentração, vertigem, ataxia, diplopia e, em indivíduos idosos, distúrbios cardíacos (COLOMBO et al., 2003).

A fenitoína foi a primeira droga usada com sucesso no tratamento da NT. Ela possui mecanismo de ação semelhante ao da carbamazepina, promovendo o

bloqueio inespecífico de canais de Na^+ , mas também podendo influenciar canais de Ca^{2+} e K^+ . Seus efeitos colaterais são semelhantes aos da carbamazepina e, desta forma, a substituição da carbamazepina por esta droga pode não oferecer vantagens (MACFARLANE et al., 1997).

Outros tipos de anticonvulsivantes como a gabapentina, análogo do ácido γ -aminobutírico (GABA, neurotransmissor inibitório do SNC), também vem sendo utilizado com sucesso no tratamento da NT. A gabapentina é um análogo estrutural do GABA, mas não tem uma ação direta GABAérgica. Entretanto, ela aumenta a liberação de GABA em várias estruturas cerebrais, o que pode potencializar as vias descendentes inibitórias moduladoras do sinal de dor. Tem sido observado ainda que a gabapentina bloqueia uma subunidade dos canais de Ca^{2+} no neurônio, além de também inibir a síntese de glutamato, um neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão da dor (CHRISTENSEN et al., 2001). Ela tem sido utilizada nas síndromes de dor neuropática com a finalidade de inibir descargas ectópicas de nervos periféricos lesionados, possivelmente através do antagonismo aos receptores NMDA e canais de Ca^{2+} no SNC, sendo possível que os principais alvos da gabapentina sejam os canais de Ca^{2+} neuronais voltagem-dependentes. A gabapentina é bem tolerada e apresenta poucos efeitos adversos. Os principais efeitos adversos observados são sonolência, vertigem, ataxia e fadiga (HARDEN, 1999; COLOMBO et al., 2003).

A lamotrigina é um antiepiléptico de nova geração que vem sendo testado com certo sucesso em algumas síndromes de dor neuropática, como a NT e no tratamento da enxaqueca. Atua inibindo e estabilizando a conformação dos canais de Na^+ voltagem-dependentes (AGOSTONI et al., 2003; COLOMBO et al., 2003) e também reduzindo a liberação de glutamato e aspartato (CHRISTENSEN et al.,

2001; COLOMBO et al., 2003). Observa-se ainda que a lamotrigina pode modular a ação de canais de Ca^{2+} e K^{+} (CHRISTENSEN et al., 2001; PISANI et al., 2004). Seus principais efeitos colaterais incluem ataxia, descoordenação motora, visão borrada e diplopia.

Apesar de a literatura ser contraditória no que se refere à atividade analgésica dos opióides no controle da dor neuropática, existem evidências que apontam para uma ação positiva destes agentes nestas condições e especificamente no controle da NT. Alguns analgésicos opióides foram avaliados em diferentes modelos experimentais de neuropatia no ciático e se mostraram eficazes na redução da hiperalgesia mecânica e térmica (ERICHSEN et al., 2005). Em outro estudo, a morfina, sozinha ou em associação com um agonista serotoninérgico altamente específico para os receptores 5-HT_{1A} , mostrou-se eficaz em inibir a alodínia mecânica no modelo experimental de dor neuropática trigeminal (DESEURE et al., 2004). Foi demonstrado também que os neurônios do gânglio trigeminal expressam receptores μ opióides e que a ativação destes pode contribuir para a analgesia induzida por opióides no complexo trigeminal, através da abertura de canais de potássio voltagem-dependentes (TAKEDA et al., 2004).

Fármacos bloqueadores de canais de cálcio podem potencializar os efeitos antinociceptivos dos opióides, sendo que alguns destes agentes como a lamotrigina, que reduzem a concentração intracelular de cálcio (PISANI et al., 2004), podem induzir analgesia por si só (CHRISTENSEN et al., 2001).

Situação semelhante ocorre com algumas drogas serotoninérgicas, que demonstram potencializar os efeitos antinociceptivos da morfina, mas também podem induzir analgesia independentemente da associação (DESEURE et al., 2004). O uso destes fármacos tem surgido como uma proposta interessante para a

obtenção de analgesia profunda (GALEOTTI et al., 1997; COLPAERT et al., 2002) e as pesquisas envolvendo a utilização destas drogas no tratamento da neuralgia do trigêmeo tem apresentado resultados promissores (DESEURE et al., 2002; KAYSER et al., 2002; DESEURE et al., 2003).

2.6.2 – Recursos não farmacológicos

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento da NT determina efeitos colaterais importantes, tanto na terapia aguda quanto na crônica. Estes efeitos incluem sedação, perda de concentração, sonolência, descoordenação motora, além de complicações cosméticas como hiperplasia gengival e ganho de peso (STEINHOFF et al., 2003), o que traz sérias limitações e dificuldades para o uso destas drogas. O efeito colateral mais comum é a depressão do SNC e ocorre principalmente em indivíduos idosos, sendo necessário cuidadoso ajuste das doses para estes pacientes (MACFARLANE et al., 1997).

Em geral, a opção cirúrgica nos casos de neuralgia idiopática é considerada apenas nas situações refratárias, em que as terapias não invasivas não lograram sucesso. Ela consiste principalmente da descompressão microvascular, mas pode chegar a ser realizada até mesmo a rizotomia (MACFARLANE et al., 1997). A cirurgia apresenta riscos não só inerentes ao procedimento, como também existem relatos de agravamento do quadro original de dor após a execução desta (CHONG & BAJWA, 2003). Por ser este um método mais radical e em função dos riscos envolvidos, sua indicação é bastante criteriosa e a adoção desta terapia fica, em geral, como alternativa final.

Assim, são necessárias formas de tratamentos que visem a melhora clínica dos indivíduos que sofrem de trigeminalgia, mas sem que o próprio tratamento represente uma perda na qualidade de vida.

O avanço no conhecimento dos mecanismos intrínsecos que levam à hipersensibilidade e a sensibilização central têm permitido testar novas modalidades de tratamento, apresentando resultados promissores para o futuro, no que diz respeito ao desenvolvimento de tratamentos eficazes e menos agressivos ao indivíduo que sofre da trigeminalgia.

Fora da abordagem farmacológica clássica, mas ainda seguindo uma linha mais conservadora, tratamentos tais como acupuntura, laserterapia e utilização da estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS) têm sido utilizados com sucesso no tratamento da neuralgia do trigêmeo (MACFARLANE et al., 1997; CHONG & BAJWA, 2003) e também em outras condições de dores neuropáticas, como no controle da enxaqueca (ALLAIS et al., 2003). Pela ausência de efeitos colaterais graves, estas modalidades deveriam ser avaliadas em todo tratamento de dor neuropática, mesmo antes de se indicar a abordagem farmacológica (HARDEN, 1999).

2.7 - Ultrassom terapêutico

No sentido de se buscar tratamentos eficazes com menor impacto negativo, o Ultrassom terapêutico (USt) pode surgir como uma nova abordagem para o tratamento da NT. Este instrumento é amplamente utilizado por fisioterapeutas há décadas, sendo indicado inclusive no tratamento de diversas condições dolorosas (ROBERTSON, 2002).

Tradicionalmente, é postulado que o USt atue através de dois tipos de efeito: os térmicos e os não térmicos (BAKER et al., 2001). Os efeitos térmicos acontecem quando a onda ultrasônica é absorvida pelos tecidos e então transformada em calor. Este efeito é visto principalmente quando se utiliza o aparelho de ultrassom no modo contínuo e em tecidos que tenham em sua composição grande presença de fibras colágenas, como a cortical óssea, fáscia muscular, cápsula e sinovia articular e grandes ramos nervosos (TER HAAR, 1999).

Já os efeitos não térmicos são obtidos com o aparelho de ultrassom configurado no modo pulsado (TER HAAR, 1999) e são produzidos por dois fenômenos, que são a corrente acústica (força física da onda ultrasônica que gera um vetor de força capaz de movimentar íons e pequenas moléculas, inclusive organelas no interior das células) e a cavitação (formação de microbolhas de gás e vapor a partir da passagem da onda ultrasônica em líquidos) (JOHNS, 2002). Acredita-se que estes podem ser os principais responsáveis pelos bioefeitos produzidos pelo USt (BAKER et al., 2001; NYBORG, 2001).

É visto que a cavitação pode causar lesões celulares e teciduais *in vitro*, porém acredita-se que este efeito não seja tão relevante clinicamente (BAKER et al., 2001). De qualquer modo, o uso estacionário do USt deve ser evitado, como alternativa a contornar este possível efeito deletério.

Entre os efeitos biológicos produzidos, existem evidências que apontam para a capacidade do USt em induzir a expressão de algumas citocinas envolvidas na angiogênese (REHER et al., 1999) e de citocinas com ação pró e antiinflamatória, além de outros fatores que participam na reparação tecidual (JOHNS, 2002).

Sugere-se ainda que o USt atue em células do sistema imune e do processo de reparação tecidual, como macrófagos, mastócitos, fibroblastos,

osteoblastos e células endoteliais, possivelmente através da modulação da produção de citocinas e outros fatores, reduzindo a inflamação e facilitando a reparação nos tecidos insonados (BAKER et al., 2001; JOHNS, 2002). Demonstrou-se também que o USt acelera a regeneração axonal em ratos que sofreram neurotomia experimental de nervo ciático, provavelmente agindo por mecanismos não térmicos (CRISCI & FERREIRA, 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado que aplicações periféricas de USt podem induzir analgesia através da inibição ao nível da medula espinhal da NOS indutível e neuronal, em um modelo de artrite experimental em ratos, apontando este recurso como um método potencial para o tratamento de dores neuropáticas (HSIEH, 2005, 2006).

Ainda na década de 1930, iniciou-se o uso do USt no tratamento e alívio da dor ciática e de outras neuropatias (NYBORG, 2001). Atualmente tem sido indicado para diversos usos terapêuticos, incluindo tratamentos envolvendo a região facial, sendo apontado como um recurso altamente efetivo e de baixo custo no tratamento da osteoradionecrose de mandíbula seguida à radioterapia (REHER et al., 1998) e como auxiliar na redução do edema e do trismo pós-cirúrgico seguido à cirurgia oral de exodontia de terceiro molar inferior impactado (ELHAG et al., 1985).

Além disso, apesar de o USt ser indicado principalmente em processos agudos, existem estudos demonstrando que este recurso terapêutico pode ser eficaz no tratamento de distúrbios de dor crônica, como no tratamento da fibromialgia (ALMEIDA et al., 2003) e da síndrome da dor miofascial (MAJLESI & ÜNALAN, 2004).

A despeito disso, pouco se sabe ainda sobre seus mecanismos de ação e sobre seus reais benefícios de utilização, sendo que a literatura científica sobre o assunto é, muitas vezes, escassa e ambígua. Muito se especula, mas existem

poucas evidências definitivas sobre os efeitos biológicos do USt (BAKER et al., 2001, PHILADELPHIA PANEL, 2001).

Por ser este um instrumento de uso tão difundido, pouco oneroso e com resultados satisfatórios na prática clínica, pesquisas complementares são urgentemente necessárias para elucidar seu mecanismo de ação e indicar com maior precisão as bases científicas do seu uso, principalmente em modelos experimentais de neuropatia. A falta de parâmetros de uso, a dificuldade de padronização da técnica de utilização ou mesmo do próprio aparelho, são fatores relacionados que dificultam pesquisas mais apuradas com o objetivo de verificar sua eficácia e seus mecanismos de ação (ROBERTSON, 2002).

3 – OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- A. Avaliar a eficácia do uso do ultrassom terapêutico (USt) em reduzir a intensidade de uma resposta nociceptiva neuropática, em ratos.
- B. Investigar os mecanismos envolvidos na antinocicepção produzida pela aplicação do USt neste modelo experimental.

Para atingir estes objetivos foram realizados experimentos visando a:

1. Padronização, em nosso laboratório, de uma modificação da técnica de avaliação da resposta nociceptiva a um estímulo térmico, no modelo experimental de dor neuropática decorrente da lesão por constricção crônica do nervo infraorbitário (*chronic constriction injury – CCI-ION*), em ratos.
2. Investigação da presença de PMN neutrófilos nas várias fases pós-cirúrgicas, visando verificar a possível participação local destas células no desenvolvimento e/ou manutenção do processo nociceptivo estudado e após as aplicações do USt.
3. Quantificação das modificações da resposta nociceptiva neuropática decorrentes da aplicação local do USt – modo pulsado, em dois padrões diferentes de intensidade da onda ultrasônica.
4. Investigação da participação de mecanismos opioidérgicos endógenos na antinocicepção induzida pelo USt – modo pulsado, através de ferramentas farmacológicas (antagonista opióide).

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais

Utilizaram-se ratos Wistar machos, com peso entre 150 – 220 g, adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - CEBIO/ICB-UFMG. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas padrão, com quatro animais por caixa, em ciclo claro-escuro de 12 horas iniciando às 6:00 h, com temperatura ambiente em torno de 25° C, recebendo água e comida *ad libitum* até uma hora antes dos experimentos. Todos os animais foram tratados de acordo com os preceitos éticos para pesquisa com animais e as diretrizes para investigação de dor experimental em animais, conforme prescrito pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (ZIMMERMANN, 1983). O trabalho foi analisado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG - CETEA/UFMG, sendo aprovado sob o protocolo nº 146/05 (cópia do certificado – anexo I).

4.2 - Drogas

Para a anestesia dos animais, foram utilizadas quetamina 10% (Dopalen[®] injetável - Vetbrands) e xilazina 2% (Anasedan[®] injetável- Vetbrands).

O antagonista opióide naltrexona (ReVia[®] - Cristália) foi preparado em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e administrado nas doses de 2 e 5 mg/Kg. No dia

anterior ao experimento, cada comprimido, contendo 50 mg de Cloridrato de naltrexona, foi finamente triturado e, em seguida, diluído em solução salina estéril às concentrações de 2 e 5 mg/ml.

A morfina sulfatada (Merck), diluída em solução salina estéril à concentração de 5 mg/ml, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, do Laboratório de Analgesia e Dor do Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG.

Como veículo de condução da onda sonora foi utilizado gel inócuo de ultrasonografia, de pH neutro, composto por carbopol, conservante, hidratante, água desmineralizada e corante (Gel In Shape[®] – Indústria Suprimed).

4.3 - Cirurgia

Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral, com solução de quetamina 10% e xilazina 2% (proporção de 4:3), sendo injetado 1 ml/Kg pela via intramuscular (i.m.).

Os animais utilizados para o desenvolvimento da neuropatia receberam a injúria por constricção crônica (CCI) unilateral (lado direito), através de duas amarras frouxas ao redor do nervo infraorbitário (ION).

O acesso ao ION foi feito seguindo a técnica cirúrgica descrita por Gregg (1973) e adaptada por Vos et al. (1994), na qual o nervo é alcançado através da órbita, sem que ocorra nenhuma lesão do globo ocular do animal (fig. 3). Resumidamente, realizava-se uma pequena incisão em forma de meia lua circundando a parte superior da cavidade da órbita direita do animal. A cavidade da

órbita, formada pelos ossos maxilar, frontal, lacrimal e zigomático, era então dissecada. Em seguida, o globo ocular era cuidadosamente defletido para acessar o ION, utilizando-se como espaçadores chumaços de algodão e um afastador cirúrgico especialmente adaptado para este procedimento.

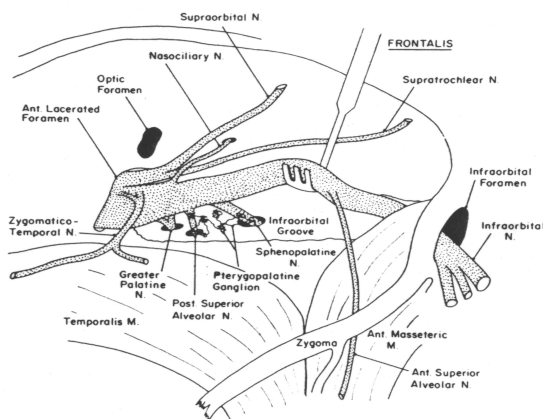


FIGURA 3 - Representação esquemática da anatomia da área cirúrgica do nervo infraorbitário.

Fonte: Gregg, 1973, p. 392.

Uma porção de cerca de 0,5 cm do nervo infraorbitário, estendendo-se mais rostralmente na cavidade da órbita, caudal ao forame infraorbitário, era exposta e livre dos tecidos conectivos adjacentes. Duas amarras frouxas com fio inócuo de nylon flexível, separadas uma da outra por aproximadamente 2 mm, foram feitas ao redor do nervo, o mais próximo possível da região caudal do forame. Um espaçador de nylon com diâmetro de 0,5 mm foi colocado paralelamente ao nervo e retirado por deslizamento após a realização da amarra, assegurando uma folga constante e suficiente para diminuir o diâmetro do nervo e retardar, mas sem ocluir, a passagem do impulso nervoso e da vasculatura superficial, conforme descrito por Bennett e Xie (1988). A incisão no escalpo era então fechada com três pontos de fio de seda 4-0.

Na cirurgia falsa (“sham”), o ION era identificado, liberado dos tecidos conectivos, um pedaço do fio de nylon era passado em volta do nervo e deixado no

local, mas sem que se fizesse a constrictão. Os demais procedimentos seguiam os mesmos passos da cirurgia CCI-ION.

O lado contralateral em ambas as cirurgias foi mantido ileso.

As cirurgias foram realizadas assepticamente e não foram utilizadas drogas antibióticas ou analgésicas no pré ou no pós-operatório, devido à possibilidade destas drogas interferirem no desenvolvimento da hiperalgesia (CHUDLER & ANDERSON, 2002). Não se observou sinais indicativos de infecção pós-operatória em nenhum dos animais.

Os animais “naïve” não receberam nenhum tipo de manipulação cirúrgica.

Atualmente, este modelo experimental tem tido preferência nas pesquisas referentes à neuralgia do trigêmeo, por ser um modelo para dor neuropática facial em que o animal não apresenta sinais evidentes de dor incapacitante. Em modelos que utilizam lesão química, por exemplo, a dor persiste durante todo o transcurso do experimento, limitando movimentos mastigatórios do animal. No modelo de CCI o que se desenvolve é uma resposta exacerbada a um estímulo nociceptivo e não um quadro de dor ininterrupto, de tal forma que não ocorre perda de peso dos animais durante o período experimental.

4.4 - Avaliação da hiperalgesia térmica

Um termoalgesímetro apropriado para avaliações no modelo facial de CCI-ION foi desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia do ICB/UFMG, tomando-se por base o método de avaliação

comportamental em um modelo animal de hiperalgesia utilizando estimulação térmica proposto por Hargreaves et al. (1988) e adaptado por Imamura et al. (1997).

O aparelho consiste de uma resistência elétrica mantida a uma distância segura da pele do animal através de um anteparo rígido, confeccionado em material dotado de baixa condutividade térmica que, além de evitar queimaduras no animal, padroniza a distância entre a fonte de calor e a região onde é feita a avaliação (fig. 4A). Em consequência desta distância padronizada, a temperatura determinada pelo calor irradiante é mantida constante. O aparelho foi repetidamente aferido por períodos de duas horas, sob constante monitoramento, tendo sido observado que a temperatura, na distância definida, manteve-se em 45° C durante todo o tempo.

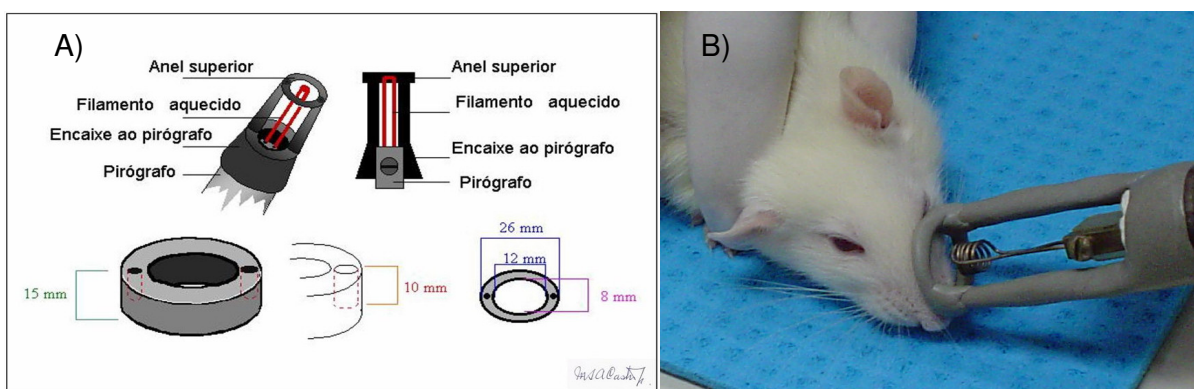


FIGURA 4 - A) Representação esquemática do termoalgesímetro. B) Demonstração da avaliação termoalgesimétrica.

Conforme mostra a fig. 4B, o dispositivo era direcionado ao centro da vibrissal (VOS et al., 1994; IMAMURA et al., 1997; CHUDLER & ANDERSON, 2002) estando o animal levemente contido, de maneira a não impedir totalmente sua movimentação e sem causar estresse desnecessário. Uma vez que o animal era contido, permitia-se um período de adaptação entre 1 e 2 minutos para que não houvesse demasiada agitação que pudesse gerar fatores de dificuldade e confusão na leitura da resposta avaliada. A contenção parcial era mantida somente durante o período de avaliação.

Uma vez que o dispositivo era posicionado, iniciava-se a contagem do tempo de latência para a reação de retirada da cabeça. Foi considerada reação de retirada o recuo lateral (no sentido contrário ao do dispositivo) ou recuo posterior da cabeça. Se não fosse observada nenhuma reação do animal, o tempo de corte para evitar lesões foi padronizado em 18 segundos, equivalente a cerca de 2 vezes a resposta basal média dos animais “sham” – operados.

Para a contagem do tempo utilizou-se um cronômetro digital da marca Thecnos[®], modelo Quartz Sport.

As avaliações preliminares foram realizadas sempre na mesma sala onde os animais eram mantidos após a cirurgia e no mesmo período do dia, entre 12:00 h e 17:00 h, de forma a padronizar e controlar ao máximo possível os fatores ambientais. O teste térmico foi feito em ambos os lados, iniciando sempre pelo lado contralateral ao da cirurgia. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições experimentais, recebendo inclusive “testes falsos”. Neste caso, o aparelho era levado à área de teste sem que estivesse ligado, de forma que era possível observar as reações comportamentais do animal sem que ele estivesse sendo termicamente estimulado. Este artifício dificultava a ocorrência eventual de aprendizado pelos animais, além de corroborar a premissa que a resposta nociceptiva avaliada era proveniente do estímulo térmico e não mecânico.

Observou-se que, imediatamente antes do movimento de retirada da cabeça, indicativo de nocicepção, os animais apresentavam um movimento rápido das vibrissas. Isto também serviu como parâmetro de refinamento da avaliação para diferenciar o que era retirada em função do estímulo nociceptivo e a ocorrência de uma simples reação de fuga que não caracterizaria nocicepção.

4.5 - Aplicação do Ultrassom terapêutico

Foi utilizado nos testes com Ultrassom terapêutico (USt) um aparelho da marca IMEBRÁS, SONOPULSE, ERA 1 cm² (fig. 5). Os parâmetros de uso do USt foram 1 MHz, frequência 100 Hz, pulso 1/5, nas intensidades 0,3 e 0,4 W/cm² por 2 min. As aplicações do USt foram realizadas no modo pulsado, em movimentos circulares no local de aplicação, não permitindo que o aparelho permanecesse parado em um mesmo local, evitando-se assim as lesões teciduais do tipo cavitação. Estes parâmetros foram definidos anteriormente através de um experimento piloto (não mostrado) e por resultados obtidos em nosso grupo (SAVERNINI et al., 2003). Durante a “aplicação falsa” do USt, foi feita apenas a massagem com o cabeçote do aparelho desligado.

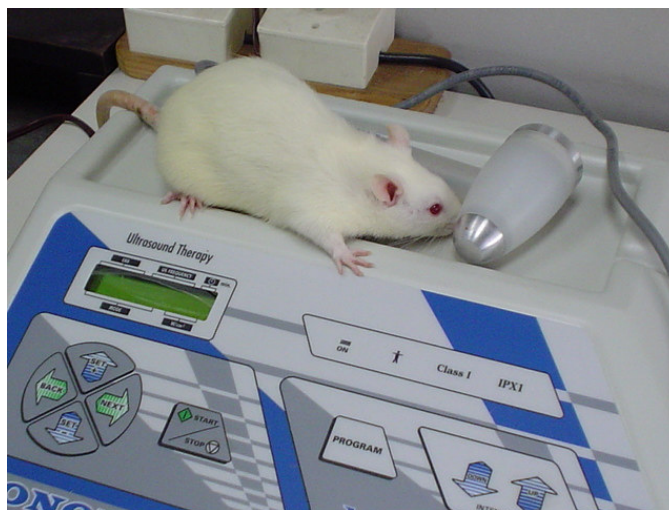


FIGURA 5 - Aparelho de Ultrassom terapêutico.

O aparelho foi aferido a cada 3 meses para garantir a confiabilidade e constância dos parâmetros a serem avaliados e a sua perfeita funcionalidade.

Para a aplicação do ultrassom terapêutico foi utilizado um gel inócuo de ultrasonografia a fim de facilitar a condução da onda ultrasônica.

4.6 - Protocolos Experimentais

4.6.1 – Desenvolvimento da resposta nociceptiva ao estímulo térmico no modelo experimental de dor neuropática decorrente da lesão por constricção crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION), em ratos

Objetivos:

- A) Determinar o padrão temporal de desenvolvimento da hiperalgesia térmica após a indução de neuropatia trigeminal por CCI-ION, em ratos.
- B) Comparar as reações observadas nos lados ipsilateral e contralateral da cirurgia.
- C) Avaliar o tempo necessário para estabilização da resposta hiperalgéica, determinando o melhor tempo para iniciar os experimentos seguintes.

Foram utilizados 44 ratos Wistar nas especificações já mencionadas, divididos em três grupos experimentais: Operados com lesão (Op – CCI; n=16), operados “Sham” (n=16) e “Naïve” (n=12).

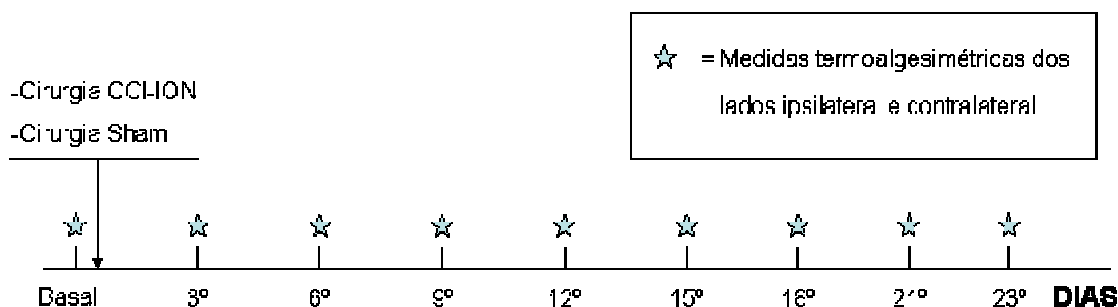


FIGURA 6 - Esquema da avaliação temporal do desenvolvimento de hiperalgesia térmica facial após cirurgia de CCI-ION.

Foram realizadas avaliações do limiar de nocicepção térmica pré-cirurgia, com o intuito de se estabelecer uma medida basal. Avaliações subseqüentes à cirurgia foram feitas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 23 pós-cirúrgicos, a fim de se observar temporalmente o desenvolvimento das alterações decorrentes da lesão por constricção crônica do nervo sobre a sensibilidade térmica facial (fig. 6).

Neste primeiro protocolo, o avaliador do teste termonociceptivo desconhecia a modalidade cirúrgica à qual os animais foram submetidos. Devido ao grande potencial de interferência que os fatores ambientais podem exercer na avaliação deste modelo (DESEURE & ADRIAENSEN, 2004), todos os demais testes foram realizados por um único avaliador, com o intuito de diminuir o número de variáveis, reduzindo a manipulação e o estresse dos animais na sala de experimento.

Os resultados deste protocolo são apresentados, na secção Resultados, na figura 11.

4.6.2 – Efeito da aplicação local do USt – modo pulsado – (ERA 1 cm², 1 MHz, pulso 1:5, freqüência de onda 100 Hz, intensidade da onda ultrasônica de 0,4 W/cm²) sobre a resposta nociceptiva neuropática

Objetivos:

- A) Observar o efeito antinociceptivo de aplicações seriadas do USt pulsado na face de ratos com dor neuropática decorrente da cirurgia de CCI-ION.
- B) Avaliar os efeitos das aplicações do USt pulsado sobre o limiar de nocicepção térmica facial de ratos “sham” e “naïve”.

Utilizaram-se 39 ratos Wistar, distribuídos em 9 grupos de tratamento. Para isso, os grupos “CCI”, “Sham” e “Naïve” foram subdivididos em três outros grupos, sendo estes “Sem Tratamento” (ST), “USt desligado” (USt-) e “USt ligado na intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$ ”. Os grupos “CCI” e “Sham” foram compostos por 05 animais em cada grupo ($n=5$) e os grupos “Naïve” por 03 animais ($n=3$).

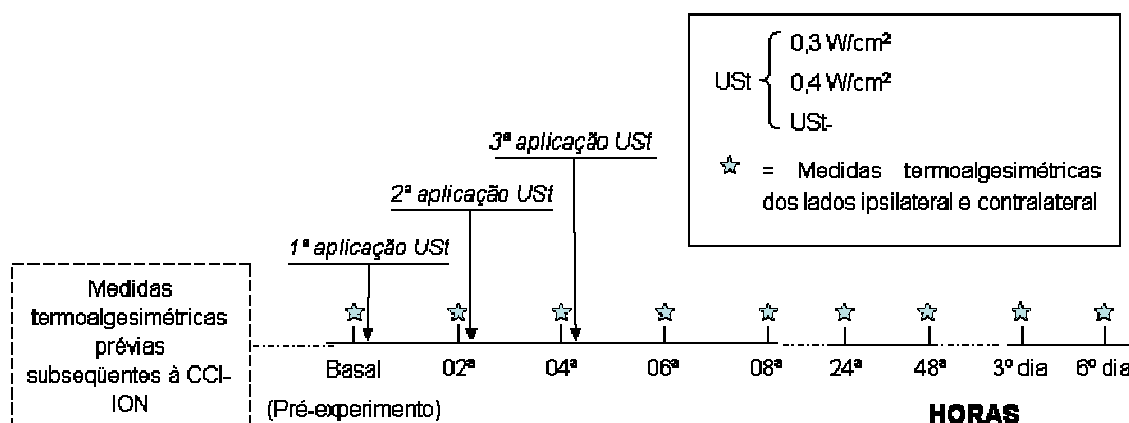


FIGURA 7 - Esquema da avaliação temporal do efeito antinociceptivo decorrente das aplicações seriadas do USt em diferentes intensidades.

Foram realizadas três aplicações de USt, com intervalo de duas horas entre cada aplicação. Os grupos “Sham” e “Naïve” também receberam aplicações do USt na área correspondente à do sítio operado, nos mesmos moldes dos animais “CCI-ION”. A verificação da influência da massagem da região tratada pelo cabeçote do USt foi feita pela realização do procedimento com o aparelho desligado (USt-).

Os animais foram submetidos a avaliações termoalgesimétricas previamente a cada aplicação, sendo ainda reavaliados na 6ª, 8ª, 24ª e 48ª hora após o início dos experimentos. Neste protocolo, os animais ainda foram observados por 6 dias (avaliações no 3º e 6º dia) após a avaliação da 48ª h, até que se observasse um novo patamar de retorno do limiar termonociceptivo à linha de base estabelecida no início do protocolo (fig. 7).

Os resultados deste protocolo seguem expressos nas figuras 12, 14, 15 e 16.

4.6.3 – Efeito da variação da intensidade de onda sobre a resposta antinociceptiva determinada pela aplicação local do USt pulsado no modelo de dor neuropática por CCI-ION, em ratos

Objetivos:

- A) Avaliar o efeito da variação na intensidade de onda ($0,3 \text{ W/cm}^2$) sobre o efeito antinociceptivo decorrente de aplicações seriadas do USt na face de ratos com dor neuropática induzida por CCI-ION.
- B) Avaliar os efeitos desta variação sobre o limiar de nocicepção térmica facial de ratos “sham” e “naïve”.

Utilizaram-se 39 ratos Wistar, distribuídos em 9 grupos de tratamento. Para isso, os grupos “CCI”, “Sham” e “Naïve” foram subdivididos em três outros grupos, sendo estes “Sem Tratamento” (ST), “USt desligado” (USt-) e “USt ligado na intensidade de $0,3 \text{ W/cm}^2$ ”. Os grupos “CCI” e “Sham” foram compostos por 05 animais em cada grupo ($n=5$) e os grupos “Naïve” por 03 animais ($n=3$).

Neste protocolo, os grupos foram compostos nos mesmos moldes do experimento anterior e os procedimentos de aplicação do USt seguiram os mesmos passos já citados (fig. 7).

Os resultados deste experimento foram comparados aos resultados obtidos no protocolo anterior, de maneira a observar as eventuais diferenças decorrentes da variação do parâmetro intensidade sobre a eficácia do efeito antinociceptivo do USt sobre o limiar da resposta neuropática facial em ratos operados CCI-ION.

Estes resultados são apresentados nas figuras 13, 14, 15, e 16.

4.6.4 – Investigação da participação de mecanismos opioidérgicos na antinociceção induzida pelo USt pulsado

Objetivos:

- A) Avaliar a influência do uso de um antagonista opióide (naltrexona) em diferentes momentos da resposta antinociceptiva decorrente das aplicações seriadas do USt em ratos com dor neuropática facial.

Este 4º protocolo foi dividido em duas fases.

Na fase preliminar, 20 ratos Wistar “naïve” foram tratados com naltrexona (5 mg/Kg, s.c.), administrada 30 minutos antes do início dos experimentos, e divididos em 04 grupos (n=5 por grupo), que receberam uma injeção de morfina (5 mg/Kg, s.c.) nos tempos 0, 4ª, 6ª ou 23ª ½ hora (fig. 8). Os animais que receberam morfina na 4ª ou na 6ª hora só foram avaliados após 30 minutos das injeções. Um grupo (n=5) foi pré-tratado com salina (1ml/Kg, s.c.) e recebeu, após trinta minutos, uma dose única de morfina (5 mg/Kg, s.c.).

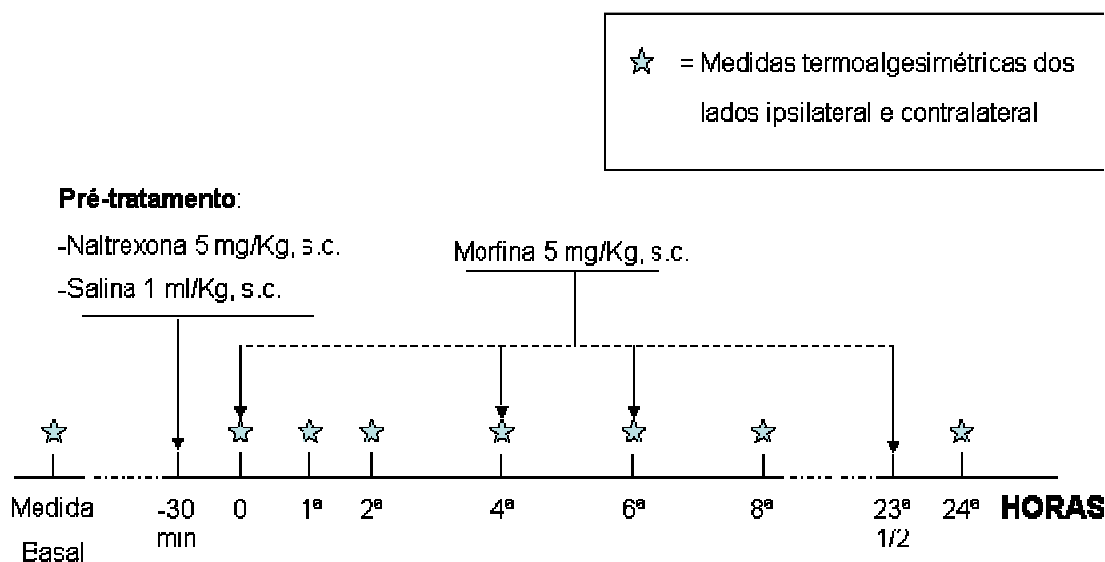


FIGURA 8 – Esquema da avaliação da sensibilidade do termoalgesímetro na detecção de variações nociceptivas advindas da aplicação de um analgésico opióide e determinação do tempo de duração do efeito do antagonista naltrexona na dose estabelecida (5 mg/Kg, s.c.).

Este protocolo teve por objetivos demonstrar a sensibilidade do termoalgesímetro em detectar alterações no limiar de nociceção dos animais a um analgésico opióide, além de estabelecer o tempo de duração do bloqueio pela naltrexona, na dose estabelecida, visando determinar os tempos de aplicação da naltrexona na segunda fase deste protocolo. Os resultados deste experimento são apresentados na figura 17.

A segunda fase deste protocolo teve por objetivo investigar a participação de mecanismos opioidérgicos no efeito antinociceptivo induzido pelas aplicações do USt pulsado, através do uso de um antagonista opioidérgico (fig. 9).

Para isso, utilizou-se 26 ratos Wistar, divididos em 05 grupos de tratamento: “Salina pré + USt + salina 23,5h” (n=5), “Naltrexona 2 mg/Kg pré + USt + salina 23,5h” (n=5) e “Salina pré + USt + naltrexona 2 mg/Kg 23,5h” (n=5), “Naltrexona 5 mg/Kg pré + USt + salina 23,5h” (n=6) e “Salina pré + USt + naltrexona 5 mg/Kg 23,5h” (n=5).

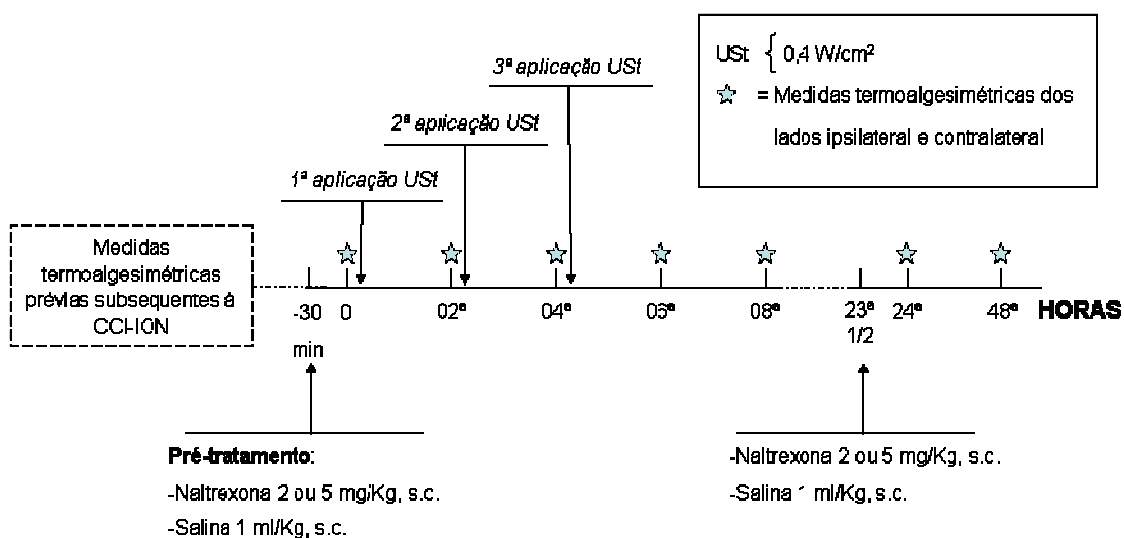


FIGURA 9 - Esquema da investigação da participação das vias opioidérgicas no efeito antinociceptivo do USt através da utilização de um antagonista opióide (naltrexona – 2 ou 5 mg/Kg, s.c.).

Neste experimento, assim como nos seguintes, utilizou-se o USt na intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$, que demonstrou ser a mais efetiva no protocolo anterior.

Os resultados deste experimento estão expressos na figura 18.

4.6.5 – Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos no tecido nervoso (nervo infraorbitário) de animais submetidos à CCI-ION

Objetivos:

- A) Investigar a presença de PMN neutrófilos em diferentes fases pós-cirúrgicas, visando observar a possível participação local destas células no desenvolvimento e/ou manutenção processo nociceptivo investigado e após a as aplicações do USt.

Foram utilizados 51 ratos Wistar, divididos em 10 grupos experimentais: 01 grupo “Naïve” (n=5), 01 grupo “Sham” (n=6) e 08 grupos Operados (n=5, por grupo).

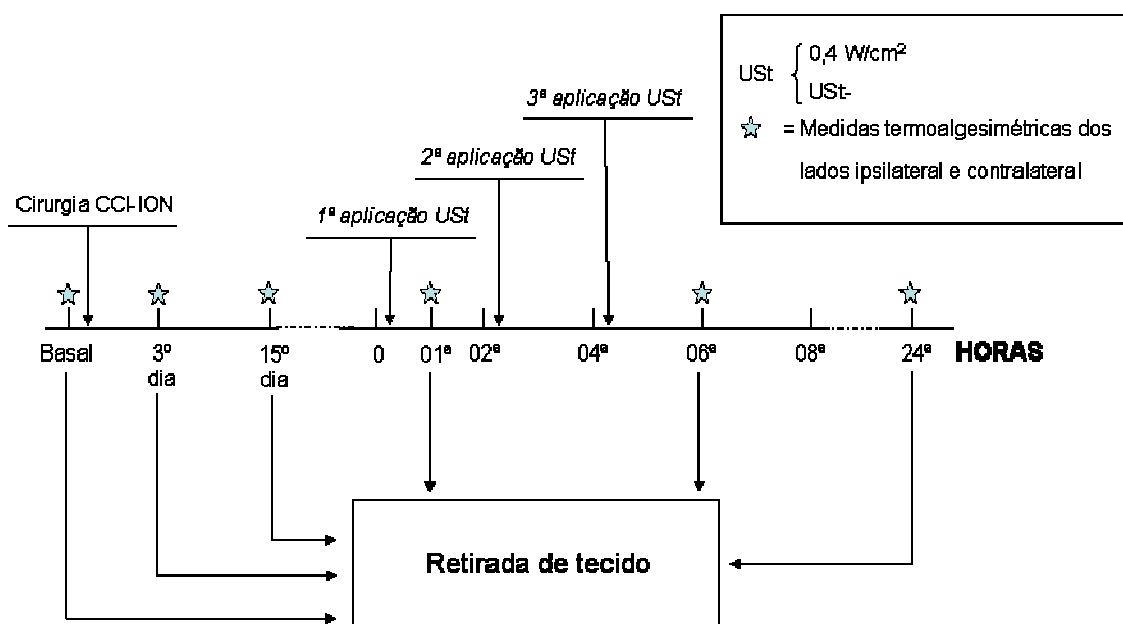


FIGURA 10 - Esquema da avaliação da presença de PMN neutrófilos em decorrência da cirurgia CCI-ION e em função do uso do USt, realizadas em diferentes tempos.

Em dois grupos operados, o nervo infraorbitário lesado foi retirado no 3º e 15º dia pós-operatório. O nervo infraorbitário dos animais do grupo “Naïve” foi retirado seguindo o lado correspondente ao do nervo lesado nos animais operados. As amostras do nervo infraorbitário do grupo “Sham” foram retiradas no 3º dia pós-operatório. Três grupos foram submetidos à aplicação do USt conforme descrito anteriormente (item 4.6.3), e os nervos infraorbitário foram retirados na 1ª, 6ª e 24ª hora. Três outros grupos receberam a aplicação falsa de USt (USt-) e os tecidos foram retirados nos mesmos tempos citados (fig. 10).

Testes termoalgesimétricos foram realizados antes de cada retirada de tecidos apenas para monitorar as modificações do limiar termonociceptivo em resposta à cirurgia CCI e ao tratamento com o USt (fig. 10).

Para determinar o acúmulo de neutrófilos no nervo infraorbitário, foi utilizado o método de avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) (IVEY et al., 1995; DE MATOS et al., 1999). Este teste foi gentilmente realizado pelo mestrando Flávio Almeida Amaral no laboratório do Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG).

Descrevendo-se brevemente, fragmentos de nervo foram pesados e picados, suspensos a 5% em salina EDTA, submetido à homogeneização e centrifugação (3000 g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o componente residual (pellet) ressuspensionado em 1,5 ml de NaCl 0.2% gelado e 1,5 ml de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação 3000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em tampão fosfato com HTAB a 5% e re-homogenizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação e os sobrenadantes

coletados para ensaio de MPO. As amostras de nervo foram diluídas antes do ensaio. Atividade de MPO das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzine (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos por comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de ratos processados da mesma maneira

Os resultados destes grupos são apresentados nas figuras 19 e 20.

4.7 - Análise Estatística

Determinou-se através da análise de variância (ANOVA), em um experimento piloto com 11 animais “naïve” durante 05 dias, a média (\bar{x}), desvio padrão da resposta (s) e intervalo de confiança (IC), expressos abaixo.

$$\bar{x} = 10,76$$

$$s = 1,06$$

$$IC = 10,76 \pm 0,63$$

De posse destes dados, o tamanho das amostras foram calculadas em $n = 4,87 \sim 5$ animais por grupo, através da aplicação do cálculo do intervalo de confiança ($IC = \bar{x} \pm t.s/\sqrt{n}$), considerando-se um desvio em torno da média de $5\% < \Delta < 10\%$ ($\Delta = t.s/\sqrt{n}$) e o valor médio de $t = 2$.

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada com o programa GraphPad Prism, versão 3.00, utilizando-se o teste ANOVA Two Way para múltiplas variáveis e ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni para comparação entre os grupos experimentais e o controle, considerando-se nível de significância para $p < 0,05$.

Os resultados foram expressos pela média \pm E.P.M.

5 – RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 - Efeito induzido pela lesão por constrictão crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) sobre o limiar termonociceptivo facial dos ratos

Os resultados de padronização do método de avaliação de hiperalgesia térmica no modelo de dor neuropática facial semelhante à neuralgia do trigêmeo estão apresentados na figura 11.

Estes resultados indicam que o teste adaptado de nocicepção térmica avaliada através do termoalgesímetro é capaz de detectar as alterações sensoriais induzidas pela CCI-ION, quantificando tanto a redução quanto o aumento do limiar nociceptivo térmico.

Imediatamente após a cirurgia de CCI-ION, seguiu-se um curto período de hipoalgesia na região ipsilateral inervada pelo nervo lesado. Já no 3º dia, observou-se uma gradual inversão da curva da sensibilidade, quando a hipoalgesia inicial se reduz paulatinamente e observa-se o desenvolvimento de hiperalgesia, demonstrada pela diminuição no tempo que o animal tolera o estímulo térmico na área afetada.

O patamar da resposta hiperalgésica começou a estabilizar logo após o 9º dia pós-cirúrgico e se manteve estável até, pelo menos, o 24º dia de avaliação (fig. 11).

O lado contralateral ao nervo lesado não apresentou variação estatisticamente significativa do limiar termonociceptivo em comparação com o mesmo lado do grupo “Sham”. Houve uma discreta redução do tempo de reação

neste lado em comparação com valor basal (pré-cirurgia) do grupo, não alcançando, porém, a mesma magnitude observada no lado ipsilateral (fig. 11).

Os animais operados “sham” não apresentaram alterações estatisticamente significativas do limiar de nocicepção térmica em ambos os lados, semelhantemente aos animais “naïve” (fig. 11).

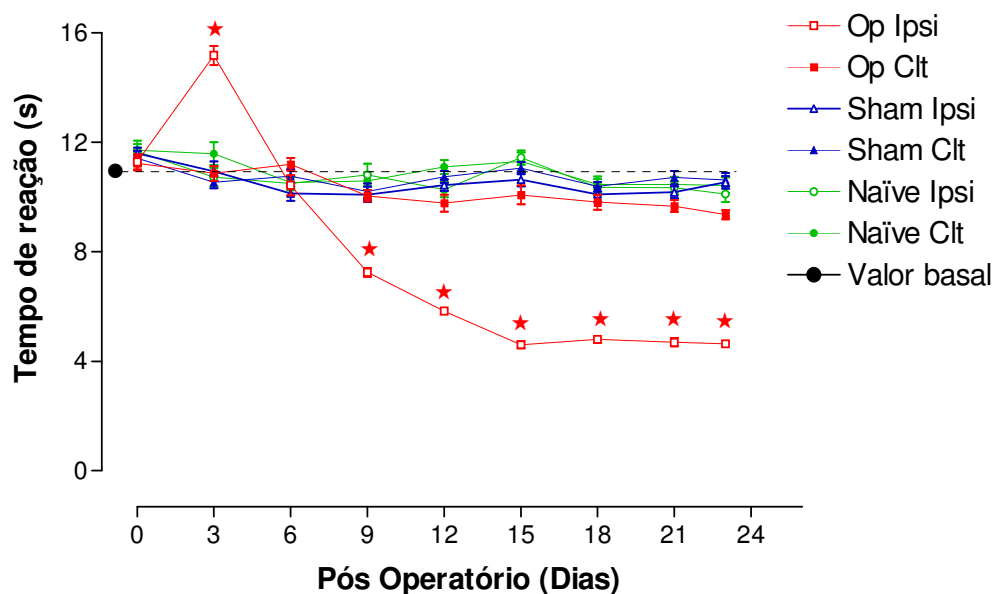


FIGURA 11 - Desenvolvimento temporal da resposta neuropática de hiperalgesia térmica após cirurgia de CCI-ION. Grupos Operados – (Op, n=16), “Sham” (n=16) e “Naïve” (n=12). As avaliações termoalgesimétricas foram realizadas nos lados ipsilateral (Ipsi) e contralateral (Clt) à cirurgia. Para efeito prático, foi assim considerado o lado correspondente no grupo “Naïve”. Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M. (ANOVA Two Way, $p < 0,0001$; ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, $\star = p < 0,01$ em comparação ao grupo “Sham” Ipsi)

Testes falsos foram realizados em todos os grupos simultaneamente às avaliações térmicas, durante os 15 dias iniciais. Durante todo o período avaliado, nos três grupos, os animais não apresentaram reação de retirada quando as avaliações foram realizadas com o termoalgesímetro desligado, permanecendo assim até o tempo de corte convencional -18 segundos- (dado não mostrado).

Os experimentos seguintes foram iniciados sempre no 16º dia após a CCI-ION, quando o limiar de nocicepção térmica já está estabilizado e permanece

em um mesmo patamar durante todo o período de avaliação no qual foram desenvolvidos os demais protocolos experimentais.

5.2 - Efeito do Ultrassom terapêutico (USt) sobre o limiar termonociceptivo facial de ratos operados “CCI-ION”, “sham”, e “naïve”

Os testes utilizando o USt demonstraram que, após três aplicações locais, administradas em intervalos de 2 horas entre cada, há uma redução significativa da hiperalgesia térmica ipsilateral à cirurgia nos animais do grupo “CCI-ION”, sendo este efeito observado nas duas intensidades testadas, $0,4 \text{ W/cm}^2$ e $0,3 \text{ W/cm}^2$ (fig. 12 e fig. 13, respectivamente).

Este efeito antinociceptivo inicia-se após a primeira aplicação, observando-se redução da hiperalgesia térmica já na 2ª hora de avaliação (na intensidade de $0,4 \text{ W/cm}^2$), atingindo o efeito máximo em 24 h, em ambas as intensidades. Em 48 h, os valores termoalgesimétricos retornaram aos números iniciais (pré-experimento) e se mantiveram estáveis por mais 06 dias.

Para testar um eventual efeito da massagem realizada pelo cabeçote do aparelho e do gel de ultrasonografia, o mesmo procedimento adotado com o aparelho ligado foi repetido, mantendo-se, porém, o aparelho desligado (USt-). Este procedimento mostrou que a simples massagem com o gel não modifica o limiar termonociceptivo dos animais com neuropatia (fig. 12 e 13).

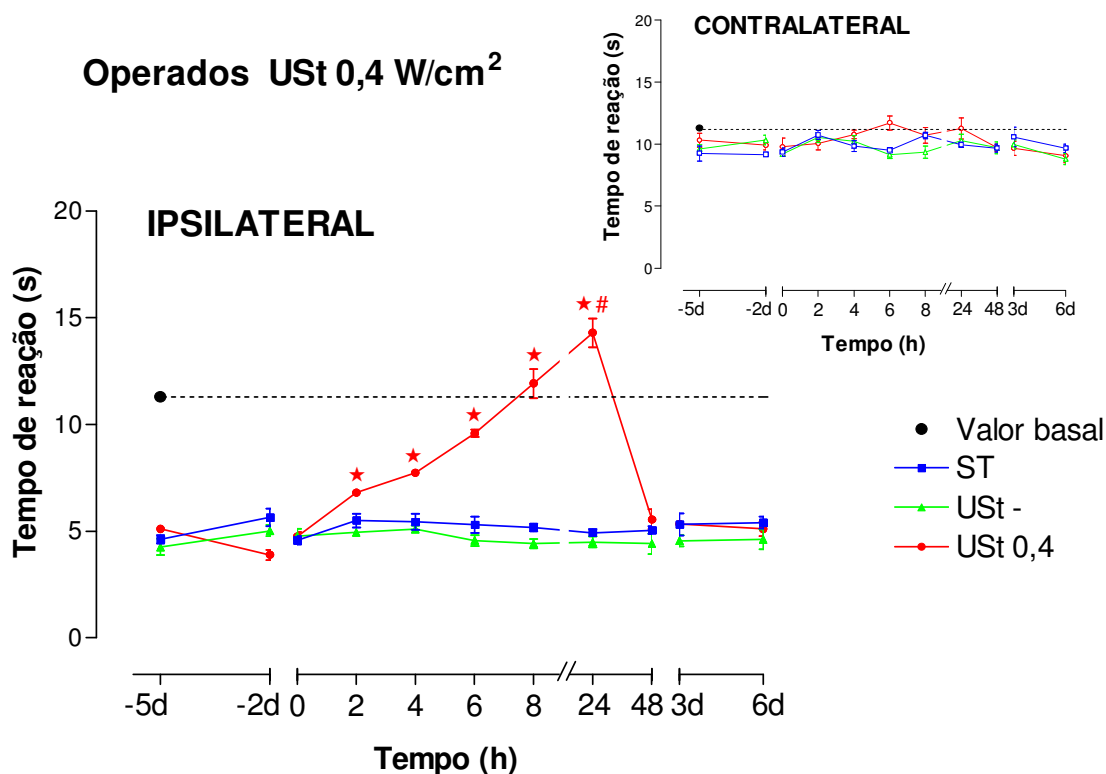


FIGURA 12 - Efeito antinociceptivo decorrente de 03 aplicações seriadas de USt na intensidade de onda de 0,4 W/cm² em ratos submetidos à cirurgia de CCI-ION. Foram feitas 03 aplicações do USt, realizadas imediatamente após as medidas da 0h, 2^a h e 4^a h. Nota-se que na 24^a h o limiar termonociceptivo está acima do valor basal do grupo (pré-cirúrgico) (# = $p < 0,001$, comparado ao valor basal). Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M., $n=5$ (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, $\star = p < 0,001$, comparado ao grupo ultrassom desligado (USt-); na 2^a hora, $\star = p < 0,05$). O dia -5 corresponde ao 11^o dia pós CCI-ION.

INSERTO: Resultados do lado contralateral. Não houve diferença estatisticamente significativa, comparando-se ao grupo USt-.

O USt- não apresentou diferenças estatisticamente significativas, em ambos os lados, comparando-se ao grupo sem tratamento (ST).

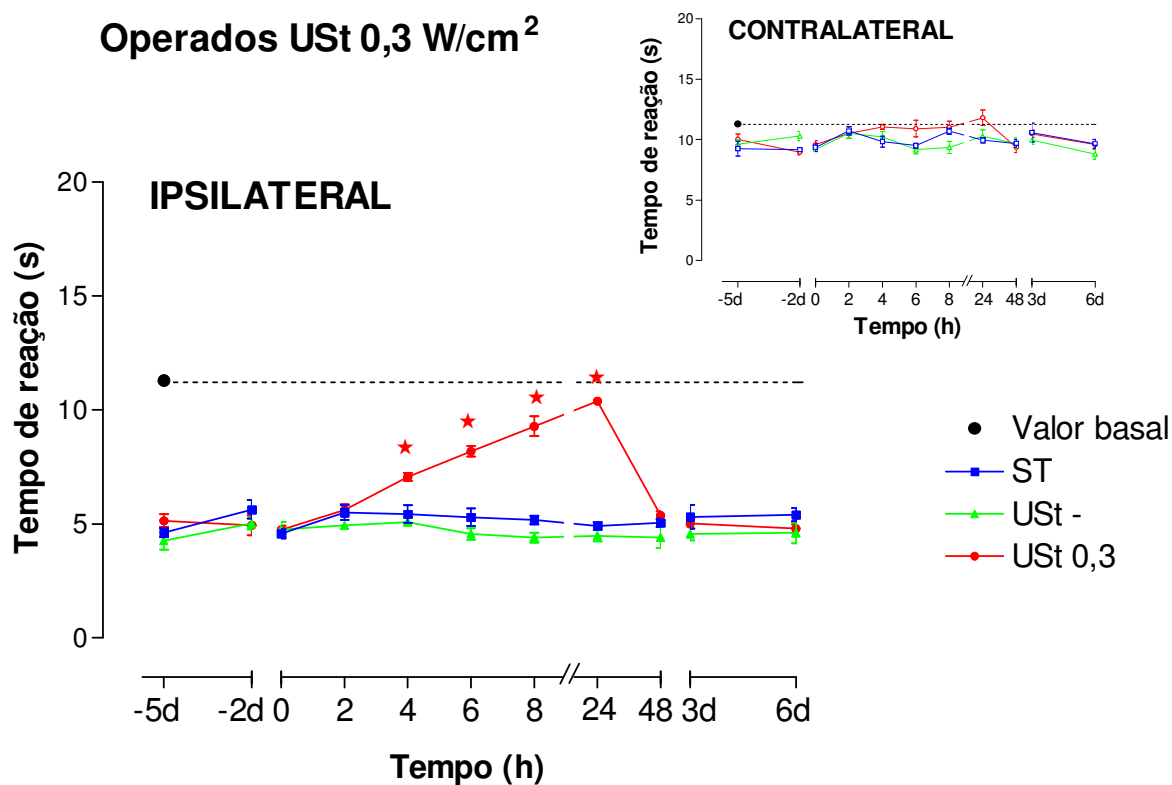


FIGURA 13 - Influência da aplicação local do USt, na intensidade de onda de 0,3 W/cm², sobre o limiar termonociceptivo facial de ratos submetidos a cirurgia de CCI-ION. Foram feitas 03 aplicações do USt, realizadas imediatamente após as medidas da 0h, 2^a h e 4^a h. Os resultados estão expressos pela média ± E.P.M., n=5 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, ★ = p < 0,001, comparado ao grupo ultrassom desligado – USt-). Na 24^a, não houve diferença estatisticamente significativa entre o valor do USt 0,3 e o valor basal (p > 0,05). O dia -5 corresponde ao 11^o dia pós CCI-ION.

INSERTO: Resultados do lado contralateral. Não houve diferença estatisticamente significativa, comparando-se ao grupo USt-.

O USt- não apresentou diferenças estatisticamente significativas, em ambos os lados, comparando-se ao grupo sem tratamento (ST).

O lado contralateral dos animais “CCI-ION” tratados ipsilateralmente com USt em ambas as intensidades não demonstrou modificação significativa no limiar termonociceptivo, tanto quando comparados ao lado correspondente do grupo USt desligado (USt-) como também em relação ao valor inicial (0h) de cada grupo (fig. 14).

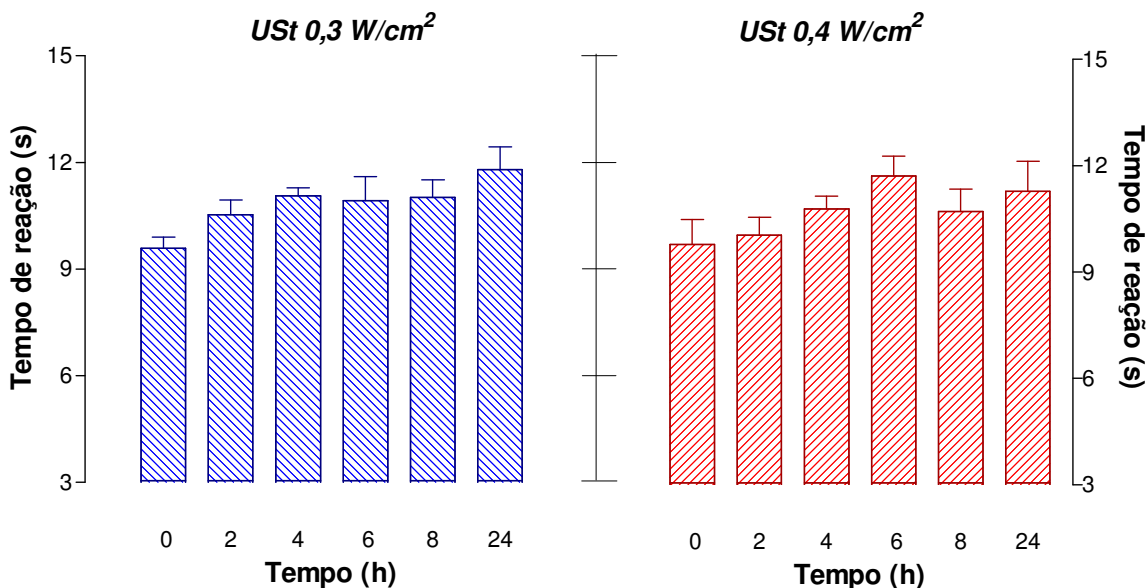


FIGURA 14 - Ausência de efeito do USt, nas duas diferentes intensidades (0,3 W/cm² e 0,4 W/cm²) sobre o limiar termonociceptivo facial do lado contralateral ao nervo lesado de ratos submetidos à CCI-ION. Não se observou diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo 0, assim como quando comparado ao grupo ultrassom desligado (USt-). Os resultados estão expressos pela média ± E.P.M., n = 5.

Nas duas intensidades testadas, o USt não modificou estatisticamente o limiar de sensibilidade à estimulação térmica no lado ipsilateral dos animais do grupo “Sham” e “Naïve” (fig. 15), o mesmo se observando do lado contralateral de ambos os grupos.

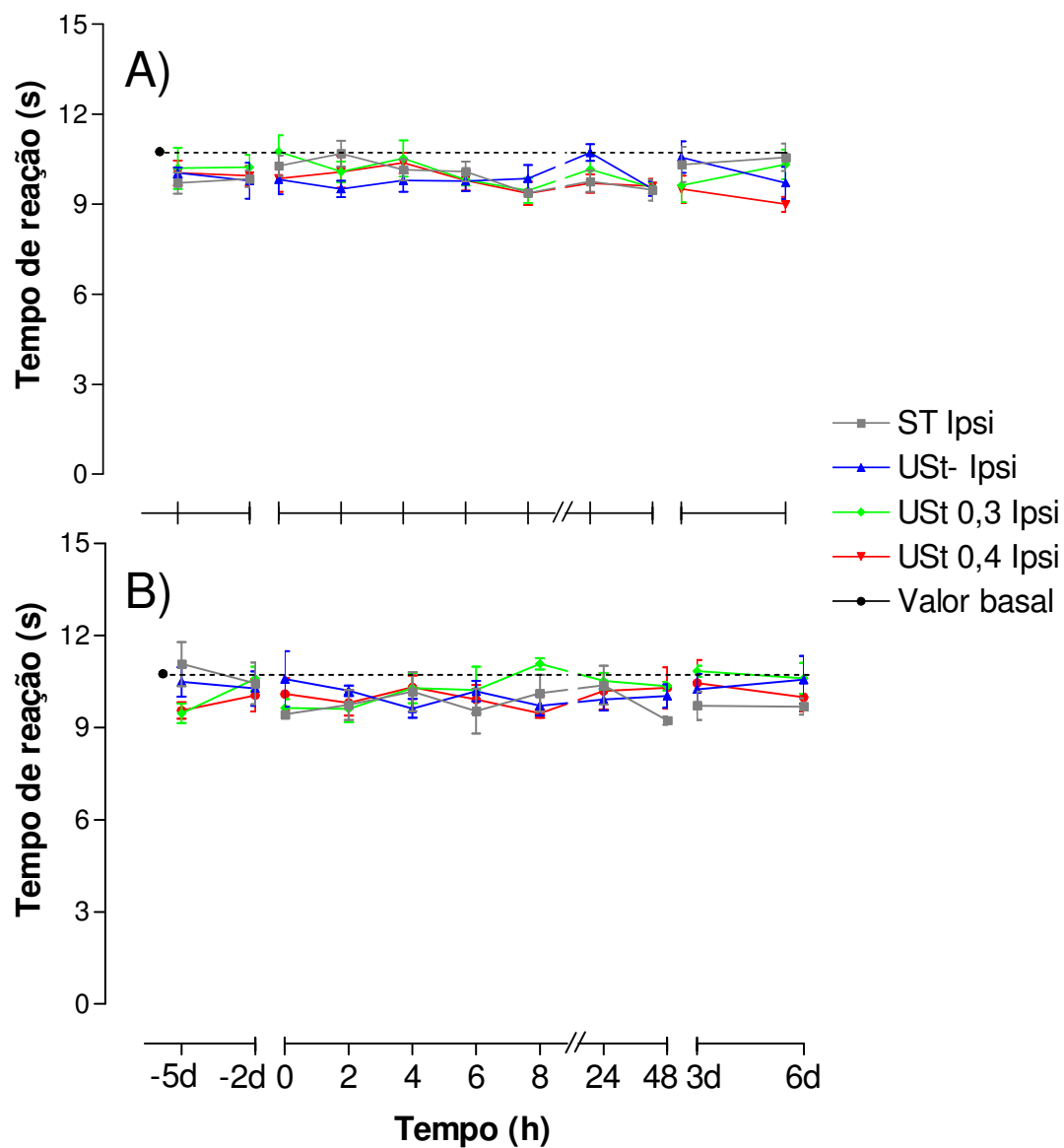


FIGURA 15 - Ausência de efeito do USt, nas duas diferentes intensidades (0,3 W/cm² e 0,4 W/cm²) sobre o limiar termnocéptico facial de ratos submetidos à cirurgia “sham” e em ratos “naïve”.

A) Grupo “Sham”. B) Grupo “Naïve”. Não se observou diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais tratados com o USt em ambas as intensidades e os respectivos grupos USt desligado (USt-). Para facilitar a visualização, foi mostrado apenas o lado ipsilateral de cada grupo. O lado contralateral também não apresentou diferenças significativas nos dois grupos mostrados. Os resultados estão expressos pela média \pm E.P.M., “Sham” n = 5, “Naïve” n = 3.

O USt- não apresentou diferenças estatisticamente significativas, em ambos os lados, comparando-se aos grupos sem tratamento (ST).

Quando a magnitude da antinociceção induzida pelo USt foi comparada em função da variação da intensidade da onda aplicada, observou-se que este efeito é tanto maior quanto o é a intensidade (fig. 16). Verificou-se não somente que o efeito é visto mais precocemente na maior intensidade, como também atinge valores de antinociceção mais pronunciados nos picos do efeito. Assim, na 8ª e na 24ª h, viu-se que o USt é significativamente mais efetivo na intensidade de 0,4 W/cm² quando comparado à intensidade 0,3 W/cm². Ainda, observou-se que na 24ª h do USt 0,4 W/cm², o aumento do limiar termonociceptivo alcança valores acima mesmo do basal do grupo (pré-cirúrgico), sugerindo ocorrência de um efeito hiponociceptivo. Enquanto isso, o grupo tratado com USt 0,3 W/cm², neste mesmo tempo, somente iguala-se estatisticamente ao valor basal, o que já ocorre na 8ª hora do grupo tratado na intensidade de 0,4 W/cm².

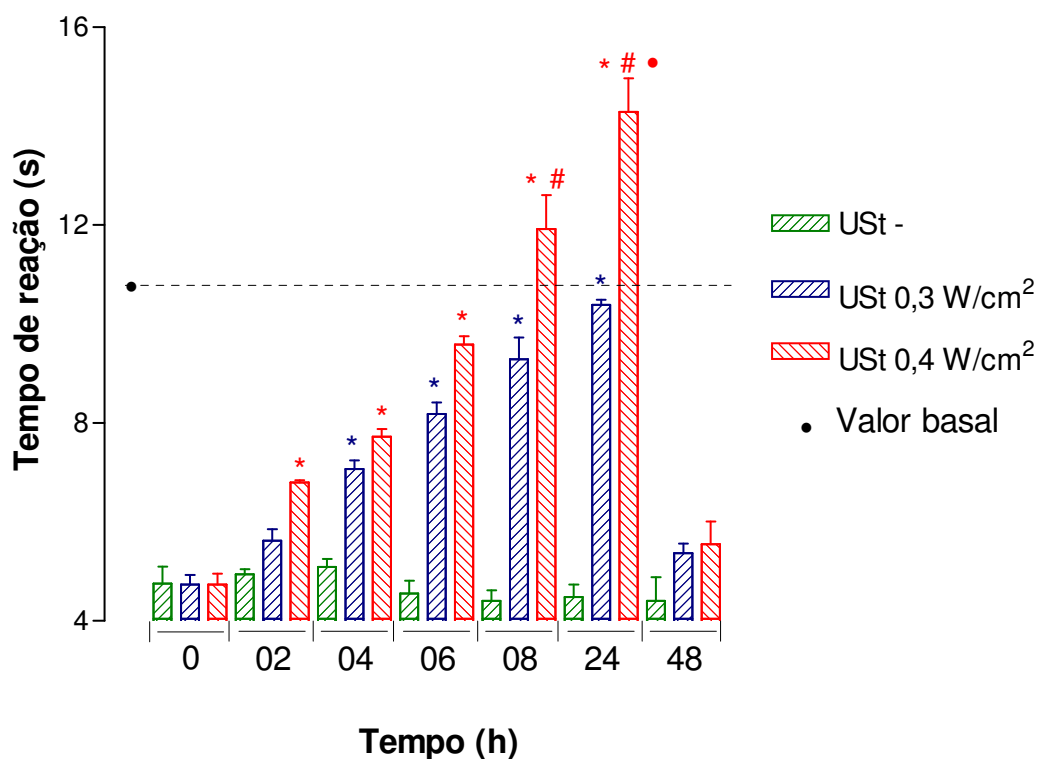


FIGURA 16 - Influência da intensidade de onda (0,3 W/cm² e 0,4 W/cm²) sobre o efeito antinociceptivo do USt. Os resultados estão expressos em média ± E.P.M., n = 5 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, ★ = p < 0,001, comparando-se USt ligado com USt desligado; # = p < 0,001, comparando-se as intensidades 0,3 W/cm² x 0,4 W/cm². Na 24ª h do USt 0,4 W/cm², • = p < 0,001 em comparação com o valor basal).

5.3 - Ação da naltrexona sobre o efeito antinociceptivo do USt

No experimento de caracterização de sensibilidade do modelo do termoalgesímetro a um analgésico opióide, observou-se que a aplicação de uma dose de morfina (5 mg/Kg, s.c.) foi capaz de induzir forte efeito hipoalgésico na 1ª e 2ª hora após a aplicação, já não sendo percebido na 4ª hora (fig. 17, inserto). Este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com naltrexona (5 mg/Kg, s.c.), que foi eficaz em antagonizar a morfina durante até 08 horas, não exercendo mais ação quando a morfina foi administrada na 23ª ½ hora após o antagonista (fig. 17).

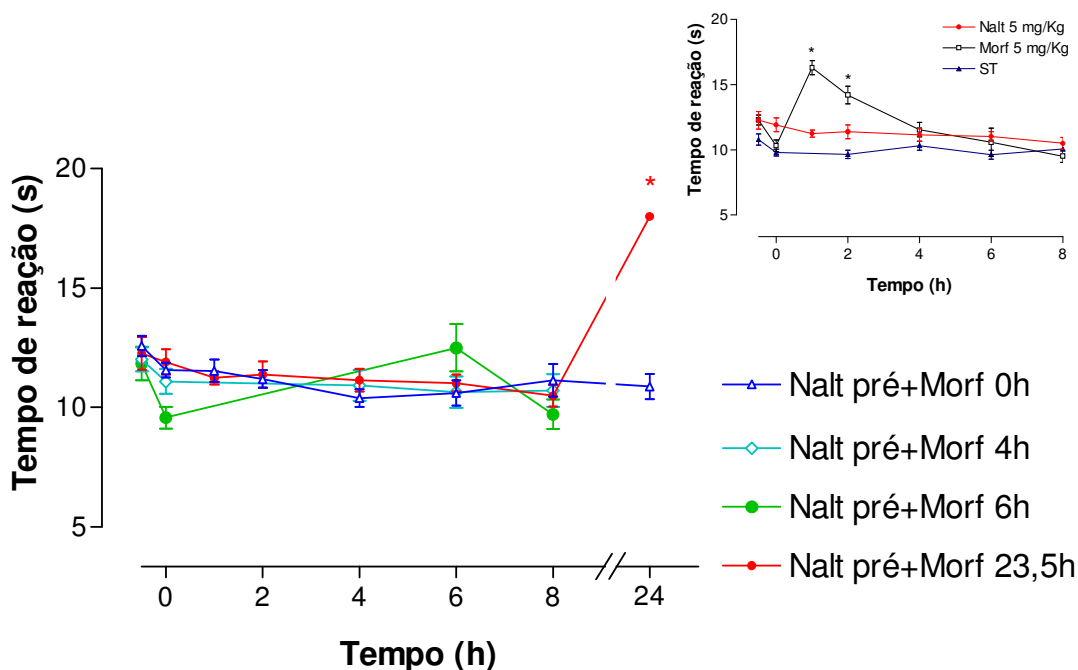


FIGURA 17 - Determinação do tempo de bloqueio do efeito da morfina (Morf) pelo antagonista naltrexona (Nalt - 5 mg/Kg, s.c.). Resultados estão expressos em média \pm E.P.M., n = 5 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, $\star = p < 0,001$, comparado ao valor basal).
INSERTO: Avaliação do efeito antinociceptivo de um analgésico opióide (Morfina, 5mg/Kg, s.c.) sobre o limiar termnociceptivo facial avaliado pelo termoalgesímetro. Resultados estão expressos em média \pm E.P.M., n = 5 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, $\star = p < 0,001$, comparado ao grupo sem tratamento - ST).

Com o intuito de se observar a influência das vias opioidérgicas no efeito antinociceptivo inicial do USt, animais “CCI-ION” foram pré-tratados com naltrexona

(2 ou 5 mg/Kg, s.c.) ou salina (1 ml/Kg, s.c.), 30 minutos antes do início dos experimentos, recebendo em seguida as 03 aplicações do USt. Verificou-se que, considerando as primeiras 08 horas seguidas às aplicações, foi visto em todos os grupos o efeito antinociceptivo inicial observado nos experimentos anteriores, sendo que os animais pré-tratamento com naltrexona, em ambas as doses, não tiveram modificação estatisticamente significativa no efeito induzido pelo USt nesta fase, em comparação com os grupos pré-tratados com solução salina (fig. 18).

Porém, os animais tratados com naltrexona na 23^a ½ h após o início do experimento, também nas duas doses testadas, demonstraram redução, ou mesmo desaparecimento, do efeito antinociceptivo-hipoalgésico do USt na 24^a h já observado nos ensaios anteriores e visto também nos animais tratados apenas com solução salina (fig. 18).

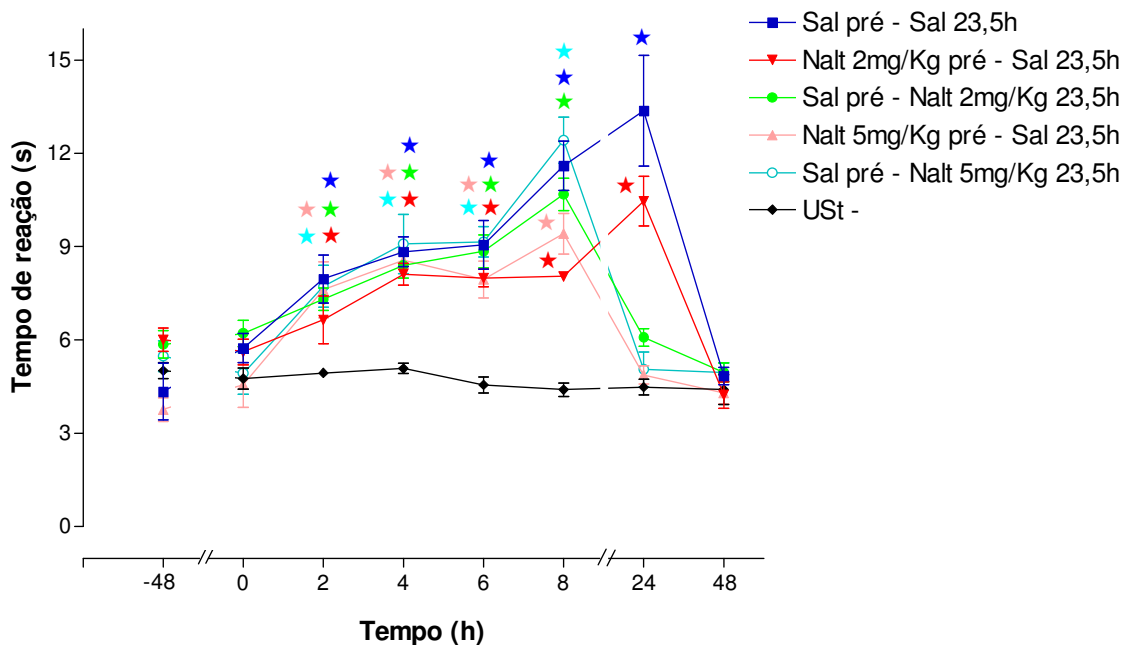


FIGURA 18 - Avaliação do efeito da naltrexona (Nalt) sobre a antinociceção induzida pelo USt. Resultados estão expressos em média \pm E.P.M., n = 5 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, ★ = p < 0,001, comparado ao grupo USt desligado - USt-).

Observou-se ainda que o pré-tratamento com naltrexona, apesar de não modificar significativamente a antinocicepção inicial (2^a a 8^a hora), interferiu no desenvolvimento da hiponocicepção induzida pelas três aplicações do USt na 24^a hora. Os animais pré-tratados com naltrexona na dose de 2 mg/Kg tiveram redução do efeito antinociceptivo induzido pelas aplicações do USt, não desenvolvendo a hiponocicepção vista nesta fase nos experimentos anteriores. De modo semelhante, a naltrexona utilizada na dose de 5 mg/Kg provocou o desaparecimento do efeito antinociceptivo/hiponociceptivo induzido pelo USt na 24^a hora (fig. 18), a despeito de aparentemente não haver mais um efeito direto de bloqueio pela naltrexona como demonstrado no experimento anterior (fig. 17).

5.4 - Avaliação da presença de neutrófilos após a cirurgia de CCI-ION e aplicações do USt

A determinação da presença de neutrófilos no local do nervo operado foi avaliada através da técnica de detecção enzimática de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogeneizado de tecidos, através da qual determina-se indiretamente a presença destas células. Assim, verificou-se que após três dias de cirurgia CCI-ION, há diferença significativa do MPO em relação aos valores basais de homogeneizado do ION, indicando infiltrado de neutrófilos no nervo operado. Observou-se que estes valores reduzem no decorrer do período de avaliação, retornado aos níveis basais no 15^o e 17^o dias (fig. 19).

As amostras do ION do grupo “Sham”, retiradas após três dias do procedimento cirúrgico, apresentaram variação do MPO semelhante aos valores

vistos no grupo “CCI-ION”, indicando também a presença de PMN neutrófilos no nervo manipulado, mas que não sofreu a constrição crônica (fig. 19).

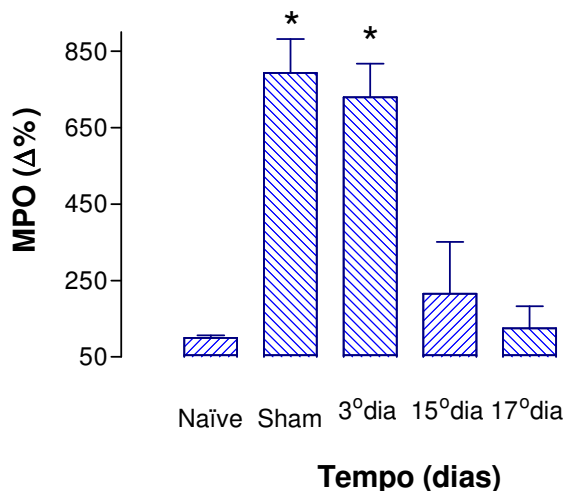


FIGURA 19 - Avaliação da presença de mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) em tecido homogeneizado do nervo infraorbitário ipsilateral de ratos submetidos à cirurgia CCI-ION. Resultados estão expressos em porcentagem, tomando-se como 100% o valor da média do grupo “Naïve” (média \pm E.P.M.). “Naïve” e 3º dia, n = 5; 15º e 17º dia, n = 4; “Sham”, n=6 (ANOVA One Way com pós teste de Bonferroni, $\star = p < 0,001$, comparado ao grupo “Naïve”).

As aplicações de USt, simples ou seriada, não alteraram estatisticamente os valores da MPO em comparação aos valores dos grupos “USt desligado” (fig. 20).

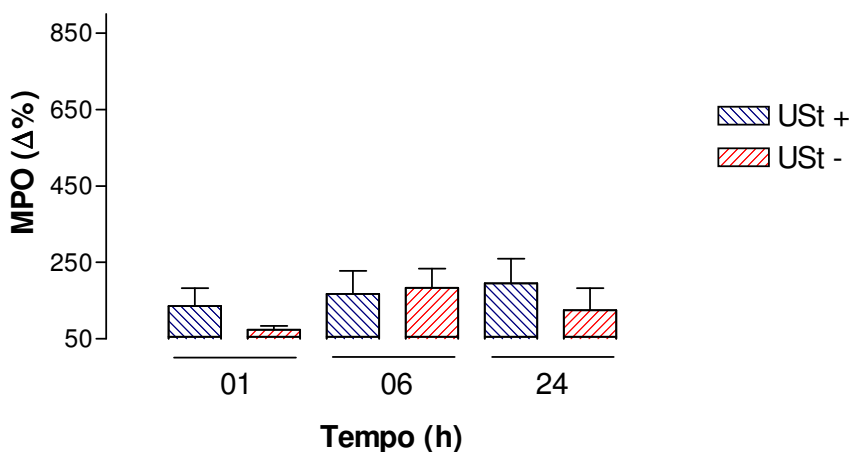


FIGURA 20 - Avaliação da presença de mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) em tecido homogeneizado do nervo infraorbitário ipsilateral de ratos submetidos à cirurgia CCI-ION após as aplicações do USt. Resultados estão expressos em porcentagem, tomando-se como 100% o valor da média do grupo “Naïve” (média \pm E.P.M.). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com o USt (USt+) em comparação com o USt desligado (USt-); n=5. O grupo USt- não apresentou valores estatisticamente diferentes aos do grupo “Naïve”.

6 – DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que o teste comportamental adaptado de nocicepção térmica, o termoalgesímetro, foi eficaz em detectar as alterações sensoriais observadas após a CCI-ION, apresentando-se como uma técnica útil, acessível e aplicável aos moldes do modelo original descrito por Hargreaves et al. (1988) e modificado por Imamura et al. (1997). Este teste também foi capaz de detectar o efeito hiponociceptivo de uma dose de 5 mg/Kg de morfina (s.c.) e a sua reversão pelo pré tratamento com naltrexona (5 mg/Kg, s.c.) (fig. 17).

Através das medidas termoalgesimétricas pode-se observar o desenvolvimento e estabilização do quadro de dor neuropática em decorrência da lesão por constrictão crônica do nervo infraorbitário de ratos (CCI-ION). No primeiro momento, percebeu-se redução da sensibilidade termnociceptiva, sugerindo hipoalgesia, vista pelo aumento do tempo de latência ao termoalgesímetro. Esta fase tem curta duração (3 dias após a CCI-ION), ao que, a partir das avaliações realizadas no 9º dia pós-cirurgia, observa-se a redução drástica do tempo de latência à estimulação termnociceptiva no lado ipsilateral, quando se desenvolve o quadro de dor em si, mantendo-se em um patamar estável de hiperalgesia por todo o período de avaliação (fig. 11). Estes resultados estão em acordo com a literatura, no que diz respeito ao desenvolvimento e estabilização de uma resposta hiperalgésica térmica seguida à cirurgia de CCI-ION (IMAMURA et al., 1997).

A ausência de resposta durante os testes falsos, durante os quais o termoalgesímetro foi utilizado desligado, além de dificultar um eventual aprendizado

pelos animais, ainda serviu para confirmar a natureza do estímulo nociceptivo como sendo térmico, não se tratando de estímulo mecânico.

A destruição de fibras mielínicas causada no primeiro momento da lesão por constricção parece ser responsável pela hipoalgesia inicial (VOS et al., 1994), que é observada como a fase pós-cirúrgica imediata em que há o aumento do tempo de latência à estimulação pelo termoalgesímetro da área relacionada ao nervo lesado a valores superiores ao basal.

A estimulação persistente das fibras A δ e C remanescentes produziria um processo semelhante ao da sensibilização central. Uma vez que a lesão permanece, a estimulação persistente principalmente de fibras C, a desmielinização das fibras nervosas e a presença de agentes excitatórios na periferia, principalmente a substância P, levam a este processo de hiper-responsividade, reduzindo o limiar de ativação dos neurônios de 2ª ordem (VOS et al., 1994).

Por conseguinte, observa-se em um segundo momento, a fase persistente de hiperalgesia, na qual estímulos nociceptivos de baixa intensidade passam a ser interpretados de forma exacerbada, com características semelhantes a das dores neuropáticas em humanos. Esta fase foi vista no experimento pela redução no limiar de resposta do animal ao termoalgesímetro para valores inferiores à 50% do basal, em acordo com os resultados descritos na literatura (IMAMURA et al., 1997).

A literatura não é definitiva quanto à evolução da sensibilidade no lado contralateral. Não observamos alterações estatisticamente significativas neste lado dos animais CCI-ION em comparação ao mesmo lado do grupo "Sham", apresentando apenas uma discreta redução do tempo de latência em função do tempo, comparando-se com as medidas basais (fig. 11).

Idänpään-Heikkilä & Guilbaud (1999) não observaram alterações drásticas no limiar de sensibilidade mecânica no lado contralateral, após a cirurgia CCI-ION. Do mesmo modo, Deseure et al. (2002) também observaram aumento discreto na responsividade mecânica contralateral, não atingindo a mesma intensidade observada no ipsilateral. Chudler & Anderson (2002) não observaram alterações eletrofisiológicas, nem sobre o limiar nociceptivo mecânico, como o visto na área do nervo lesado. Alterações imunohistoquímicas também não foram observadas para este lado (BENOLIEL et al., 2001).

Existem algumas hipóteses para justificar que o lado contralateral seja sensibilizado. Sugere-se que isso aconteça devido a cruzamento de fibras na medula (IMAMURA et al., 1997). Porém, a utilização de anestésico no local da lesão não alterou o limiar de resposta no lado oposto, o que descarta esta possibilidade (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999). Existem também indícios que a estimulação prolongada ou repetitiva de um lado da face pode levar a uma sensibilização do lado contralateral através de mecanismos segmentares centrais (CADET et al., 1995). Sugere-se mesmo que esta modificação surja como uma resposta exacerbada pelo estresse (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ & GUILBAUD, 1999).

Como se percebe, este não é um ponto de consenso na literatura. Além disso, em geral não se observa esta ocorrência na prática clínica dos indivíduos que sofrem de NT (OKESON, 1998). De qualquer forma, nossos dados a respeito do limiar termonociceptivo do lado contralateral não conflitam com os dados da literatura pertinente, contribuindo para a validação do modelo.

Nos vários métodos descritos na literatura para avaliação da hiperalgesia proveniente da lesão periférica no nervo infraorbitário, os animais “sham” operados não apresentam alterações comportamentais (DESEURE & ADRIAENSEN, 2004;

VOS et al., 1994), eletrofisiológicas dos neurônios do gânglio trigeminal (CHUDLER & ANDERSON, 2002), do limiar de nocicepção mecânica (BENOLIEL et al., 2001; CHUDLER & ANDERSON, 2002) ou térmica (IMAMURA et al., 1997).

Nos resultados aqui apresentados, a colocação do fio próximo ao nervo, sem a constrição, foi insuficiente para induzir a hiperalgesia térmica nos animais submetidos à cirurgia “sham” (fig. 11), demonstrando que a neuropatia decorre da constrição nervosa e não do procedimento cirúrgico ou da presença do fio, *de per se*, de acordo com a literatura (OKAMOTO et al., 2001).

O aumento dos níveis tissulares de NGF no ION como resultado da cirurgia de CCI (ANDERSON & RAO, 2001) é um possível indicativo da possível presença de neutrófilos na fase inicial do desenvolvimento da dor neuropática, uma vez que se relata que a hiperalgesia induzida por este fator é mediada, ao menos em parte, por neutrófilos circulantes (BENNETT et al., 1998). A literatura relata um caráter essencial para mecanismos periféricos precoces no desenvolvimento da neuropatia (XIE et al., 2005), entre os quais sugere-se a migração de neutrófilos para o endoneuro nos primeiros dias subseqüentes a lesão periférica do nervo (PERKINS & TRACEY, 2000).

O teste de detecção enzimática de atividade da mieloperoxidase (MPO) em amostra de tecido nervoso homogeneizado, que mostra indiretamente a presença de neutrófilos, detectou alteração significativa após três dias de cirurgia de CCI-ION, em relação aos níveis basais de MPO. Estes valores retornam aos níveis basais já no 15º dia, o que poderia sugerir uma possível função de neutrófilos no início do desenvolvimento da dor neuropática. Contudo, esta variação nos valores de MPO foi observada também no grupo “Sham” após três dias do procedimento cirúrgico, a despeito destes animais não apresentarem alteração estatisticamente

significativa no limiar termonociceptivo. Assim sendo, nossos dados sugerem que a presença destas células não seja o único fator determinante em nenhuma das fases de início, desenvolvimento e/ou manutenção do processo da neuropatia, pelo menos não ao nível do local da lesão.

A literatura sobre a utilização do USt é muitas vezes restrita e conflitante, fazendo com que seja de grande relevância as pesquisas envolvendo a eficácia e a determinação de parâmetros ótimos para a utilização deste recurso (ROBERTSON, 2002). Para isso, é de fundamental importância sua aplicação em diversos modelos experimentais de dor e, em especial, nos modelos de dor neuropática sobre os quais os dados são ainda mais escassos. Assim, poder-se-ia não apenas embasar cientificamente seu uso clínico, como também contribuir para o esclarecimento de seus mecanismos de ação, o que facilitará o estabelecimento correto de suas aplicações.

Apesar de a prática comum indicar o modo contínuo para o tratamento de processos crônicos, a escolha do modo pulsátil se deveu principalmente ao fato de não haver evidências contundentes de benefícios pelo uso do USt aplicado da outra forma (PHILADELPHIA PANEL, 2001).

Em nosso estudo, os testes utilizando o USt no modelo de CCI-ION demonstraram que, após três aplicações, no modo pulsátil, com um intervalo de 2 horas entre cada uma, há uma redução significativa da hiperalgesia ipsilateral à estimulação térmica (fig. 12 e 13), sendo que este efeito foi de maior magnitude na intensidade de onda mais alta (fig. 16). Os dados sugerem que este efeito aconteça em duas fases: uma fase de antinocicepção precoce, que se inicia após as primeiras aplicações de USt, fase esta que se desenvolve nas primeiras 6 a 8 horas, e uma fase tardia de hiponocicepção, quando se observa na 24^a hora após a primeira

aplicação que o tempo de resposta termoalgesimétrica torna-se superior mesmo aos valores basais de termonocicepção (fig. 12).

Observou-se que não houve alteração significativa na sensibilidade à estimulação térmica do lado contralateral dos animais do grupo “CCI-ION” tratados ipsilateralmente com o USt (fig. 14). Este fato pode corroborar a hipótese que a redução do limiar nociceptivo do lado contralateral à cirurgia CCI-ION se deva mais a um comportamento de estresse do que a modificações centrais que levariam a isso. Além disso, este dado ainda sugere que este efeito antinociceptivo induzido pelo USt provavelmente envolva mecanismos locais.

O USt não modificou o limiar termonociceptivo dos animais “sham” e “naïve” (fig. 15). A ausência de efeito sobre estes grupos afasta a possibilidade deste recurso estar atuando sobre um processo constitutivo. Assim, o efeito que observamos nos animais “CCI-ION” pode ser explicado por uma interferência em mecanismos desencadeados pela lesão. Alternativamente, sugere-se que o USt estimule células recrutadas pela CCI, como macrófagos e mastócitos, levando-as a liberar interleucinas antiinflamatórias do tipo da IL-10, que seriam responsáveis pelo alívio do sintoma de nocicepção nos animais que receberam a lesão nervosa. Esta hipótese encontra respaldo na literatura, onde se relata que a terapia gênica intratecal que direciona ao aumento dos níveis medulares de IL-10 também não altera o limiar nociceptivo nestes grupos de animais, embora tenha sido capaz de reduzir a nocicepção de animais com dor neuropática do nervo ciático (MILLIGAN et al., 2005).

A aplicação do USt desligado não modificou o tempo de reação termonociceptiva em nenhum dos grupos experimentais (fig. 12, 13 e 15), o que sugere que o efeito antinociceptivo do USt se deve de fato a uma atividade biofísica

induzida por esta manobra terapêutica e não por um efeito placebo ou pela simples massagem com o cabeçote do aparelho.

A literatura relata que o USt é capaz de modular a nocicepção por mecanismos outros que os efeitos térmicos, sugerindo ação por mecanismos centrais, como a redução da expressão NOS neuronal na medula espinhal, e potencial ação analgésica no tratamento de dores neuropáticas (HSIEH, 2005, 2006).

Sabe-se que analgésicos opióides possuem efeito antinociceptivo no complexo trigeminal e especificamente na dor neuropática trigeminal experimental (DESEURE et al., 2004; TAKEDA et al., 2004). Observamos que o pré-tratamento com naltrexona, um antagonista opióide, foi incapaz de bloquear o efeito antinociceptivo precoce (primeiras 6-8 horas) do USt, embora tenha impedido completamente o efeito hiponociceptivo tardio (24^a h) quando administrado 30 minutos antes (fig. 18). Estes dados corroboram a hipótese que o efeito antinociceptivo do USt, ao menos na 24^a h, depende basicamente das vias opioidérgicas, o mesmo não se verificando na 8^a hora. Estas diferenças observadas na capacidade da naltrexona em bloquear os efeitos do USt reforçam nossa hipótese de que o efeito desta manobra fisioterapêutica envolve pelo menos duas fases, cada uma delas com mecanismos e mediadores diferentes.

Apesar de não estarem envolvidas diretamente no efeito antinociceptivo precoce, as vias opioidérgicas podem exercer algum papel no desenvolvimento do efeito do USt visto na 24^a hora, uma vez que o pré-tratamento com a naltrexona (2 e 5 mg/Kg, s.c.) reduziu ou mesmo impediu o aparecimento da hipoalgesia tardia. O pré-tratamento com a naltrexona a 2 mg/Kg reduziu o efeito máximo observado na 24^a hora quando comparado ao grupo tratado apenas com solução salina, enquanto na dose de 5 mg/Kg foi capaz de bloquear completamente este efeito antinociceptivo/hipoalgésico

(fig. 18), embora tenha se mostrado incapaz de bloquear a morfina (5 mg/Kg, s.c.) aplicada na 23^a 1/2 hora do pré-tratamento com a naltrexona (fig. 17).

Este efeito prolongado provavelmente ocorreu devido às características farmacocinéticas da droga. É possível que as doses administradas de naltrexona tenham sido altas o suficiente para chegarem na 24^a hora com níveis sistêmicos capazes de bloquear, mesmo que residualmente, os opióides endógenos.

As aplicações simples ou seriadas do USt não induziram migração de neutrófilos para o nervo, visto através do MPO (fig. 20). Este dado, associado ao retorno do limiar termonociceptivo aos níveis iniciais (pré-experimento) em 48 h após as três aplicações, sugere que o USt não produziu lesão transitória ou permanente no nervo.

Na literatura atual não foram achados resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, uma vez que não encontramos estudos que testassem os efeitos do USt em um modelo experimental de dor neuropática trigeminal. A partir destas avaliações, observou-se que o USt produz um efeito antinociceptivo/hipoalgésico, dependente da intensidade e persistente. Mais ainda, estes resultados indicam que o USt pode ser um instrumento útil e eficaz no tratamento e controle de neuropatias, como a NT. Mais pesquisas são necessárias para elucidar o mecanismo pelo qual o USt age e assim, indicar melhor seu uso terapêutico com bases científicas.

7 – CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que o teste do termoalgesímetro é um instrumento eficaz para detectar as alterações nociceptivas observadas após a CCI-ION, em ratos, apresentando-se como uma técnica útil, acessível e aplicável para avaliações de nocicepção, drogas e procedimentos antinociceptivos na região facial em modelos animais.

Verificou-se também que na fase inicial da lesão por constricção crônica ocorre a presença de neutrófilos no local do nervo lesado, uma vez que os níveis de MPO estavam aumentados no 3º dia pós-cirúrgico. A presença destas células é transitória, conforme revelado pelos níveis normais de MPO observados a partir do 15º dia. Do mesmo modo, os animais “sham” apresentaram variação semelhante dos níveis de MPO também no 3º dia, sugerindo que os PMN neutrófilos aparentemente não são os únicos determinantes na gênese da dor neuropática, assim como o desenvolvimento e a manutenção deste processo provavelmente também sejam independentes destas células, pelo menos ao nível do local da lesão.

A despeito da presença do fio, o fato de no 15º dia os níveis de MPO já retornarem a valores basais é um indicativo que a migração de PMN neutrófilos para o local do nervo lesado, vista no 3º dia pós-cirúrgico, se deva ao procedimento cirúrgico em si. Isso confirma que o fio, apenas, provavelmente seja incapaz de induzir ou manter uma resposta inflamatória ou neuropática, visto pela ausência de alterações nociceptivas no grupo “Sham”.

Observou-se que o USt produz um efeito antinociceptivo/hipoalgésico, dependente da intensidade da onda ultrasônica, duradouro mas reversível, que

parece se desenvolver em duas fases distintas, com mecanismos e mediação química diferentes para cada uma das fases.

O efeito antinociceptivo do USt só foi observado no lado ipsilateral dos animais submetidos à cirurgia CCI-ION, não alterando o limiar termonociceptivo do lado contralateral à lesão assim como dos animais “sham” e “naïve”. Isto sugere que este recurso não atue em elementos constitutivos e que, para produzir seus efeitos antinociceptivos, dependa de mecanismos locais deflagrados pela lesão.

A administração de naltrexona no início do experimento e na 23^a ½ hora permitiu que fosse verificado que as vias opioidérgicas são mais importantes na fase de hipotalgesia tardia induzida pelo USt do que na fase de antinocicepção precoce.

A administração prévia de naltrexona não antagonizou a fase precoce da resposta antinociceptiva, muito embora tenha interferido no aparecimento da hipotalgesia tardia. Nossos resultados sugerem que esta interferência decorreu da ação da droga nesta segunda fase, como resultado da persistência de níveis sistêmicos capazes de antagonizar os opióides endógenos envolvidos no processo.

As aplicações simples ou seriadas do USt não modificaram significativamente os níveis basais de MPO, sugerindo que este recurso terapêutico não induza lesão tecidual, ao menos não o suficiente para mobilizar PMN neutrófilos. Este fato, associado ao retorno do limiar termonociceptivo aos níveis pré-experimentais após 48 h das aplicações, são indícios que o efeito antinociceptivo/hipotalgésico não acontece em função de uma lesão transitória ou permanente do nervo.

Com estes resultados, conclui-se que o USt pode ser um instrumento útil e eficaz no tratamento e controle de neuropatias, como a NT. Mais pesquisas são necessárias na elucidação dos mecanismos pelos quais o USt age, para assim indicar seu uso terapêutico com maior precisão, baseado em evidências científicas.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTONI, E., FRIGERIO, R., SANTORO, P. Antiepileptic drugs in the treatment of chronic headaches. *Neurological Sciences*, v. 24, suplemento 2, p. S128 - S131, 2003.

AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. *Neurological Sciences*, v. 24, suplemento 2, p. S57 - S60, 2003.

ALLAIS, G., DE LORENZO, C., QUIRICO, P.E., LUPI, G., AIROLA, G., MANA, O., BENEDETTO, C. Non-pharmacological approaches to chronic headaches: transcutaneous electrical nerve stimulation, lasertherapy and acupuncture in transformed migraine treatment. *Neurological Sciences*, v. 24, suplemento 2, p. S138 - S142, 2003.

ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S., BENEDITO-SILVA, A. A., TUFIK, S. The effect of combined therapy (ultrasound and interferential current) on pain and sleep in fibromyalgia. *Pain*, v. 104, p. 665 - 672, 2003.

ALVES, D. P., DUARTE, I. D. G. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *European Journal of Pharmacology*, v. 444, p. 47 - 52, 2002.

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

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

BAKER, K. G., ROBERTSON, V. J., DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Physical Therapy*, v. 81, n. 7, p. 1351 - 1358, 2001.

BAKER, M. D., WOOD, J. N. Involvement of Na⁺ channels in pain pathways. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 1, p. 27-31, 2001.

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, p. 87 -107, 1988.

BENNETT, G., AL-RASHED, S., HOULT, J.R.S., BRAIN, S.D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. *Pain*, v. 77, p. 315 - 322, 1998.

BENOLIEL, R., ELIAVA, E, IADAROLA, M. J. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? *Pain*, v. 91, p. 111 - 121, 2001.

BENOLIEL, R., WILENSKY, A., TAL, M., ELIAV, E. Application of a pro-inflammatory agent to the orbital portion of the rat infraorbital nerve induces changes indicative of ongoing trigeminal pain. *Pain*, v. 99, p. 567 - 578, 2002.

BESSION, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, p. 1610 - 1615, 1999.

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

CAMU, F., SHI, L., VANLERSBERGHE, C. The Role of COX-2 inhibitors in pain modulation. *Drugs*, v. 63, suppl. 1, p. 1-7, 2003.

CHONG, M. S., BAJWA, Z. H. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 25, n. 5S, p. S4 - S11, 2003.

CHRISTENSEN, D., GAUTRON, M., GUILBAUD, G., KAYSER, V. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain*, v. 83, p. 433 - 440, 1999.

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

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

CLATWORTHY, A. L., ILLICH, P. A., CASTRO, G. A., WALTERS, E. T. Role of periaxonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, v. 184, p. 5 - 8, 1995.

COLOMBO, B., ANNOVAZZI, P. O. L., COMI, G. Neuropathic cranial pain. *Neurological Sciences*, v. 24, suplemento 2, p. S132-S137, 2003.

COLPAERT, F. C., TARAYRE, J. P., KOEK, W., PAUWELS, P. J., BARDIN, L., XU, X.-J., WIESENFELD-HALLIN, Z., COSI, C., CARILLA-DURAND, E., ASSIÉ, M. B., VACHER, B. Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology*, v. 43, p. 945 - 958, 2002.

CORTELLI, P., PIERANGELI, G. Chronic pain-autonomic interactions. *Neurological Sciences*, v. 24, suplemento 2, p. S68 - S70, 2003.

CRISCI, A. R., FERREIRA, A. L. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 28, n. 10, p. 1335 - 1341, 2002.

DE MATOS, I. M., SOUZA, D. G., SEABRA, D. G., FREIRE-MAIA, L., TEIXEIRA, M. M. Effects of tachykinin NK1- o PAF- receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom. *European Journal of Pharmacology*, v. 376, p. 293 - 300, 1999.

DESEURE, K. R., ADRIAENSEN, H. F., COLPAERT, F. C. Effects of the combined continuous administration of morphine and the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F 13640 in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European Journal of Pain*, v. 8, p. 547 - 554, 2004.

DESEURE, K., ADRIAENSEN, H. Comparison between two types of behavioral variables of non-evoked facial pain after chronic constriction injury to the rat infraorbital nerve. *Comparative Medicine*, v. 52, n. 1, p. 44 - 49, 2002.

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

DESEURE, K., KOEK, W., ADRIAENSEN, H., COLPAERT, F. C. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine_{1a} agonist (3-chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methylpyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (f 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, n. 2, p. 505 - 514, 2003.

DESEURE, K., KOEK, W., COLPAERT, F. C., ADRIAENSEN, H. The 5-HT_{1A} receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, v. 456, p. 51 - 57, 2002.

DOGRUL, A., ZAGLI, U., TULUNAY, F. C. The role of T-type calcium channels in morphine analgesia, development of antinociceptive tolerance and dependence to morphine, and morphine abstinence syndrome. *Life Sciences*, v. 71, p. 725 - 734, 2002.

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

DUARTE, I.D.G., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 221, p. 171 - 174, 1992.

DUBUISSON, D., DENNIS, S. G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p. 161 - 174, 1977.

ELHAG, M., COGHLAN, K., CHRISTMAS, P., HARVEY, W., HARRIS M. The anti-inflammatory effects of dexamethasone and therapeutic ultrasound in oral surgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 23, p. 17 - 23, 1985.

ERICHSEN, H. K., HAO, J.-X., XU, X.-J., BLACKBURN-MUNRO, G.. Comparative actions of the opioid analgesics morphine, methadone and codeine in rat models of peripheral and central neuropathic pain. *Pain*, v. 116, p. 347 - 358, 2005.

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

- FRANÇA, J. L. VASCONCELLOS, A. C., MAGALHÃES, M. H. A., BORGES, S. M. *Manual de normalização de publicações técnico-científicas*. 6ª ed. Belo Horizonte: UFMG, 2003. 230 p. (Aprender, 15).
- FRIED, K., BONGENHIELM, U., BOISSONADE, F. M., ROBINSON, P. P. Nerve Injury–Induced Pain in the Trigeminal System. *The neuroscientist*, v. 7, n. 2, p. 155 - 165, 2001.
- GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., BARTOLINI, A. 5-HT_{1A} agonists induce central cholinergic antinociception. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 57, n. 4, p. 835 - 841, 1997.
- GREGG, J. M. A surgical approach to the ophthalmic-maxillary nerve trunks in the rat. *Journal of Dental Research*, v. 52, n. 2, p. 392, 1973.
- HARDEN, R. N. Gabapentin: a new tool in the treatment of neuropathic pain. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 100 (Supplementum), n.173, p. 43 - 47, 1999.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C., JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, v. 32, p. 77 - 88, 1988.
- HSIEH, Y.-L. Effects of ultrasound and diclofenac phonophoresis on inflammatory pain relief: suppression of inducible nitric oxide synthase in arthritic rats. *Physical Therapy*, v. 86, n. 1, p. 39 - 49, 2006.
- HSIEH, Y.-L. Reduction in induced pain by ultrasound may be caused by altered expression of spinal neuronal nitric oxide synthase-producing neurons. *Archives Of Physical Medicine And Rehabilitation*, v. 86, p. 1311 - 1317, 2005.
- IASP (International Association for the Study of Pain). *IASP Pain Terminology*. 2ª ed. Seattle, 1994. Disponível em: <[http:// www.iasp-pain.org/terms-p.html](http://www.iasp-pain.org/terms-p.html) >. Acesso em 21 Fev. 2005.
- IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J. J., GUILBAUD, G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain*, v. 79, p. 281 - 290, 1999.
- IMAMURA, Y., KAWAMOTO, H., NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Experimental Brain Research*, v. 116, p. 97 - 103, 1997.
- IVEY, C. L., WILLIAMS, F. M., COLLINS, P. D., JOSE, P. J., WILLIAMS, T. J. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischaemia myocardium in the rabbit: evidence for a role for C5a and interleukin-8. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 95, p. 2720 - 2728, 1995.
- JENSEN, T. S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. *European Journal of Pain*, v. 6 (Suppl. A), p. 61 - 68, 2002.
- JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *Journal of Athletic Training*, v. 37, n. 3, p. 293 - 299, 2002.

- JONES, S. W. Overview of voltage-dependent calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 30, n. 4, p. 299 - 312, 1998.
- KAYSER, V., AUBEL, B., HAMON, M., BOURGOIN, S. The antimigraine 5-HT_{1B/1D} receptor agonists, sumatriptan, zolmitriptan and dihydroergotamine, attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 137, n. 8, p. 1287 - 1297, 2002.
- KITT, C. A., GRUBER, K., DAVIS, M., WOOLF, C. J., LEVINE, J. D. Trigeminal neuralgia: opportunities for research and treatment. *Pain*, v. 85, p. 3 - 7, 2000.
- KNIGHT, Y. E., BARTSCH, T., KAUBE, H., GOADSBY, P. J. P/Q-type calcium-channel blockade in the periaqueductal gray facilitates trigeminal nociception: a functional genetic link for migraine? *The Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 1 - 6, 2002.
- KRYZHANOVSKII, G. N., DOLGIKH, V. G., GORIZONTOVA, M. P., MIRONOVA, I. V. Formation of a pathological system in rats with neuropathic trigeminal neuralgia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 115, n. 6, p. 623 - 625, 1993.
- LAUGHLIN, T. M., BETHEA, J. R., YEZIERSKI, R. P., WILCOX, G. L. Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia. *Pain*, v. 84, p. 159 - 167, 2000.
- LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, p. 597 - 652, 2001.
- LYU, Y. S., PARK, S. K., CHUNG, K., CHUNG, J. M. Low dose of tetrodotoxin reduces neuropathic pain behaviors in an animal model. *Brain Research*, v. 871, p. 98 - 103, 2000.
- MA, W., DU, W., EISENACH, J. C. Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain Research Interactive*, v. 937, p. 94-99, 2002.
- MACFARLANE, B. V., WRIGHT, A., CALLAGHAN, J. O., BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its controls by drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 75, n. 1, p. 1 - 19, 1997.
- MAJLESI, J., ÜNALAN, H. High-power pain threshold ultrasound technique in the treatment of active myofascial trigger points: a randomized, double-blind, case-control study. *Archives Of Physical Medicine And Rehabilitation*, v. 85, p. 833 - 836, 2004.
- MARCHAND, F., PERRETTI, M., MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. *Nature Neuroscience*, v. 6, p. 521 - 532, 2005.
- McENERY, M. W., VANCE, C. L., BEGG, C. M., LEE, W.-L., CHOI, Y., DUBEL, S. J. Differential Expression and Association of Calcium Channel Subunits in Development and Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 30, n. 4, p. 409 - 418, 1998.

MILLIGAN, E. D., LANGER, S. J., SLOANE, E. M., HE, L., WIESELER-FRANK, J., O'CONNOR, K., MARTIN, D., FORSAYETH, J. R., MAIER, S. F., JOHNSON, K., CHAVEZ, R. A., LEINWAND, L. A., WATKINS, L. R. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 8, p. 2136 - 2148, 2005.

MORRIS, R., CAHUSAC, P. M. B., SALT, T. E., MORRIS, R. G., HILL, R. G. A behavioural model for the study of facial nociception and the effects of descending modulatory systems in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 6, p. 245 - 252, 1982.

NEUBERT, J. K., WIDMER, C. G., MALPHURS, W., ROSSI, H. L., VIERCK JR., C. J., CAUDLE, R. M. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain*, v. 116, p. 386 - 395, 2005.

NYBORG, W. L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 27, n. 3, p. 301 - 333, 2001.

OKAMOTO, K., MARTIN, D. P., SCHMELZER, J. D., MITSUI, Y., LOW, P. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Experimental Neurology*, v.169, p. 386 - 391, 2001.

OKESON, J. P. *Dores bucofaciais de Bell*. 5^a ed. São Paulo: Quintessence, 1998. 500 p.

PENNISI, E., CRUCCU, G., MANFREDI, M., PALLADINI, G. Histometric study of myelinated fibers in the human trigeminal nerve. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 105, p. 22 - 28, 1991.

PERKINS, N. M., TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, v. 101, n. 3, p. 745 - 757, 2000.

PERTOVAARA, A., KONTINEN, V. K., KALSO, E. A. Chronic spinal nerve ligation induces changes in response characteristics of nociceptive spinal dorsal horn neurons and in their descending regulation originating in the periaqueductal gray in the rat. *Experimental Neurology*, v. 147, p. 428 - 436, 1997.

PHILADELPHIA PANEL. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for neck pain. *Physical Therapy*, v. 81, n. 10, p. 1701 - 1717, 2001.

PHILADELPHIA PANEL. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for shoulder pain. *Physical Therapy*, v. 81, n. 10, p. 1719 - 1730, 2001.

PHILADELPHIA PANEL. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for knee pain. *Physical Therapy*, v. 81, n. 10, p. 1675 - 1700, 2001.

PHILADELPHIA PANEL. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions for low back pain. *Physical Therapy*, v. 81, n. 10, p. 1641 - 1674, 2001.

PHILADELPHIA PANEL. Philadelphia Panel evidence-based clinical practice guidelines on selected rehabilitation interventions: overview and methodology. *Physical Therapy*, v. 81, n. 10, p. 1629 - 1640, 2001.

PINTÉR, E., THÁN, M., CHU, D. Q., FOGG, C., BRAIN, S. D. Interaction between interleukin 1 β and endogenous neurokinin 1 receptor agonists in mediating plasma extravasation and neutrophil accumulation in the cutaneous microvasculature of the rat. *Neuroscience Letters*, v. 318, p. 13 - 16, 2002.

PISANI, A., BONSI, P., MARTELLA, G., DE PERSIS, C., COSTA, C., PISANI, F., BERNARDI, G., CALABRESI, P. Intracellular calcium increase in epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotrigine. *Epilepsia*, v. 45, n. 7, p. 719 - 728, 2004.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 449 - 461, 2001.

PURVES, D., AUGUSTINE, G. J., FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LAMANTIA, A.-S., MCNAMARA, J. O., WILLIAMS, S. M. *Neuroscience*. 2^a ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/books>>. Acesso em 17 Fev. 2005.

RABOISSON, P., DALLEL, R. The orofacial formalin test. *Neuroscience And Biobehavioral Reviews*, v. 28, p. 219 - 226, 2004.

REHER, P., DOAN, N., BRADNOCK, B., MEGHJI, S., HARRIS, M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine*, v. 11, n. 6, p. 416 - 423, 1999.

REHER, P., DOAN, N., BRADNOCK, B., MEGHJI, S., HARRIS, M. Therapeutic ultrasound for osteoradionecrosis: an in vitro comparison between 1mhz and 45 khz machines. *European Journal of Cancer*, v. 34, n. 12, p. 1962 - 1968, 1998.

ROBERTSON, V. J. Dosage and treatment reponse in randomized clinical trials of therapeutic ultrasound. *Physical Therapy in Sport*, v. 3, p. 124 - 133, 2002.

RODRIGUES, A. R. A., DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*, v. 129, n. 1, p. 110 - 114, 2000.

ROVERONI, R. C., PARADA, C. A., MARIA CECÍLIA, VEIGA, F.A., TAMBELI, C. H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain*, v. 94, p. 185 - 191, 2001.

SAVERNINI, N., SAVERNINI, A., GONÇALVES, F. M., CASTRO, M. S. A. Influência da intensidade do ultrassom terapêutico sobre o efeito antinociceptivo e antiedematogênico na inflamação por carragenina, em ratos. In: XXXV Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2003, Águas de Lindóia, SP. Anais do XXXV Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). Catálogo de resumos, 2003. v. 1. p. 140.

SCHAIBLE, H.-G., RICHTER, F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*, v. 389, p. 237 - 243, 2004.

SERRA, Jordi. Overview of neuropathic pain syndromes [new advances in the treatment of neuropathic pain]. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 100 (Supplementum), n. 173, p. 7-11, 1999.

SOARES, A. C., DUARTE, I. D. G. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, p. 127 - 131, 2001.

STEINHOFF, B. J., HIRSCH, E., MUTANI, R., K. NAKKEN, O. The ideal characteristics of antiepileptic therapy: an overview of old and new AEDs. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 107, p. 87 - 95, 2003.

TAKEDA, M., TANIMOTO, T., IKEDA, M., KADOI, J., NASU, M., MATSUMOTO, S. Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn. *Neuroscience*, v. 125, p. 995 - 1008, 2004.

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

TER HAAR, G. Therapeutic ultrasound. *European Journal of Ultrasound*, v. 9, p. 3 - 9, 1999.

TJØLSEN, A., BERGE, O.-G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, v. 51, p. 5 - 17, 1992.

TREDE, R.-D., MEYER, R. A., RAJA, S. N., CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Progress in Neurobiology*, v. 38, p. 397 - 421, 1992.

VALE, M. L., MARQUES, J. B., MOREIRA, C. A., ROCHA, F. A. C., FERREIRA, S. H., POOLE, S., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 304, n. 1, p. 102 - 108, 2003.

VOS, B. P., HANS, G., ADRIAENSEN, H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. *Pain*, v. 76, p. 173 - 178, 1998.

VOS, B. P., STRASSMAN, A. M., MACIEWICZ, R. J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *The Journal of Neuroscience*, v. 14, n. 5, p. 2708 - 2723, 1994.

VOS, B.P., STRASSMAN, A. M. Fos expression in the medullary dorsal horn of the rat after chronic constriction injury to the infraorbital nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 357, n. 3, p.362 - 375, 1995.

WANG, L. X., WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, p. 949 - 965, 2003.

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

ZELENKA, M., SCHÄFERS, M., SOMMER, C. Intra-neural injection of interleukin-1b and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain*, v. 116, p. 257 - 263, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, p. 109 - 110, 1983.

ANEXO I – Cópia do Certificado de Aprovação de Projeto de Pesquisa expedido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG)



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 146/ 05**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo da antinociceção induzida pelo ultrassom terapêutico no modelo experimental de dor neuropática trigeminal**", que tem como responsável **Maria Salete de Abreu**, está 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 **15/ 02/2006**.

Este certificado expira-se em **15/ 02/2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 146/ 05**, related to the project entitled "**Assay of therapeutic ultrasound-induced antinociception in experimental neuropathic pain**", under the supervision of **Maria Salete de Abreu**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 15, 2006**.

This certificate expires in **February 15, 2011**.

Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br