

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento

Ação antinociceptiva do uso crônico de monoaminas em modelo experimental de neuropatia periférica: uma análise da plasticidade neural associada à atividade do fator de transcrição CREB.

Karina Previdelli

**Ribeirão Preto
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurologia

Ação antinociceptiva do uso crônico de monoaminas em modelo experimental de neuropatia periférica: uma análise da plasticidade neural associada à atividade do fator de transcrição CREB.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito par obtenção do grau de Mestre em Ciências. Sub-área: Neurociências.

Área de concentração: Neurociências e Ciências do Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas.

**Ribeirão Preto
2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Previdelli, Karina.

Ação antinociceptiva do uso crônico de monoaminas em modelo experimental de neuropatia periférica: uma análise da plasticidade neural associada à atividade do fator de transcrição CREB. Ribeirão Preto, 2009, 62p.

62 p.: Il; .

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Neurologia

Orientador: Lucas, Guilherme de Araújo.

1. Dor. 2. CREB. 3. Antidepressivos.
4. Imipramina. 5. Monoaminas. 6. Dor Neuropática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Previdelli

Ação antinociceptiva do uso crônico de monoaminas em modelo experimental de neuropatia periférica: uma análise da plasticidade neural associada à atividade do fator de transcrição CREB.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito par obtenção do grau de Mestre em Ciências. Sub-área: Neurociências.

Área de concentração: Neurociências e Ciências do Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“É impossível agradecer com exatidão por todo o auxílio
proporcionado por
você em mais essa fase da minha vida... Mãe, você foi o
amparo necessário para a concretização de mais esse sonho
que finalmente torna-se realidade! Obrigado por todo apoio
e dedicação. Amo você...”*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas pela sua efetiva participação no desenvolvimento desse trabalho, pelo seu profissionalismo e pela sua paciência na orientação, que muito contribuiu para o meu crescimento pessoal e enriquecimento profissional tornando possível a conclusão desta dissertação.

Ao amigo Maurício que tanto me ajudou.

Ao amigo Rodrigo, pelo auxílio quando surgiam os compromissos de última hora...

A amiga Flaviane pelos bons momentos, pelas gargalhadas e por ter me oferecido conforto e atenção durante essa fase tão difícil em minha vida.

Ao meu amigo Rubinho da Histologia pela sua paciência e pela sua participação fundamental.

À Sônia, competente funcionária do Laboratório, pelo apoio oferecido.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Eduardo e Leonardo, pelos cuidados oferecidos aos animais de experimentação.

Aos Departamentos de Fisiologia e Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pelas facilidades na execução desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa (processo 05/03898-1) que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio financeiro à este projeto (processo 06/00479-0). À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA) e a Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro ao laboratório de Neurobiologia da Dor.

...Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a DEUS a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

Resumo.....	9
Abstract	11
Lista de Abreviaturas	12
I. Introdução	13
II. Objetivos	26
III. Material e métodos.....	27
IV. Resultados	38
V. Discussão	50
VI. Conclusão	55
VII. Referências Bibliográficas	56

RESUMO

Previdelli, K. **Ação antinociceptiva do uso crônico de monoaminas em modelo experimental de neuropatia periférica: uma análise da plasticidade neural associada à atividade do fator de transcrição CREB.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

Neste trabalho investigamos o efeito do uso crônico de imipramina na fosforilação do fator de transcrição CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) na coluna dorsal da me de camundongos submetidos à dor crônica de origem neuropática pela lesão de nervo periférico. O modelo de neuropatia periférica consistiu de ligação unilateral e parcial do nervo isquiático (modelo de Seltzer). Neste modelo, as alterações de sensibilidade aparecem de 24-48 horas após a cirurgia e os animais apresentaram hipersensibilidade ao estímulo mecânico (alodínia mecânica) e hipernocicepção ao estímulo térmico. Essas alterações de sensibilidade perduraram por, pelo menos, 3 meses. A partir do 7º dia após a lesão, os animais foram tratados com inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, imipramina, em diferentes doses (5, 10 ou 30 mg/kg/dia; i.p.) ou salina (10 µl/gr; i.p.) durante 21 dias. O desenvolvimento da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica foi monitorado uma vez por semana, antes da injeção de imipramina e 24 horas após a administração da última dose do fármaco. O estado de fosforilação de CREB foi investigado por *western blot* e imunohistoquímica em extrato ou fatias da coluna dorsal da me lombar (L₄-L₆). A atividade de CREB foi monitorada 7 e 28 dias após a lesão e após o tratamento agudo e crônico com imipramina. Nos resultados mostram que a alodínia mecânica e a hipernocicepção térmica estavam presentes do 7º ao 28º dia após a ligação do nervo periférico ($p < 0,05$, teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Entretanto, a administração de imipramina, reduziu, progressivamente, a hipersensibilidade ao estímulo mecânico e térmico a partir da primeira semana de tratamento. Após 21 dias de terapia as alterações de sensibilidade decorrentes da lesão do nervo periférico estavam completamente revertidas ($p < 0,05$, teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Por outro lado, não observamos efeito antinociceptivo após a administração aguda de imipramina. Encontramos, ainda, que a fosforilação de CREB na coluna dorsal da me, ipsilateral a lesão, aumentou significativamente, no 7º e 28º dia após a lesão ($p < 0.05$, teste-*t* de Student). O tratamento crônico com imipramina, também, inibiu o aumento do atividade de CREB após lesão do nervo periférico ($p < 0.05$, teste-*t* de Student). Os resultados imunohistoquímicos sugerem que o efeito da lesão e do tratamento com

imipramina ocorre em neurônios das camadas mais superficiais da me, onde a informação nociceptiva é inicialmente processada pelo sistema nervoso central. Observamos, ainda, que mesmo após a interrupção do tratamento crônico com imipramina, os animais apresentaram uma resposta comportamental ao estímulo mecânico semelhante aos padrões anteriores à lesão. Esses resultados sugerem que a administração crônica de imipramina produz mudanças no sistema sensorial cujo aparecimento é dependente do tempo de administração do fármaco. Esse fenômeno pode explicar, pelo menos parcialmente, por que o efeito clínico, antinociceptivo, apresenta uma latência de 2-3 semanas para aparecer. Nossos resultados evidenciam que o tratamento crônico com IRSN produz antinocicepção em condições de dor neuropática pela redução da transcrição de novas proteínas mediada por CREB.

Palavras-chave: Dor, Dor Neuropática, CREB, Antidepressivos, Imipramina, Monoaminas.

ABSTRACT

Previdelli, K. **The antinociceptive effect of chronic use of monoamines in an experimental model of peripheral neuropathy: an analyses of the neuroplasticity associated to CREB activity.**

We investigated the effect of chronic administration of imipramine on CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) phosphorylation in the spinal cord dorsal horn following peripheral nerve lesion. Adult Balb/C male mice weighting 20-25g were used. Unilateral nerve lesion was induced by partial ligation of the sciatic nerve (Seltzer model). Seven days after nerve injury, imipramine (5, 10 or 30 mg/kg), or saline (10 μ L/g) were injected daily for 21 days. The development of tactile mechanical hypersensitivity or thermal hiperalgesia was monitored once a week, before the injections and 24 hours after the last drug administration. CREB phosphorylation was investigated by western blot and immunohistochemistry in the lumbar (L4-L6) spinal cord dorsal horn 7 and 28 days after nerve injury as well as in lesioned animals treated with imipramine for 21 days. Tactile-induced neuropathic pain hypersensitivity and thermal hiperalgesia were observed from 7 to 28 days after nerve ligation ($p < 0.05$, non-parametric Mann-Whitney test). However, daily administration of imipramine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI), progressively reduced mechanical and thermal hypersensitivity from the first week of treatment, and completely reversed tactile stimulus-induced hypersensitivity after 21 days of therapy ($p < 0.05$, non-parametric Mann-Whitney test). No antinociceptive effect was observed with acute SNRI treatment. CREB phosphorylation increased in spinal cord dorsal horn ipsilateral to the lesion after 7 and 28 days post-injury. Following chronic SNRI administration, the increased phosphorylation of CREB protein was also reversed in the spinal cord dorsal horn. Surprisingly, the antinociceptive effect of imipramine was still observed 3 weeks after cessation of treatment. These results indicate that chronic administration of imipramine induces plastic changes in the sensory system that may take time to develop and mature, which might explain in part why the clinical analgesic effect of SNRI develops with a delay after the beginning of the treatment. Our data also provide evidence that prolonged SNRI treatment may induce antinociception in neuropathic pain conditions by reducing CREB-mediated transcription.

Key words: Pain, Neuropathic pain, CREB, Antidepressant, Imipramine, Monoamines.

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato
AINH	Anti-inflamatório não-hormonal
AMPA	Aminohidroximetilisoaxolepropilônico
ATF 1	Ativador de Transcrição do Fator 1
ADT	Antidepressivo tricíclico
Ca²⁺	Íons Cálcio
CREM	Proteína Moduladora de CRE
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
ERK	Kinase reguladora de sinal extracelular
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
IRSN	Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
LME	Lesão da me
L₄	Vértebra lombar 4
L₆	Vértebra lombar 6
Log	Logarítimo
MAQ	Inibidor da Recaptação da Monoaminaoxidase
MAPK	<i>Protein kinase mitogen-activated</i>
ME	Me
NA	Noradrenalina
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NMDA	N-metil-D-aspartato
K⁺	Íons de Potássio
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PK	Proteína Kinase
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TCAs	Antidepressivos Tricíclicos
5-HT	Serotonina

I. INTRODUÇÃO

Nociceção e Dor

A nociceção é um processo bidirecional, que relaciona-se com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo SN, que formulam a informação relacionada à lesão; entendida como um sistema sensorial altamente especializado cuja nobre função evita, na maior parte das vezes, a lesão tecidual ou favorece a redução dos danos causados por agentes nocivo (Dray 1997; Farber, Stratz *et al.* 2001).

Na maior parte das vezes, a experiência dolorosa está associada diretamente a este sistema sensorial nociceptivo. A dor é uma experiência sensorial e psico-emocional que agrega aspectos (a) sensorial-discriminatório, (b) afetivo ou emocional, (c) cognitivo e (d) comportamental (Besson 1999). Assim, tem uma conotação individual dentre as sensações experimentadas por um organismo e está sujeita a influência de experiências prévias (Bogduk 1994; Merskey 1994; Jann and Slade 2007). Há relevante diferença na conotação e uso apropriado dos termos *nociceção* e *dor*. O primeiro refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas a partir de um estímulo nocivo, enquanto o segundo envolve a percepção do estímulo aversivo, o que requer a capacidade de abstração e elaboração desses impulsos sensoriais (Millan 1999). Em 1986, a Associação Internacional para o Estudo da Dor conceituou dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais.

Quando o organismo é exposto a estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, estes são detectados e traduzidos para elaboração de uma resposta apropriada que, normalmente, culmina em reações protetoras reflexas e também, em grande parte das vezes, na sensação de dor aguda (Millan 1999). A mesma é limitada temporalmente e desaparece com o afastamento do agente causador ou após a resolução do processo fisiopatológico. Porém, quando a sensação de dor persiste além do tempo de resolução da situação que a originou, torna-se crônica, e perde a função de alerta, antes altamente vantajosa ao organismo e transforma-se em processo patológico desvantajoso, muitas vezes incapacitante, que passa a ser motivo de sofrimento e de alterações nas funções de múltiplos sistemas (Bogduk 1994; Merskey 1994; Harden 2005).

Os estímulos nociceptivos são detectados por terminações específicas de neurônios sensoriais periféricos, os nociceptores; que por meio de suas conexões com neurônios na ME e no encéfalo, desencadeiam uma cascata de eventos pelo sistema nervoso (Kandel 2000). Os nociceptores localizam-se nas terminações nervosas livres e estão presentes, tanto na superfície, quanto nas camadas mais profundas das vísceras. Funcionam como transdutores, que transformam energia mecânica, térmica e química

em atividade elétrica, posteriormente conduzida ao Sistema Nervoso Central (SNC), respondem diretamente a alguns estímulos nocivos e indiretamente a outros, por meio da liberação de um ou mais mediadores pelos tecidos lesados, substâncias estas que provocam resposta dolorosa quando entram em contato com os nociceptores (Millan 1999; Millan 2002).

Os nociceptores estão presentes, também, nas fibras A δ , finamente mielinizadas que modulam a primeira fase da dor, rápida e forte, tipo picada ou ferroadada e são sensíveis a estímulos mecânicos intensos. No entanto, nas fibras C polimodais não-mielinizadas que conduzem sinais elétricos mais lentamente, responsáveis pela segunda fase da dor, difusa, persistente, em queimação; respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. (Besson 1997; Millan 1999; Kandel 2000; Millan 2002).

A transmissão da informação nociceptiva ocorre através de diversos neurotransmissores que são produzidos, armazenados e liberados nas terminações dos neurônios aferentes da ME. Acredita-se que o principal grupo de mediadores químicos, sejam os aminoácidos excitatórios, envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva. No entanto, em fibras aferentes do tipo C também encontra-se uma variedade de neuropeptídeos como substância SP, neurotensina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e colecistocinina, ATP (adenosina trifosfato), serotonina (5-HT) e acetilcolina (Millan 1999; Millan 2002). Além do glutamato, aminoácidos inibitórios como GABA (ácido gama-aminobutírico) e glicina, assim como as monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina), a acetilcolina e a histamina também estão relacionadas com a supressão da informação dolorosa (Afione, Debeljuk *et al.* 1990; Duvilanski, Seilicovich *et al.* 1994; Millan 1999; Pampillo, De Laurentiis *et al.* 1999; Millan 2002; Rygh, Svendsen *et al.* 2005).

Os estímulos produzidos pela ativação dos nociceptores promovem liberação dos neurotransmissores excitatórios como o glutamato e a substância P. O glutamato atua sobre os receptores AMPA e cainato promovendo uma despolarização persistente e aumentando a excitabilidade do terminal periférico. Já a substância SP ativa receptores específicos relacionados com a hiperalgesia. A associação desses e outros mecanismos contribuem para a cronificação da dor (Drewes 2006).

A especialização sensorial dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) é preservada no SNC por meio das diferentes vias ascendentes; sendo que a dor, é conduzida por meios de sinapses para o quadrante ântero-lateral, do lado contralateral da ME, onde os axônios do corno dorsal ascendem em direção ao tálamo; um rele da interpretação sensitiva, e ao córtex cerebral, onde ocorre a consciência da sensação

dolorosa (Millan 1999; Millan 2002). O sistema ântero-lateral transmite informações sensoriais para o tálamo, através de vias diretas e indiretas, sendo as duas principais: a via paleoespinalâmica e a via neoespinalâmica. Na via neoespinalâmica (via rápida), a dor inicia-se por estímulos mecânicos ou térmicos principalmente; com neurônios de condução rápida (fibras A δ), e produz sensação de dor aguda e bem localizada. Já na via paleoespinalâmica (via-lenta), o início da informação acontece pelos fatores químicos; com neurônios de condução lenta, e sensação de dor mal localizada e contínua. (Millan 1999; Millan 2002).

Sistemas descendentes de controle da dor

O sistema descendente de controle da dor consiste em diversas conexões anatômicas centrais, iniciando pela substância cinzenta periaquedutal, que recebe aferências da me e núcleos periventriculares do mesencéfalo e ponte superior. Estas secretam encefalinas e outros opióides endógenos atuantes em interneurônios opioidérgicos, capazes de inibir pré-sinápticamente a liberação de glutamato, e outros neuromoduladores (**Figs. 1 e 2**). Além disso, peptídeos opióides inibem a descarga dos neurônios GABAérgicos inibitórios, ativando as vias descendentes (Afione, Debeljuk *et al.* 1990; Millan 2002; Drewes 2006).

Os núcleos Magno da Rafe (NMR) e a Formação Reticular, recebem os axônios das áreas periaquedutais, e estas por sua vez, enviam suas fibras serotoninérgicas que projetam-se para o corno dorsal da medula nas lâminas I, II e IV de Rexed, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e neurônios dos tratos ascendentes espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico (**Fig. 1**).

Um dos principais sistemas associados ao controle da dor é representado pela serotonina e seus diferentes receptores. A serotonina está relacionada com diversas funções fisiológicas como a sinalização da própria dor, além de alterações de comportamento, humor, ansiedade, agressividade, termorregulação, sono e sua importante abrangência relacionada a depressão (Basbaum and Fields 1978; Millan 2002; Drewes 2006). A atuação dessa monoamina sobre o receptor 5-HT_{1A} é responsável pela diminuição da excitabilidade neuronal envolvida com o sistema descendente. No entanto, embora tenham sido identificadas sete famílias de receptores serotoninérgicos (5-HT₁₋₇), o envolvimento no aumento da excitabilidade neuronal responsável pela hiperalgesia dá-se devido a ação direta no aferente primário via receptores 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃ (Millan, 1995) (**Fig. 1**).

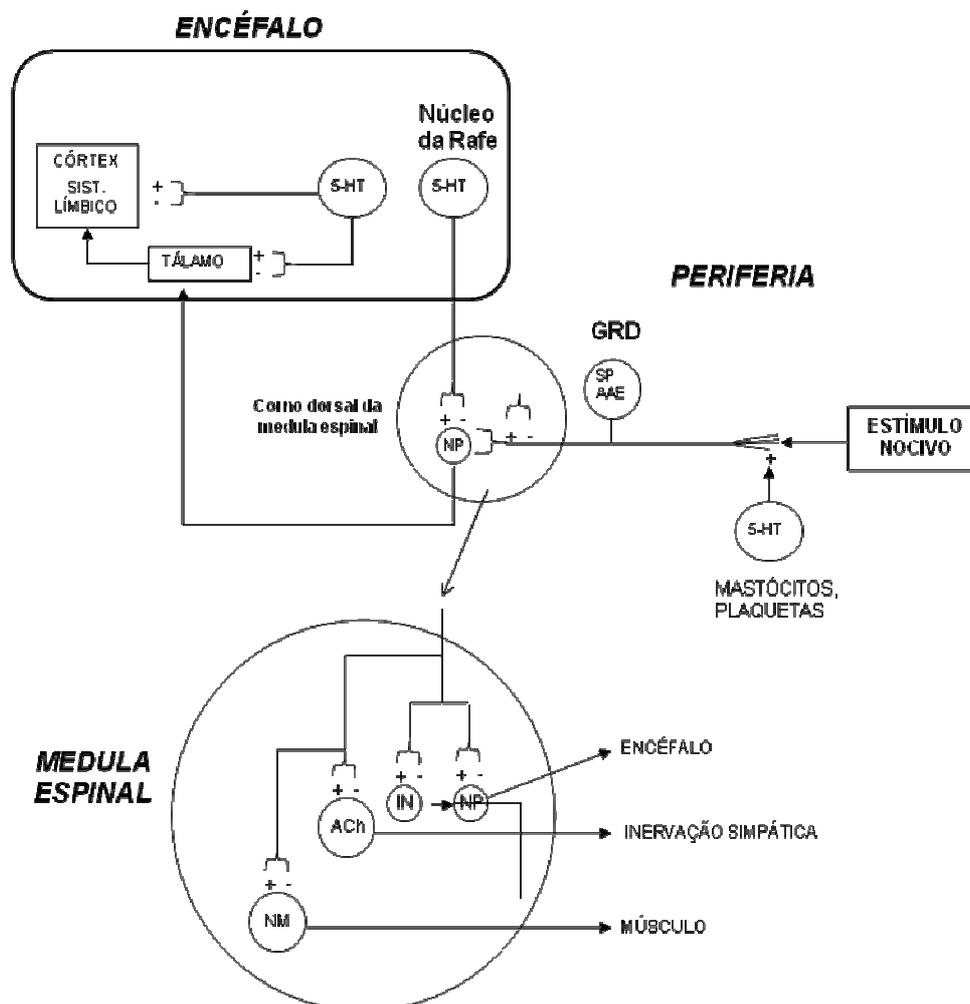


Figura 1: Esquema de organização dos mecanismos serotoninérgicos do controle nociceptivo. Os principais sítios de ação atuantes localizam-se no encéfalo, ME e periferia. No painel acima, ações de receptores externos do corno dorsal demonstram funções motoras e simpáticas. DH, corno dorsal; NP, neurônios de projeção; IN, interneurônios; SP, substância P; EAA, amino-ácido-excitatório; GRD, gânglio da raiz dorsal; Ach, neurônios colinérgicos; NM, neurônios motores. Indicações: (+) sinapse facilitatórias e (-) sinapse inibitórias. (adaptado de Millan, 1995).

Estudos têm demonstrado que a estimulação elétrica de áreas relacionadas à analgesia está associada à elevação dos níveis de serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT). A estimulação elétrica do NMR aumenta a liberação de serotonina no corno dorsal da medula, efeito esse bloqueado pelo pré-tratamento com p-clorofenilalanina, um antagonista serotoninérgico (Rocha, Lemonica *et al.* 2002).

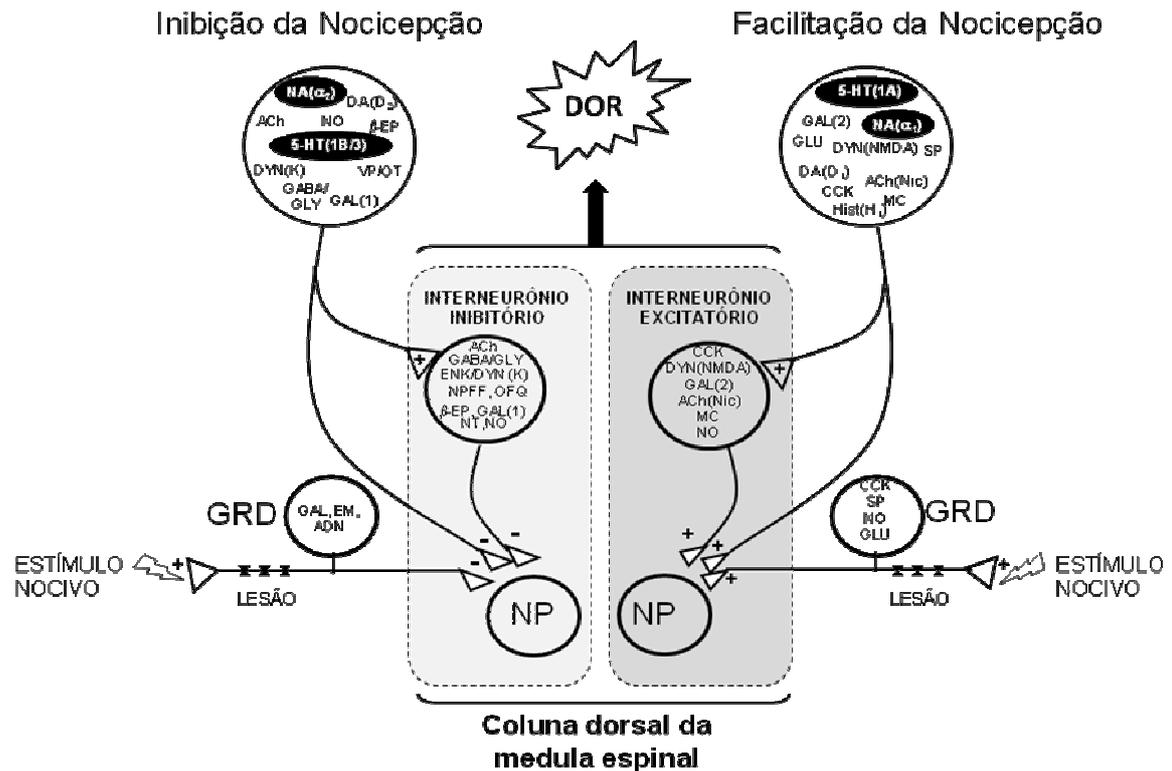


Figura 2: Múltiplos neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos na modulação da informação nociceptiva da me (ME). À esquerda, neurotransmissores que contribuem para a indução da antinocicepção (inibição descendente) e à direita neurotransmissores participantes do processo pró-nociceptivo (facilitação descendente). Os neurotransmissores participantes das vias descendentes estão presentes em núcleos supra-espinais e em interneurônios excitatórios e inibitórios na me. Diferentes sítios receptores são responsáveis pelas propriedades antinociceptivas e pró-nociceptivas. CCK, colecistoquinina; SP, substância SP; CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; GLU, glutamato; DYN, dinorfina; NMDA, N-metil-D-aspartato; MC, melanocortina; 5-HT, serotonina; NA, noradrenalina; Da, dopamina; Hist, histamina; GAL, galamina; CB, canabinóides; ADN, adenosina; EM, endorfina; Ach, acetilcolina; GABA, ácido-hydroxy-butírico; GLY, glicina; ENK, encefalina; NPFF, neuropeptídeo FF; FQ, orfamina; β-EP, endorfina; VP, vasopressina, TO, ocitocina. (*adaptado de Millan, 2002*).

Mecanismos associados à dor crônica de origem neuropática

A dor crônica de origem neuropática é definida como uma alteração do sistema sensorial decorrentes de um dano ou função anormal do SNP ou SNC (Woolf 1983; Bennett 2003; Woolf 2004; Attal and Bouhassira 2006). Em 1994, a IASP publicou, pela primeira vez, a definição de dor neuropática, como sendo dor iniciada ou causada por lesão primária ou pela disfunção do sistema nervoso. Diferentemente da dor aguda, a dor neuropática não tem função biológica protetora e é considerada por muitos pesquisadores e clínicos como uma patologia do sistema nervoso. A dor neuropática pode ser desencadeada por múltiplos fatores, tais como inflamações crônicas, quadros infecciosos (como na neuralgia pós-herpética), compressões nervosas, amputações, diabetes mellitus, alterações no sistema nervoso autônomo, dieta inadequada (excesso ou falta de vitamina B12, por exemplo), entre outros (Mendell and Sahenk 2003). É importante ressaltar que, neuropatia é termo que descreve um grupo heterogêneo de condições clínicas, as quais não podem ser explicadas simplesmente por uma lesão anatômica particular ou por patologia de causa etiológica singular. Ela pode estar ainda, associada ou não à depressão e suas manifestações físicas e emocionais são reguladas por rotas específicas do encéfalo e da ME, que também envolvem neurotransmissores noradrenérgicos e serotoninérgicos (Healy and McMonagle 1997; Delgado 2004).

Os principais sintomas clínicos são a hiperalgesia e a alodínia, devido, principalmente, às alterações ocorridas na me e podem acometer o indivíduo por períodos de dias, meses ou anos (Woolf 2004). Em alguns casos, um único mecanismo pode produzir a dor neuropática; em outros, mecanismos múltiplos podem contribuir para o seu surgimento. A maioria dos tratamentos clínicos disponíveis, farmacológicos ou não, são parcialmente efetivos. (Aley and Levine 2002; Chong and Bajwa 2003; Delgado 2004). A alodínia é a evocação da dor diante de estímulos que originalmente é inócua, o que a difere da hiperalgesia, associada ao aumento da resposta a um dado estímulo nocivo, resultando em resposta excessiva. Grande número de modelos de dor crônica que induzem a hiperalgesia e alodínia em roedores têm sido desenvolvidos, a partir da lesão nervosa periférica, e apresentam como resultados sinais comportamentais semelhantes aos sintomas da neuropatia em humanos (Fig. 4) (Kim and Chung 1992; Dray 1997; Melzack 1999; Burstein, Yarnitsky et al. 2000; Marchand, Ardid et al. 2003; Hama and Borsook 2005; Holdridge and Cahill 2007).

Entre os possíveis mecanismos da dor crônica, destacam-se processos que ocorrem no SNP como 'sensibilização periférica', ativação de nociceptores silenciosos; e no SNC a 'sensibilização central, reorganização da conectividade sináptica na me e outros sítios do SNC; e a desinibição (supressão da atividade tônica inibitória descendente e outros mecanismos antinociceptivos endógenos) (Woolf 1983; Nestler and Aghajanian 1997; Millan 1999; Woolf and Salter 2000; Millan 2002; Lee, Lee *et al.* 2005; Attal and Bouhassira 2006). As lesões ou disfunções no SN, levam à produção alterada de várias proteínas, e isso modifica o fenótipo dos neurônios do sistema nociceptivo, alterando suas propriedades de transdução, condução e transmissão nervosa. Por exemplo, o estímulo resulta na ativação de proteína quinase C (PKC) ou tirosinoquinasas, responsáveis pela fosforização de receptores NMDA, e leva a um aumento prolongado da descarga sináptica. Essas alterações podem ser mantidas por algum tempo devido as mudanças transcricionais, incluindo a indução de genes que alteram a excitabilidade dos neurônios (Nestler and Aghajanian 1997; Julius and Basbaum 2001; Lee, Lee *et al.* 2005; Attal and Bouhassira 2006). Assim, dá-se o nome de 'plasticidade neural' a capacidade dos neurônios sensoriais primários do corno dorsal da me de sofrerem mudanças em suas estruturas celulares, seu perfil químico ou sua função. (Woolf and Salter 2000; Duman 2002). As mudanças no limiar da sensibilidade à dor representam uma consequência da plasticidade neural, meios pelos quais as mudanças provocadas no SN podem modular a resposta a qualquer estímulo (Woolf and Salter 2000; Scholz and Woolf 2002).

A estimulação das fibras C após lesão dos nervos periféricos produz descargas rápidas e intensas por períodos prolongados mesmo na ausência do estímulo, fenômeno mediado por receptores NMDA, resultando no aumento da sensibilidade ao glutamato; além de fazer com que as Fibras A β que antes respondiam somente as sensações inócuas, agora por alterações do processo central dos neurônios do corno dorsal da ME passam a evocar dor (Drewes 2006).

O aumento intracelular de Ca²⁺ é um dos principais eventos após a lesão do nervo periférico; ativa quinases, eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos), 5-HT, bradicinina, a liberação de citocinas, com posterior acúmulo local de substância SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, óxido nítrico, neurotrofinas como o BDNF, e canais de sódio que juntos amplificam a excitabilidade neuronal importantes no mecanismo da dor neuropática.

Mecanismos inibitórios da transmissão do estímulo nociceptivo atuam nos segmentos medulares e a nível supra-espinhal, constituindo o chamado "sistema

analgésico endógeno”; atuantes por meio de dois sistemas de controle: facilitatório e inibitório, sendo o balanço entre os dois sistemas responsável pelo nível de excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da ME, que por sua vez pode modular a transmissão dos sinais aferentes da dor para estruturas nervosas supra-espinhais. Projeções descendentes originárias do tronco encefálico podem inibir a descarga de neurônios nociceptivos de projeção, atuando diretamente sobre eles, por inibição de interneurônios excitatórios ou por estimulação de interneurônios inibitórios. Além disso, estabelecem sinapses diretas com terminais de aferentes primários, diminuindo a liberação do glutamato e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Millan 1999; Millan 2002; Drewes 2006). A disfunção desse sistema descendente sinalizador da resposta nociceptiva é resultado do aumento da sensibilidade a dor e da reação diante de estímulos não dolorosos. Isso é demonstrado nos efeitos anti-nociceptivos pelo aumento das concentrações dos neurotransmissores 5-HT e NA, o que explica o aumento do efeito dos mecanismos analgésicos endógenos nas vias de inibição descendente através da ME e encéfalo (Woolf 2004; Drewes 2006).

Outros componentes importantes do sistema de analgesia endógena, são os neurônios noradrenérgicos, do *locus coeruleus* (Millan 2002). A via noradrenérgica tem um papel importante no sistema na modulação inibitório; os receptores α_2 -adrenérgicos encontram-se localizados em terminais de aferentes primários, periféricos e espinhais, em neurônios da lâmina superficial da ME e em vários núcleos do tronco encefálico. O *locus coeruleus* envia projeções para o córtex, hipocampo, cerebelo e ME. Os efeitos antinociceptivos do sistema noradrenérgico central parecem ser mediados somente pelos receptores α_2 adrenérgicos, uma vez que seu efeito pode ser antagonizado por bloqueadores α -adrenérgicos. Sua ação está diretamente relacionada a inibição da adenil-ciclase (Gordh, Jansson *et al.* 1989; Hood, Mallak *et al.* 1996) (Millan 2002) (Fig. 2).

Plasticidade neural associada aos mecanismos de dor crônica de origem neuropática: efeito da lesão do nervo periférico sobre a ação do fator de transcrição CREB no sistema nociceptivo.

O fator de transcrição de CREB desempenha papel importante na mediação dos efeitos do AMPc e de alguns neurotransmissores atuantes na expressão gênica pela via de ativação do AMPc (Miyabe and Miletic 2005). Essa via é ativada por sistemas dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos (Gass and Riva 2007). Recentemente, pesquisas envolvidas com fatores de transcrição relacionam-se ao mecanismo de ação dos antidepressivos (ATDs). Acredita-se que a alteração na atividade desses fatores possa estar relacionada ainda com a depressão (Gass and Riva 2007).

CREB faz parte de uma família que se liga a uma seqüência particular do DNA, destinada a funcionar como “Elemento Resposta” ao AMPc, e pode ser fosforilada por múltiplas quinases intracelulares em resposta a uma vasta rede de estímulos fisiológicos e patológicos, destacando-se pela atividade dependente da seqüência gênica. Faz parte dessa família CREM (proteína CRE-modulatória), ATF1 (ativador de transcrição do fator 1) e CRE (Song, Cao *et al.* 2005). Sua atividade é induzida em muitos tipos de células em resposta a uma variedade de sinais extracelulares em neurônios, e estes incluem neurotransmissores, neuromoduladores e fatores tróficos, como o BDNF (Miletic, Hanson *et al.* 2004) (Fig. 3). A via de ativação da proteína CREB pode desempenhar um papel importante na variedade de certas funções fisiológicas, com por exemplo, processos de aprendizagem e memória, ritmos circadianos, regulação da pituitária, espermogênese (Miyabe and Miletic 2005).

Estudos sugerem, que a ativação de CREB, pode ser, também, consequência das alterações da função sensorial induzida no corno dorsal da ME, podendo assim contribuir para a plasticidade sináptica decorrente das lesões provocadas pela dor neuropática, o que leva a alterações das funções neuronais (Miyabe and Miletic 2005).

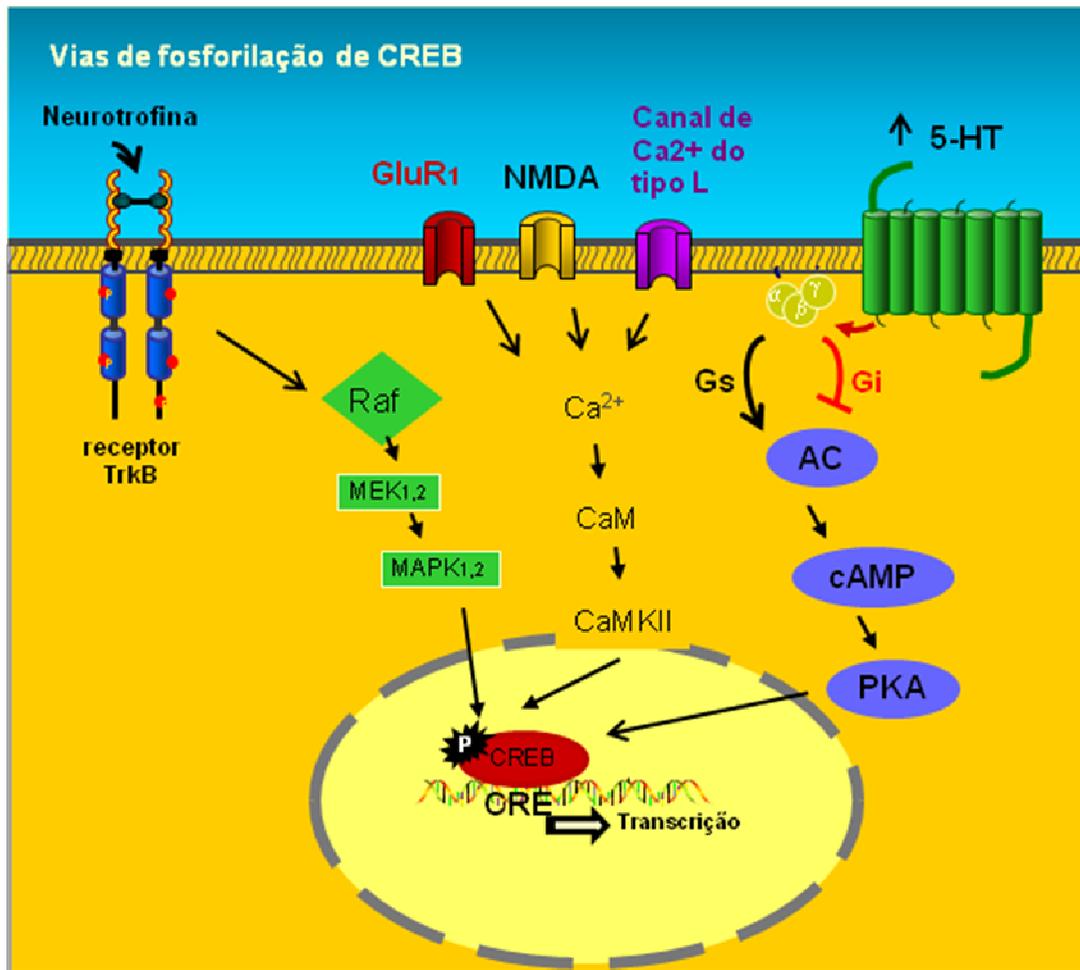


Figura 3: Vias de fosforilação da proteína CREB (fosfoCREB). A figura demonstra a cascata de receptores celulares pós-sinápticos envolvidos, como p. ex., TrkB, receptores glutamatérgicos, receptores monoaminérgicos entre outros, são considerados primeiros mensageiros. Há em aumento ou diminuição de diversos segundos mensageiros nas vias que direcionam a ativação ou inativação da transcrição de fatores como CREB, um terceiro mensageiro, qual é ativado pela fosforilação e ação das vias comandadas pelo elemento regulador CRE, como promotor de genes alvo. Do mesmo modo a representatividade de genes alvo é descrita por BDNF, embora há muitos outros conhecidos, por ex., dinorfina, fos, CRF, 5-HT, serotonina; adenil ciclase; BDNF, CaM, Ca²⁺, AMPc, TrkB.

CREB desempenha papel importante na mediação dos efeitos do AMPc e de neurotransmissores que agem na expressão gênica (pela via do AMPc). A proteína liga-se a um segmento particular do DNA denominado CRE. Alguns dos genes contêm CREs expressam ATPase, proencefalina, somatostatina, Fos, tirosina hidroxilase, etc. A fosforilação de CREB ligada ao elemento de resposta ao AMPc (CRE) tem relação com a expressão de genes reguladores mediadas pelo papel da ERK, quinase reguladora de sinais extracelulares. A ERK, é um dos membros da família MAPK (*protein kinase mitogen-activated*), responsável por uma ampla escala de estímulos extracelulares e diversas respostas intracelulares envolvidas na transcrição ou expressão gênica (Song, Cao *et al.* 2005).

Aumentos na fosforilação da CREB acontece, tanto em modelos de dor inflamatória, quanto na hiperalgesia neuropática. (Wu, Fang *et al.* 2002; Ji, Kohno *et al.* 2003) (Bement and Sluka 2007) (Miyabe and Miletic 2005). CREB parece também contribuir com a sensibilização central associada com o estado de dor persistente, e isso pode ser proposto pela ativação dos canais NMDA por influxo de Ca^{2+} , o que pode levar a antecipação da fase da fosforilação dessa proteína; sendo a permanência desse efeito decorrente da liberação de uma casacata de reações extracelulares promovidas por ERK (Song, Cao *et al.* 2005). O aumento de amino-ácidos excitatórios, podem levar a ativação desses receptores NMDA e a sinalização de vias associadas a sensibilização central e a dor neuropática resultando no aparecimento de alodínia (Crown, Ye *et al.* 2005).

Miyabe and Miletic (2005), observaram a partir de estudos em modelos animais que a ativação inicial da fase de fosforilação de CREB dá-se significativamente no corno da raiz dorsal da ME obtida pela lesão do nervo ciático, sendo mediada pelas Kinases: PKA, PKC e ainda CaMKII (cálcio/calmodulina), destacando-se a via ERK_{1/2}; o que sugere que a ativação das vias de múltiplas kinases pode ser importante nos estágios iniciais da plasticidade obtida pela lesão nervosa na ME. Resultados apoiados por vários estudos recentes que relatam o envolvimento das kinases na lesão periférica associada a alterações da função sensorial do corno dorsal da ME (Miyabe and Miletic 2005).

Mecanismos de ação de antidepressivos tricíclicos no tratamento da dor crônica

Atualmente, o tratamento da dor neuropática varia conforme a doença precedente e o estágio em que esta se encontra, tendo como objetivo tratar especificamente do nervo ou da patologia que está lesando o mesmo, ou então da dor decorrente dessas lesões, visando somente o alívio dos sintomas. O efeito dos antidepressivos em diferentes modelos experimentais de dor neuropática tem sido desenvolvido para testar e comparar diferentes tipos de fármacos, visando um melhor entendimento dos mecanismos de ação e determinação do envolvimento de neurotransmissores específicos associados a eles (Coluzzi and Mattia 2005; Saarto and Wiffen 2005; Colombo, Annovazzi *et al.* 2006; Mico, Ardid *et al.* 2006).

Os tricíclicos foram inicialmente utilizados como anti-psicóticos, cuja ineficácia para este fim foi comprovada posteriormente. Na década de 50 passaram a ser utilizados, empiricamente, como antidepressivos sendo que, somente em 1965, foi proposta a teoria das monoaminas sobre as origens bioquímicas da depressão por déficit de noradrenalina, dopamina e 5-HT (Millan 1999). Durante várias décadas, os IRSN foram aceitos como fármacos de efeitos puramente antidepressivos e não faziam parte dos medicamentos considerados analgésicos. Mais tarde, tendo sua atuação comprovada no combate à dor crônica passaram a ser utilizados como antiálgicos no tratamento da dor neuropática (Eisenach and Gebhart 1995; Dickinson, Lee *et al.* 2003; Obata, Saito *et al.* 2005; Saarto and Wiffen 2005; Colombo, Annovazzi *et al.* 2006; Mico, Ardid *et al.* 2006).

A maioria dos ADTs exerce suas funções por meio do bloqueio dos sítios de recaptação da 5-HT e/ou NA (Hyman and Nestler 1996; Berton and Nestler 2006). Esses dois importantes neurotransmissores, em conjunto com seus respectivos receptores, têm ação aumentada na regulação da informação dolorosa processada em diferentes níveis do SN, pela atividade exercida pelos antidepressivos no bloqueio dos receptores 5-HT. Contudo, apresentam múltiplos sítios de ação que podem produzir efeito anti-nociceptivo em sítios periféricos, espinais e supra-espinais (Bomholt, Mikkelsen *et al.* 2005).

Os ADTs dividem-se em quatro grupos principais: antidepressivos tricíclicos (TCAs), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da recaptação da monoaminaoxidase (MAO) e antidepressivos atípicos.

Os TCAs são drogas de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática. São exemplos de TCAs a imipramina, a nortriptilina, a clomipramina, a doxepina, a amitriptilina e a fluoxetina, (Ghelardini, Galeotti *et al.* 2000; Chong and Bajwa 2003;

Delgado 2004; Saarto and Wiffen 2005; Colombo, Annovazzi *et al.* 2006; Mico, Ardid *et al.* 2006; Jann and Slade 2007). Sabe-se muito pouco sobre os efeitos intracelulares envolvidos nos mecanismos de ação analgésica dos antidepressivos tricíclicos. Galeotti (2001) demonstrou que a modulação neuronal dos canais de K⁺ é uma etapa essencial na indução de analgesia por meio de TCAs.

A imipramina, um antidepressivo tricíclico, age bloqueando os transportadores de membrana dos neurônios pré-sinápticos que captam as monoaminas neurotransmissoras, aumentando a atividade dos neurônios pós-sinápticos ao permitir que esses neurotransmissores atuem por mais tempo na fenda sináptica (Jackson 2006).

A ação dos TCAs parece afetar a transmissão da dor por meio de múltiplos mecanismos que incluem a inibição de diferentes proporções da recaptação na membrana pré-sináptica de serotonina e noradrenalina, em sítios receptores periféricos e centrais. De um modo geral, o resultado é um aumento de neurotransmissores na fenda sináptica da ME, projeções encefálicas e neurônios do GRD, que se dá devido ao bloqueio da recaptação da NA e da 5HT no neurônio pré-sináptico, ou ainda através da inibição da Monoaminaoxidase (MAO), que é a enzima responsável pela inativação destes neurotransmissores. Esse efeito parece ser controlado apenas por aminas terciárias, que promovem tanto a inibição da 5-HT quanto da NA. Em paralelo, aminas secundárias provêm maior recaptação de NA (Mico, Gibert-Rahola *et al.* 1997; Jackson 2006; Benbouzid, Choucair-Jaafar *et al.* 2008).

Outras possibilidades de ação dos TCAs incluem: bloqueio α -adrenérgico; efeito anti-colinérgico; inibição da recaptação de dopamina; modulação da ação de neurotransmissores e neuromoduladores como ácido gama-aminobutírico (GABA)-B, adenosina, potássio, cálcio; e mais importante, atuação sobre canais bloqueadores de sódio e receptores antagonistas NMDA (McCarson, Ralya *et al.* 2005). Logo, a atuação dos ADTs pode envolver múltiplos mecanismos ao longo das vias de condução da dor, de modo que suas propriedades analgésicas poderiam ser independentes de suas propriedades antidepressivas (Jackson 2006; Mico, Ardid *et al.* 2006; Benbouzid, Choucair-Jaafar *et al.* 2008).

II. OBJETIVOS

1. Investigar o efeito do uso crônico de inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina (imipramina) no tratamento da alodinia e hipernocicepção provocadas pela lesão de nervo periférico.
2. Observar o efeito do uso crônico de inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina sobre o estado de fosforilação da proteína CREB em neurônios da coluna dorsal da medula espinal após o desenvolvimento de neuropatia.
3. Observar o efeito da interrupção do uso crônico de inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina sobre a alodínia mecânica, a hipernocicepção térmica e a fosforilação da proteína CREB.

III. Material e métodos

Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos da linhagem Balb/C com peso entre 20–25g. Os animais foram mantidos no Biotério do departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com temperatura e umidade controlados, mantendo ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com livre acesso a ração e água.

Aspectos éticos sobre o uso de animais de experimentação:

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética sobre o uso de animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade da São Paulo (processo # 213/2005). Os protocolos experimentais descritos neste processo também seguem as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O uso de animais neste trabalho é imprescindível por não existirem métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, ou sistemas biológicos *in vitro* que reproduzam a complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos a serem investigados.

Modelo experimental de neuropatia periférica

Os camundongos foram submetidos a cirurgias para lesão parcial do nervo isquiático baseadas no modelo de Seltzer (Seltzer *et al.*, 1990). Este modelo consiste em modelo experimental de neuropatia periférica pela da ligação parcial e unilateral do nervo periférico isquiático (Basbaum 1998; Seltzer *et al.*, 1990) (**Fig. 4**).

Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com ketamina (0,3 ml i.p.) e xilazina (0,1 ml i.p.). O nervo isquiático esquerdo foi exposto na região glútea e aproximadamente metade do nervo foi fortemente ligado com fio de sutura de algodão não absorvível 8-0. A musculatura sobre o nervo foi suturada e a pele fechada com grampo metálico. Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento para prevenir a hipotermia e, em seguida, recolocados no biotério de manutenção. Este modelo determina uma síndrome com sinais de aumento da sensibilidade somática a estímulos não nociceptivos e nociceptivos, que clinicamente caracterizam alodínia e

hiperalgesia, respectivamente. Estes sinais iniciam-se 24-48 horas após a lesão do nervo periférico, perdurando por um período de até 3 meses (Basbaum 1998; Seltzer *et al.*, 1990). Animais controle foram submetidos somente a abertura da pele e da musculatura sobre o nervo isquiático. A figura 4 ilustra os diferentes modelos experimentais de dor neuropática de origem periférica.

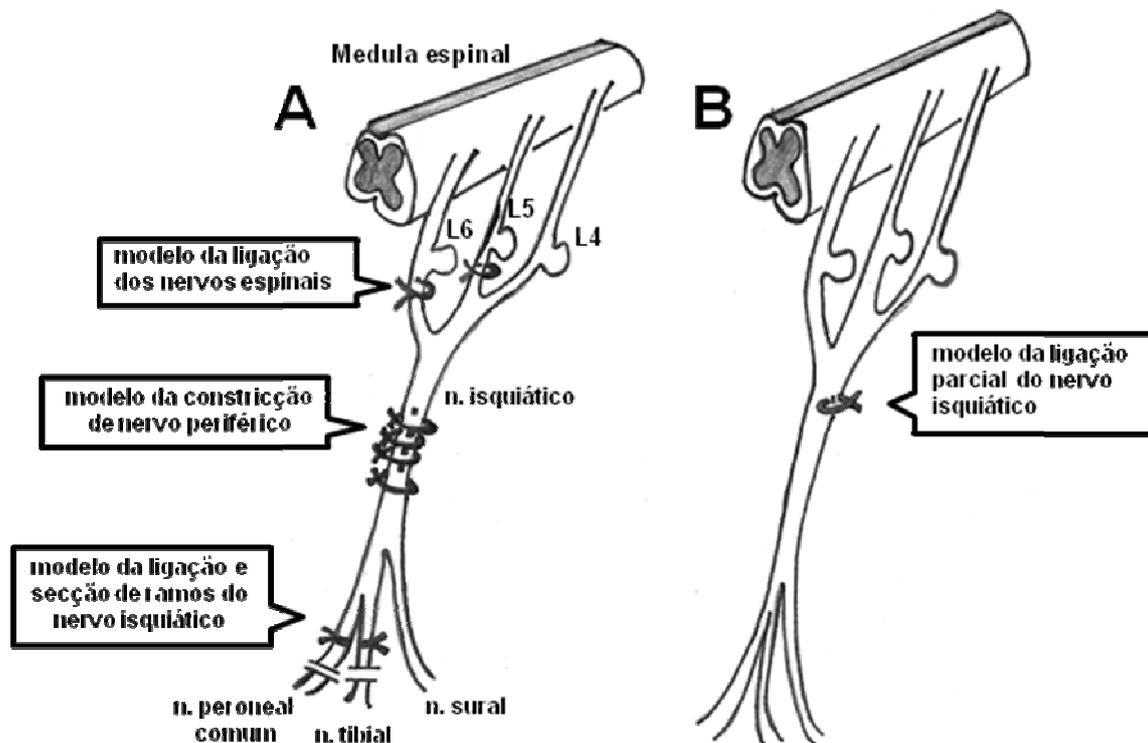


Figura. 4: Os modelos mais usados de dor crônica de origem neuropática baseiam-se em lesões mecânicas de segmentos periféricos do sistema nervoso. Em (A), destacam-se os modelos de ligação completa dos nervos espinais e de ramos do nervo isquiático, ou ainda a ligação frouxa no nervo isquiático; em (B) está representado o modelo de ligação parcial do nervo isquiático (*adaptado de Ueda e Inoue, 2001*).

Análise comportamental

Os estudos comportamentais foram realizados entre 9 e 16 horas e os animais submetidos a um único teste.

Monitoramento da sensibilidade mecânica:

O teste comportamental para avaliação do limiar de sensibilidade mecânica baseou-se no método de Dixon, adaptado para camundongos. Para a realização desse teste, os camundongos são acomodados em gaiolas suspensas com piso de grade, a fim de possibilitar o acesso à superfície plantar dos animais (**Fig 5**). O teste consiste da utilização de filamentos de *nylon* com 9 diâmetros diferentes, responsáveis por empregar intensidades de força, igualmente, distintas, variando, em ordem crescente, de 1,62 mN a 35,59 mN. Assim, os filamentos foram aplicados na superfície plantar da pata esquerda, começando, sempre, pela aplicação do 5º filamento. Uma resposta é considerada positiva se o animal retira a pata ao estímulo mecânico e negativa, se isso não ocorre. Assim, uma série de respostas (positivas e/ou negativas) é iniciada, somente quando uma primeira resposta for negativa e a segunda positiva. Isso indica que o limiar de sensibilidade mecânica daquele animal deve estar entre as forças aplicadas por esses 2 filamentos. A partir deste primeiro conjunto de resposta, negativa/positiva, são registradas mais quatro respostas, sendo sempre respeitado o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (força) imediatamente inferior, enquanto uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo imediatamente superior. Assim, o limiar de retirada da pata do animal foi determinado observando o padrão de 6 respostas que é avaliado no cálculo:

$$50\% g = 10^{[X_f + K \cdot \Delta]}$$

Sendo que X_f é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10. K é o valor da sequência de seis respostas cujos dados foram retirados da tabela. Δ é a média da diferença (em log) entre os filamentos.

Os testes de sensibilidade mecânica foram, então, realizados para a determinação da resposta basal de cada animal, antes de qualquer intervenção e após as intervenções cirúrgicas para lesão efetiva ou fictícia do nervo isquiático, ou ainda, para avaliação do efeito da administração de imipramina ou salina. Nos casos de administração de imipramina ou salina, o teste plantar foi realizado, tanto imediatamente antes da administração da droga, quanto 24 h após a injeção de imipramina.



Figura 5: Aparato utilizado para acomodar os animais na realização do teste de sensibilidade estímulos mecânicos.

Monitoramento do desenvolvimento de hipernocicepção:

O teste de estimulação térmica tem como objetivo monitorar o aparecimento de hipernocicepção após lesão do nervo periférico e avaliar os efeitos da administração de imipramina. O teste de sensibilidade térmica foi realizado por meio do aparelho *HTC 390 Plantar Test Analgesia Meter* (**Fig. 6**). O teste consiste da acomodação do animal em superfície transparente através da qual um estímulo nociceptivo térmico é aplicado por uma fonte constante de aquecimento por radiação. Assim, é medida a latência para a retirada da pata, ipsilateral à lesão, em resposta ao estímulo térmico. O estímulo nociceptivo será aplicado 3 vezes na superfície plantar da pata com intervalos de 5 min e a média será calculada para cada animal. Estipulou-se, arbitrariamente, que o tempo máximo de aplicação do estímulo térmico seria de 20 segundos. Após esse tempo o aparelho interrompia, automaticamente, a emissão do feixe de luz a fim de evitar lesões na pata do animal.



Figura 6: Animais durante a realização dos testes de sensibilidade ao estímulo térmico.

Imunodeteção de proteína e de seu resíduo fosforilado

Para a imunodeteção da proteína CREB e seu resíduo fosforilado, foram obtidos extratos proteicos totais da coluna dorsal da medula espinal lombar (L₄-L₆) homogeneizados em tampão contendo 137mM NaCl, 20mM Tris, pH 8,0, 1% de NP-40, 0,105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e de fosfatases (NaF e Na₃VO₄). Após homogeneização, os tecidos foram mantidos a 4°C por 20 min e centrifugados a 13.000 rpm por 15 min. O sobrenadante e o precipitado foram separados e a quantidade de proteína total determinada pelo método de Lowry em cada uma das amostras. Amostras contendo 0,5 mg de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 10% SDS (SDS-PAGE) e transferidas eletricamente para membrana de PVDF. A detecção das proteínas no citosol foi feita por incubações sequenciais do anticorpo primário e do secundário seguidas pela revelação através do método de quimioluminescência. Anticorpos anti-CREB, anti-fosfoCREB serão usados para a análise da expressão e fosforilação da proteína. Os filtros foram quantificados por sistema de análise de análise de imagem.

Imunohistoquímica

Perfusão transcárdica para fixação do tecido: os animais foram submetidos à perfusão transcárdica para a fixação dos tecidos que foram retirados e posteriormente utilizados nos experimentos de imunohistoquímica para a forma fosforilada de CREB.

Os animais foram inicialmente anestesiados com hidrato de cloral (30%) 10 µl/g e pH 7.5. Posteriormente, com o auxílio de uma bomba de perfusão, foram perfundidos com 5 ml de solução tampão fosfato (PBS) e, em seguida, com uma solução de paraformaldeído (4%), ambos em temperatura ambiente. Em seguida, receberam 60 ml de paraformaldeído a temperatura de 4 °C. Imediatamente após a perfusão, foi retirado parte da medula espinal, correspondente aos os segmentos lombar entre L₄ e L₆. Este material foi pós-fixado por 1 hora em solução de paraformaldeído 4% e depois mantidos em paraformaldeído 4% acrescido de sucrose 10% a 4°C por 24 h. No dia seguinte, as amostras foram transferidas para solução tampão contendo sucrose 20% a 4°C, por mais 24 h. Em seguida, os tecidos foram emblocados em *Tissue TEK* e armazenados a uma temperatura de -70 °C para a preparação dos cortes histológicos.

Os tecidos foram cortados em criostato na espessura de 40 µm. O material coletado foi armazenado em placas contendo tampão fosfato (PBS) e timerosol, a temperatura de 4°C, para aguardar a preparação da reação de imunoperoxidase.

Seleção dos cortes histológicos: a seleção dos cortes para imunohistoquímica foi feita de forma aleatória, sistemática e uniforme a fim de se obter uma estimativa, sem viés, do número de total de células imunorreativas da região de interesse (L₄-L₆), chamada aqui de espaço-referência. Assim, o número total de cortes de um animal foi dividido pelo número de cortes desejados. No nosso estudo, estipulamos, arbitrariamente, que seriam selecionados 12 cortes do espaço-referência de cada medula espinal. Então o número total de cortes foi dividido por 12, obtendo, assim um valor *X*. Para garantir que a amostra é aleatória, um número, aleatório foi escolhido no intervalo de 0 a *X*. Por exemplo, se o número total de cortes de uma amostra foi 156, o valor *X* será de 13 (156/12). Nesse exemplo, o primeiro corte seria um número escolhido aleatoriamente entre 0 e 13. Então, se o número escolhido fosse 11, o primeiro corte seria o 11º, o segundo corte seria o 22 (11 + 11), o terceiro corte seria o 33º (22 + 11) e assim sucessivamente. Nesse exemplo, os cortes 11, 22, 33, 44, 55, 66, 77, 88, 99, 110, 121 e 132 constituiriam a amostra aleatória e sistemática de cortes, teoricamente sem viés, dentro do espaço-referência.

Imunodeteccção da proteína fosfoCREB: os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados pela técnica de *free-floating*. No primeiro dia de reacção os tecidos foram inicialmente lavados 3 vezes, por 10 min em PBS pH 7.4%. Em seguida, o material sofreu processo de permeabilização pela incubação com 0,2% Triton X-100, seguido de PBS pH 7.4, por 10 minutos. Os cortes então foram lavados com solução de peróxido de hidrogénio 30%, por 10 minutos. Para serem incubados com o anticorpo primário, os tecidos passavam por uma solução de bloqueio onde eram lavados 1vez por 30 minutos em 0.2% Triton X – 100 (100µl/100 ml), 5% soro normal de cabra, em pH 7,4, na diluição de 1:300. Em seguida, era preparada uma solução: mix Tris pH 7.4, soro normal de cabra 2%, 0,2% Triton X-100 (100µl in 50ml), onde foi adicionado o anticorpo primário, anti-fosfoCREB (Ser 133), monoclonal e feito em coelho, na proporção de 1:50 e incubados, em agitação, por 48 h a 4°C.

No segundo dia de reacção, os tecidos foram inicialmente lavados 3 vezes, por 10 min em PBS pH 7.4% e em seguida incubados em solução do anticorpo secundário, biotinilado anti IgG de coelho, na concentração de 1:300, em PBS-Triton, pH 7.4 e 2% de soro normal de cabra por 45 minutos. Após três novas lavagens em PBS, os cortes foram incubados no complexo ABC (Vector, CA, EUA) durante 45 min, em agitação, e em seguida lavados novamente em PBS. O complexo formado foi visualizado pela adição do substrato da peroxidase, tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Em contato com a peroxidase, o DAB é precipitado e apresenta coloração marrom. Assim, o núcleo das células que apresentaram imunorreatividade para fosfoCREB desenvolveram esta coloração. Por último, os cortes foram montados em lâminas para análise em microscópio e documentação fotográfica (Fig. 7).

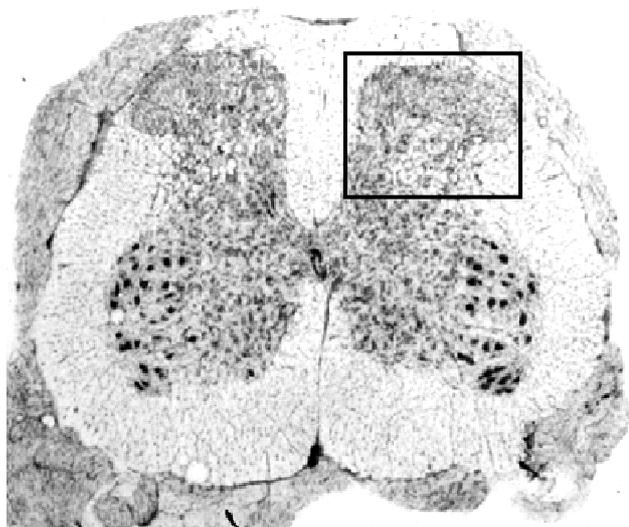


Figura 7: Demarcação da região onde foi realizada a análise microscópica da proteína CREB na coluna dorsal da medula espinal.

Protocolos experimentais

Análise comportamental do efeito do tratamento crônico com IRSN nos animais com lesão de nervo periférico.

No 7º dia após lesão do nervo isquiático ou da lesão fictícia do nervo, os animais foram divididos em grupos de 8 e passaram a ser tratados diariamente com inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina (imipramina) ou com seu veículo (salina) de acordo com os grupos abaixo.:

Grupo I: animais que sofreram lesão do nervo periférico e receberam doses diárias de 5 mg/kg, i.p., de imipramina por 21 dias.

Grupo II: animais que sofreram lesão do nervo periférico e receberam doses diárias de 10 mg/kg, i.p., de imipramina por 21 dias.

Grupo III: animais que sofreram lesão do nervo periférico e receberam doses diárias de 30 mg/kg, i.p., de imipramina por 21 dias.

Grupo IV: animais que sofreram lesão do nervo periférico e receberam doses diárias de salina por 21 dias.

Grupo V: animais submetidos a lesão fictícia e que receberam doses diárias de imipramina 5 mg/kg, i.p. por 21 dias.

Grupo VI: animais submetidos a lesão fictícia e que receberam doses diárias de imipramina 10 mg/kg, i.p., de imipramina por 21 dias.

Grupo VII: animais submetidos a lesão fictícia e que receberam doses diárias de 30mg/kg, i.p., de imipramina por 21 dias.

Grupo VIII: animais submetidos a lesão fictícia, que receberam doses diárias de veículo (salina) por 21 dias.

Nesses grupos, foi monitorada resposta do animal aos estímulos mecânico e térmico antes da lesão, no 7º dia após a lesão, durante os 21 dias de tratamento e durante 3 semanas após a interrupção do tratamento. O quadro abaixo ilustra o perfil temporal deste protocolo.

Grupo III: animais que sofreram lesão do nervo periférico e no 7º dia após a cirurgia receberam uma injeção de imipramina (30 mg/kg), i.p.. Esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída 30 min após a injeção.

Grupo IV: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e no 7º dia após a cirurgia receberam uma injeção de imipramina (30 mg/kg), i.p.. Esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída 30 min após a injeção.

Grupo V: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e que foram tratados com injeções diárias de salina, i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída.

Grupo VI: animais que sofreram lesão do nervo periférico e que foram tratados com injeções diárias de salina, i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída.

Grupo VII: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e que foram tratados com injeções diárias de imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída.

Grupo VIII: animais que sofreram lesão do nervo periférico e que foram tratados com injeções diárias de imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção esses animais tiveram a coluna dorsal da medula espinal extraída.

Análise imunohistoquímica da distribuição da forma fosforilada de CREB na coluna dorsal da medula espinal após lesão de nervo periférico e o efeito do tratamento com IRSN.

Para a análise da distribuição laminar da forma ativa da proteína CREB, os animais foram divididos em 8 grupos, conforme descrição abaixo:

Grupo I: animais que sofreram lesão do nervo periférico e no 7º dia após a cirurgia eles foram perfundidos para análise histológica.

Grupo II: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e no 7º dia após a cirurgia eles foram perfundidos para análise histológica.

Grupo III: animais que sofreram lesão do nervo periférico e no 28º dia após a cirurgia eles foram perfundidos para análise histológica.

Grupo IV: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e no 28º dia após a cirurgia eles foram perfundidos para análise histológica.

Grupo V: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com salina, i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo VI: animais que sofreram lesão do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com salina, i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo VII: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo VIII: animais que sofreram lesão do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Vinte e quatro horas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo IX: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com salina, i.p., por 21 dias. Três semanas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo X: animais que sofreram lesão do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com salina, i.p., por 21 dias. Três semanas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo XI: animais que sofreram lesão fictícia do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Três semanas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Grupo XII: animais que sofreram lesão do nervo periférico e a partir do 7º dia após a cirurgia foram tratados com imipramina (30 mg/kg), i.p., por 21 dias. Três semanas após a última injeção os animais foram perfundidos para análise histológica.

Análise estatística dos dados comportamentais:

Nos experimentos comportamentais, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A análise dos filtros de *western blot* foi feita pelo teste-*t* de *Student*. As diferenças foram consideradas significativas quando *P* foi menor que 0.05.

IV. RESULTADOS

Efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a hipersensibilidade ao estímulo mecânico induzido pela lesão parcial do nervo isquiático.

Como esperado, todos os animais desenvolveram hipersensibilidade ao estímulo mecânico no 7º dia pós-lesão e essa alteração de sensibilidade perdurou por até 49 dias após a cirurgia. Os animais com lesão fictícia não apresentaram qualquer alteração nos limiares de resposta ao estímulo mecânico durante todo o período estudado (Fig. 8A e B). Por outro lado, os animais tratados cronicamente com imipramina apresentaram respostas comportamentais iguais aos valores basais no 21º dia de tratamento, independente da dose usada (Fig. 8A). Além disso, o uso persistente de imipramina não alterou o limiar de resposta ao estímulo mecânico nos animais com lesão fictícia (Fig. 8B).

Observamos, ainda, que no grupo que recebeu 30 mg/kg de imipramina, o efeito antinociceptivo perdurou por, pelo menos, mais 3 semanas após a interrupção do tratamento. Esses resultados indicam a eficiência do tratamento crônico do inibidor da recaptação de serotonina/noradrenalina, o qual contribuiu para a redução significativa da hipersensibilidade mecânica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático em camundongos.

Nos animais com lesão fictícia, nenhuma das doses de imipramina (5mg/Kg i.p., 10 mg/Kg i.p. e 30mg/Kg i.p.), modificou o limiar de resposta ao estímulo mecânico, sugerindo que o efeito antinociceptivo da imipramina é decorrente de mudanças nos sistema nervoso, decorrentes da lesão do nervo periférico. A interrupção do tratamento com IRSN nos animais com lesão fictícia, também, não provocou qualquer alteração no limiar de resposta ao estímulo mecânico (Fig. 8B).

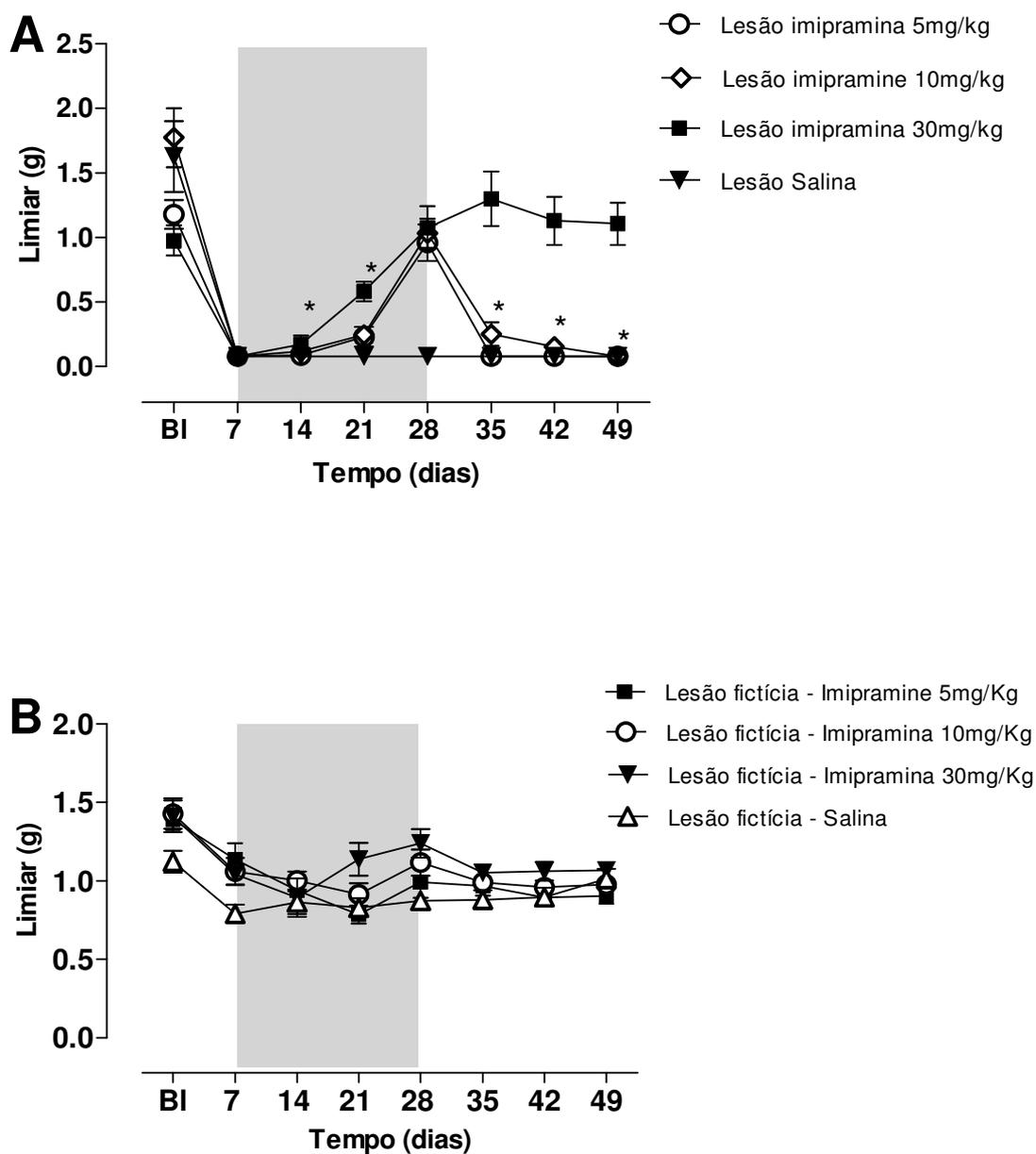


Figura 8: (A) Efeito da administração crônica (21 dias) com diferentes doses de imipramina sobre a hipersensibilidade mecânica induzida após lesão parcial do nervo isquiático. (B) Efeito da administração crônica (21 dias) de diferentes doses de imipramina, 5 mg; 10mg e 30mg sobre a hipersensibilidade mecânica induzida após lesão fictícia do nervo isquiático. Em ambos os gráficos no 29º dia houve a interrupção do tratamento com imipramina e nos 35º, 42º e 49º os animais foram submetidos ao teste de estimulação mecânica, neste período de 21 dias de tratamento não houve alteração da sensibilidade apresentada com relação ao basal. Animais tratados com inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina ($n = 8/\text{grupo}$; $* p < 0.01$ comparado com valor basal, BL, antes da lesão; teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Cada quadrado representa a média \pm erro padrão da média.

Efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a hipernocicepção térmica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático.

Os animais submetidos à lesão do nervo periférico desenvolveram hipernocicepção no 7º dia pós-lesão e esta redução da latência para o estímulo nociceptivo foi observada até o 49º dia após a cirurgia (**Fig. 9A**). Nos animais com neuropatia periférica, o uso crônico das 3 diferentes doses de imipramina foi eficaz no tratamento da hipernocicepção induzida pela lesão (**Fig. 9A**).

Após a interrupção do tratamento, foram realizados testes comportamentais no 35º, 42º e 49º dia após a lesão. Semelhante ao resultado apresentado no teste de sensibilidade mecânica, o efeito da droga persistiu após o fim do tratamento, perdurando por mais tempo nos animais que receberam a dose mais alta de imipramina (30mg/Kg i.p.) (**Fig. 9A**). Notamos, ainda, que imipramina não exerceu qualquer efeito sobre a sensibilidade térmica nos animais com lesão fictícia (**Fig. 9B**).

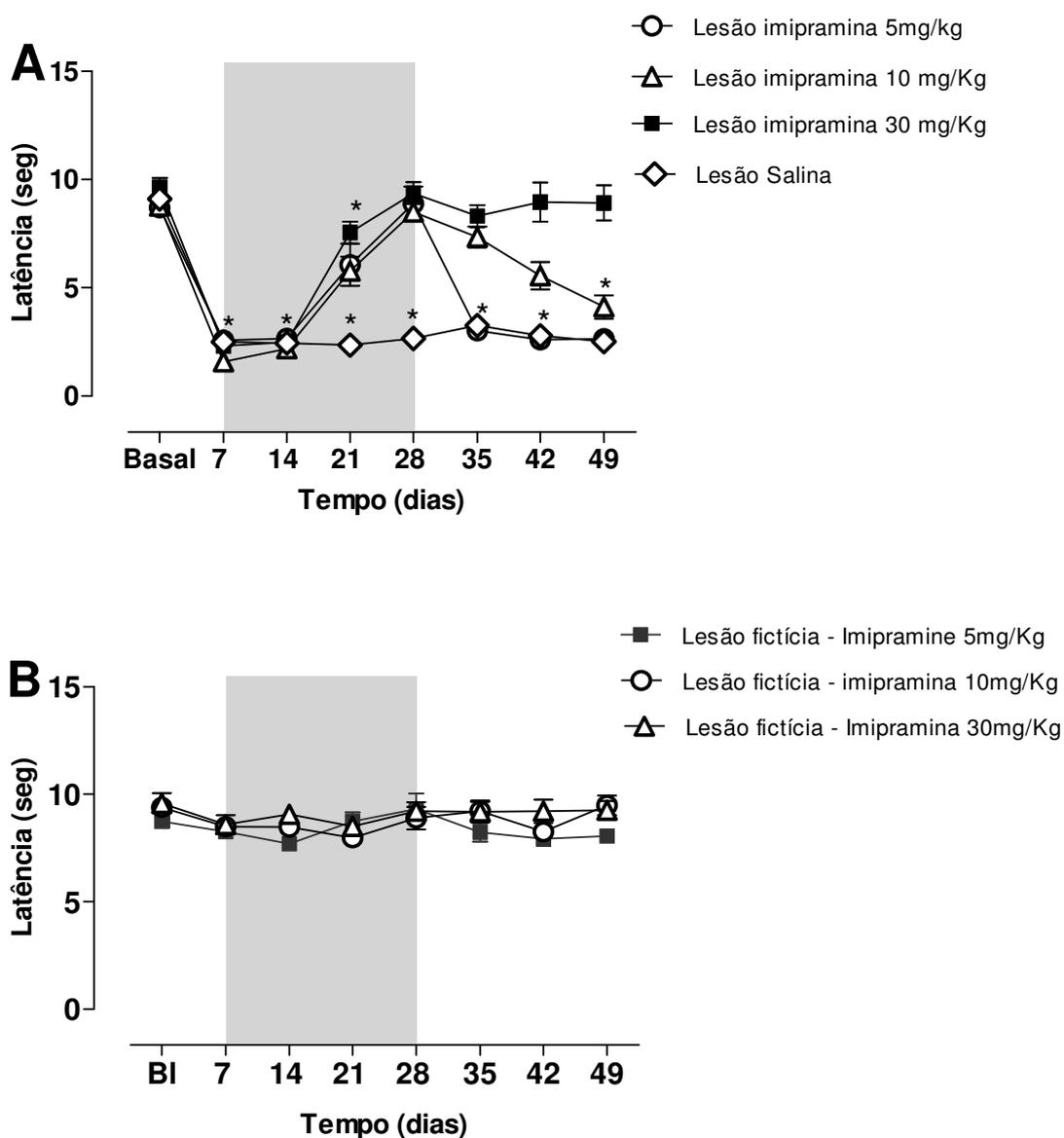


Figura 9: (A) Efeito da administração crônica (21 dias) de diferentes doses de imipramina sobre a hipernocicepção térmica induzida após lesão parcial do nervo isquiático. No 29º houve a interrupção do tratamento com imipramina e no 35º, 42º e 49º os animais foram submetidos ao teste de hipernocicepção térmica, neste período de 21 dias pós-tratamento não houve alteração da sensibilidade apresentada com 28 dias e com 49 dias. Todos os grupos foram realizados a lesão parcial do nervo isquiático para comparação da hipersensibilidade mecânica pelo período de 49 dias. (B) Efeito da administração crônica (21 dias) de diferentes doses de imipramina, 5 mg, 10 mg e 30 mg sobre a hipernocicepção térmica induzida após lesão fictícia do nervo isquiático. No 29º houve a interrupção do tratamento com imipramina e no 35º, 42º e 49º os animais foram submetidos ao teste de hipernocicepção térmica, neste período de 49 dias de tratamento não houve alteração da sensibilidade apresentada com relação ao basal. Os animais foram tratados com inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina apresentaram uma reversão progressiva da hipersensibilidade mecânica ($n = 8/\text{grupo}$; * $p < 0.01$ comparado com valor basal, BL, antes da lesão; teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Cada símbolo representa a média \pm erro padrão da média. A área cinza representa o tempo de tratamento.

Efeito agudo da administração crônica de imipramina sobre a hipersensibilidade mecânica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático.

Avaliamos o efeito agudo do tratamento crônico com imipramina, tanto nos animais com lesão efetiva, quanto naqueles com lesão fictícia (**Fig. 10**). Nossos resultados mostram que imipramina não exerce qualquer efeito antinociceptivo quando administrada agudamente, e que o uso crônico desse fármaco, também não altera o efeito agudo do composto sobre o sistema nociceptivo (**Fig. 10**).

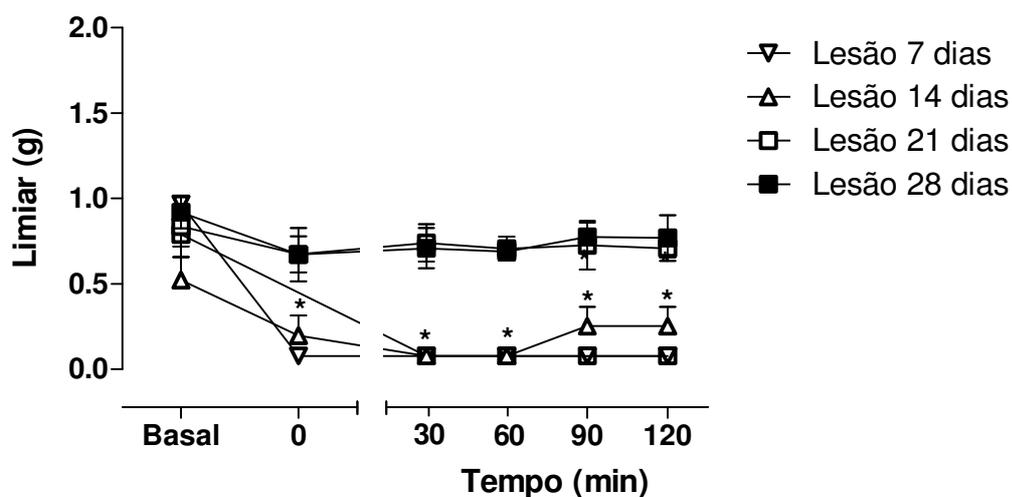


Figura 10: Efeito agudo da administração crônica (21 dias) de imipramina (30 mg/Kg ip) sobre a hipersensibilidade mecânica induzida após lesão parcial do nervo isquiático. Comparação da análise comportamental realizada antes da administração de imipramina com a resposta após as injeções aguda da droga com 7 dias (azul), 14 dias (laranja), 21 dias (verde) e 28 dias (rosa) após a lesão. Os animais foram tratados com inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina, porém não apresentaram efeito agudo durante a administração crônica ($n = 8/\text{grupo}$; $* p < 0.01$ comparado com valor basal, BL, antes da lesão; teste não-paramétrico de Mann-Whitney). Cada quadrado representa a média \pm erro padrão da média.

Análise quantitativa do estado de fosforilação de CREB na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão de nervo periférico e o efeito do tratamento crônico com IRSN.

Os segmentos da medula espinal entre L₄ e L₆ recebem os aferentes sensoriais dos dermatômos testados para sensibilidade mecânica. Extratos da coluna dorsal da medula espinal deste segmento, em camundongos com lesão fictícia, revelam pelas reações de *imunoblot*, uma banda de 45 kDa, correspondente à forma fosforilada de CREB (**Fig. 11**). Nos animais submetidos à ligação parcial do nervo isquiático há um aumento, significativo, de fosfoCREB 7 dias após a lesão ($p < 0,001$, teste-*t* de Student). Os animais com lesão fictícia tratados agudamente com imipramina, também apresentaram um aumento no estado de fosforilação de CREB, quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$, teste-*t* de Student) (**Fig. 11**). Animais lesados e tratados com imipramina, também apresentaram um aumento da atividade de CREB ($p < 0,001$, teste-*t* de Student). Entretanto, esse aumento não foi diferente daquele observado nos animais lesados, tratados com salina (**Fig. 11**)

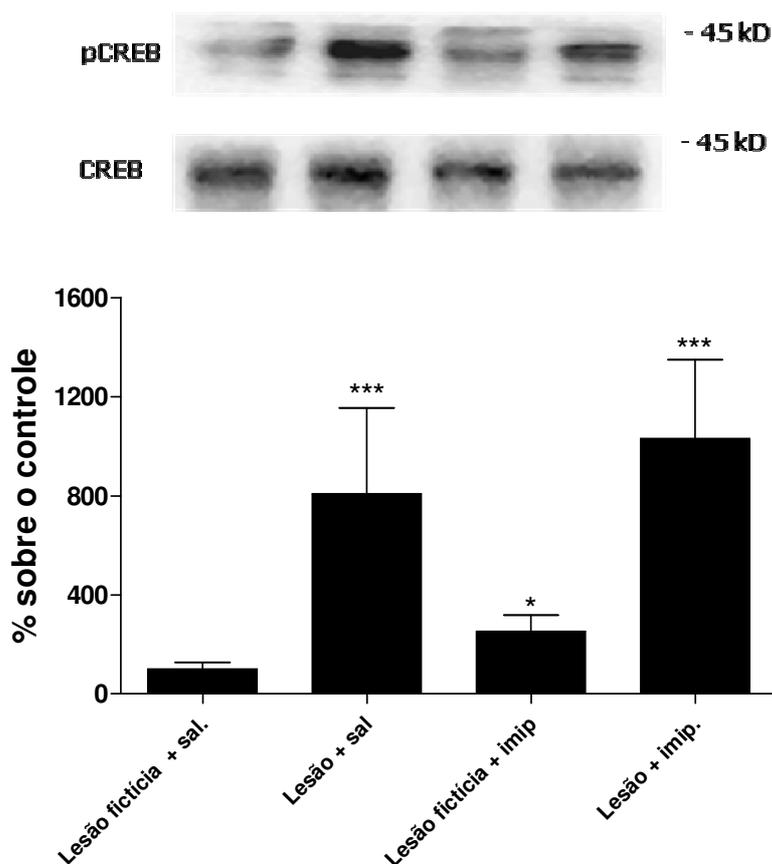


Figura 11: Efeito da lesão de nervo periférico sobre a fosforilação de CREB em extrato da coluna dorsal da medula espinal e o efeito do tratamento agudo com IRSN. Imagem superior representativa de filtro de *western blot* de animais submetidos à lesão fictícia e tratados com salina, a lesão efetiva (7 dias), lesão fictícia e tratados com imipramina (30mg/kg; i.p.) e lesão efetiva, tratados com imipramina (30mg/kg; i.p.). O gráfico representa a quantificação dos níveis de fosforilação dos diferentes grupos. As barras representam a média \pm erro padrão da média e $n = 4$ animais para cada grupo. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ em relação ao grupo com lesão fictícia, tratado com salina (teste *t* de Student).

O aumento na fosforilação de CREB observado no 7º dia após a lesão foi também observado 28 dias após a ligação do nervo isquiático ($p < 0,001$, teste *t* de Student) (Fig. 12). Entretanto, este aumento foi revertido pelo tratamento crônico com imipramina. Os animais com lesão fictícia, tratados cronicamente com imipramina, não apresentaram aumento na atividade de CREB, quando comparados com o grupo controle (Fig. 12).

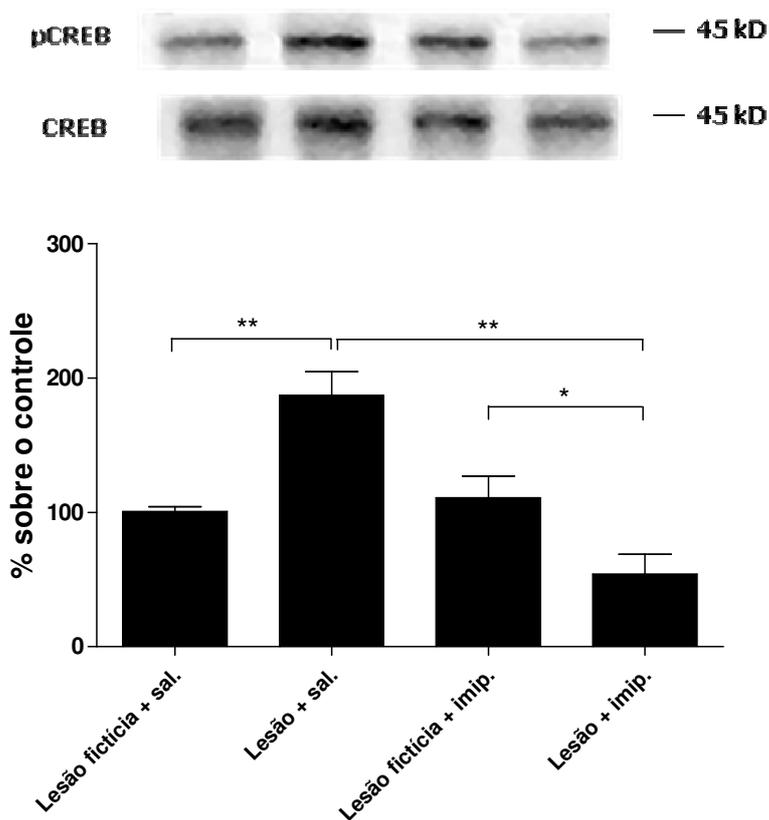


Figura 12: Efeito da lesão de nervo periférico sobre a fosforilação de CREB em extrato da coluna dorsal da medula espinal e o efeito do tratamento com IRSN. Imagem superior representativa de filtro de *western blot* de animais submetidos à lesão fictícia e tratados com salina por 28 dias, com lesão efetiva e tratados com salina por 28 dias, lesão fictícia e tratados com imipramina (30mg/kg; i.p.) por 28 dias e lesão efetiva, tratados com imipramina (30mg/kg; i.p.) por 28 dias. O gráfico representa a quantificação dos níveis de fosforilação dos diferentes grupos. As barras representam a média \pm erro padrão da média e $n = 4$ animais para cada grupo. $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ em relação ao grupo com lesão fictícia, tratado com salina (teste *t* de Student).

Análise imunohistoquímica da distribuição espacial de células imunorreativas a forma ativa da proteína CREB na coluna dorsal da medula espinal.

Nossos resultados da distribuição laminar da forma fosforilada de CREB são ainda, meramente ilustrativos. A análise quantitativa será feita por estereologia. Entretanto, selecionamos amostras representativas dos cortes com maior densidade de células imunorreativas ao anticorpo anti-fosfoCREB. Assim, nossos dados indicam que fosfoCREB apresenta distribuição por todas as camadas da coluna dorsal da medula espinal, mas particularmente nas camadas superficiais, tanto em animais intactos, quanto em animais com lesão fictícia do nervo isquiático (**Figs. 13 e 14**). Entretanto, após lesão de nervo periférico, há um aparente aumento nas camadas mais superficiais, ipisilateral à lesão. Este aparente aumento mostrou-se bastante robusto no 7^o, no 28^o e no 49^o dias após a lesão (**Figs. 13 e 14**).

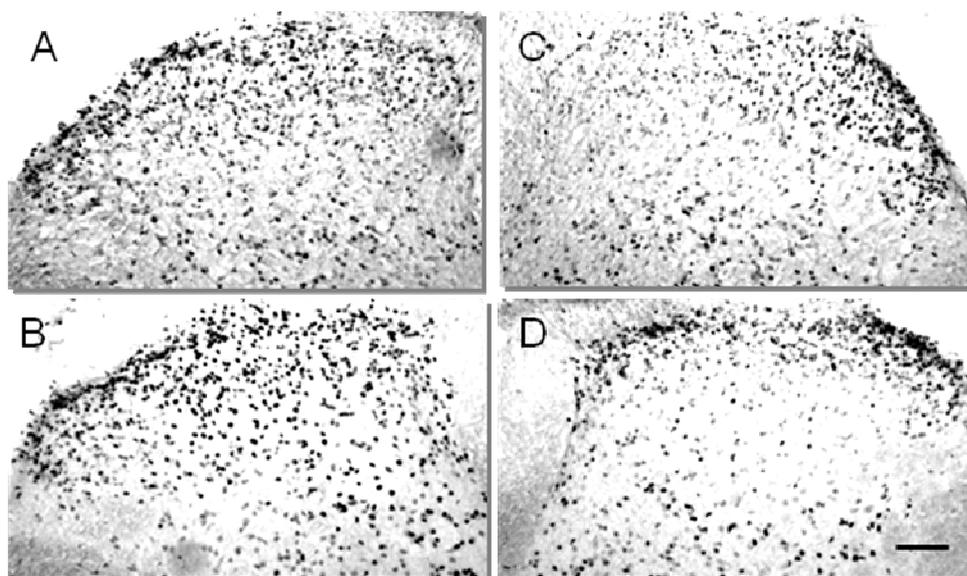


Figura 13: Perfil de expressão de fosfoCREB na coluna dorsal da medula espinal de animais submetidos à lesão do nervo isquiático. Fotomicrografias mostrando a distribuição de células imunorreativas à fosfoCREB na coluna dorsal da medula espinal (L4-L6) ipsilateral (A e B) e contralateral (C e D) à lesão. As imagens sugerem um aumento na atividade de CREB, tanto 7 (A), quanto 28 (B) dias após a lesão. Barra representa 50 μ m.

O tratamento por 21 dias com impramina sugere ainda que, nos animais com neuropatia periférica, há uma aparente redução do número de células imunorreativas a fosfoCREB (**Fig. 15**). Além disso, nos animais com lesão fictícia, o tratamento crônico com inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina não alterou o padrão de

imunorreatividade (Fig. 15). Observamos, ainda, que a interrupção do tratamento por 3 semanas não alterou o padrão de imunorreatividade observados 21 dias após o tratamento com imipramina (Fig. 16).

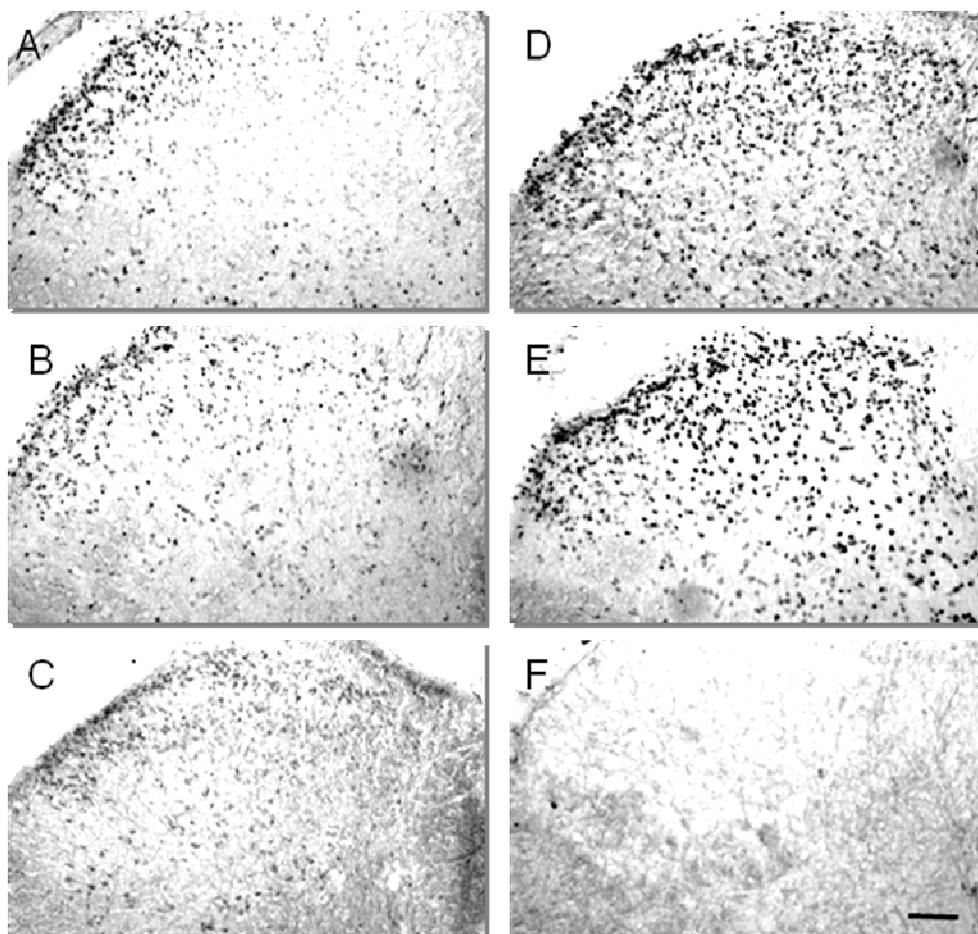


Figura 14: Comparação entre os perfis de expressão de pCREB no corno dorsal ipsilateral à lesão parcial do nervo isquiático e lesão fictícia, após 7 e 28 dias da lesão. Fotomicrografias representativas da distribuição de células imunorreativas à fosfoCREB na coluna dorsal da medula espinal (L4-L6) ipsilateral à lesão. Em (A), animal intacto, (B) animal com lesão fictícia, 7 dias após a cirurgia, (C) animal com lesão fictícia, 28 dias após a cirurgia, (D) animal com lesão efetiva, 7 dias após a lesão, (E) animal com lesão 28 dias após a cirurgia, (F) imagem do controle negativo de animal com lesão (7dias) onde o anticorpo primário foi omitido da reação imunohistoquímica. Barra representa 50 μ m.

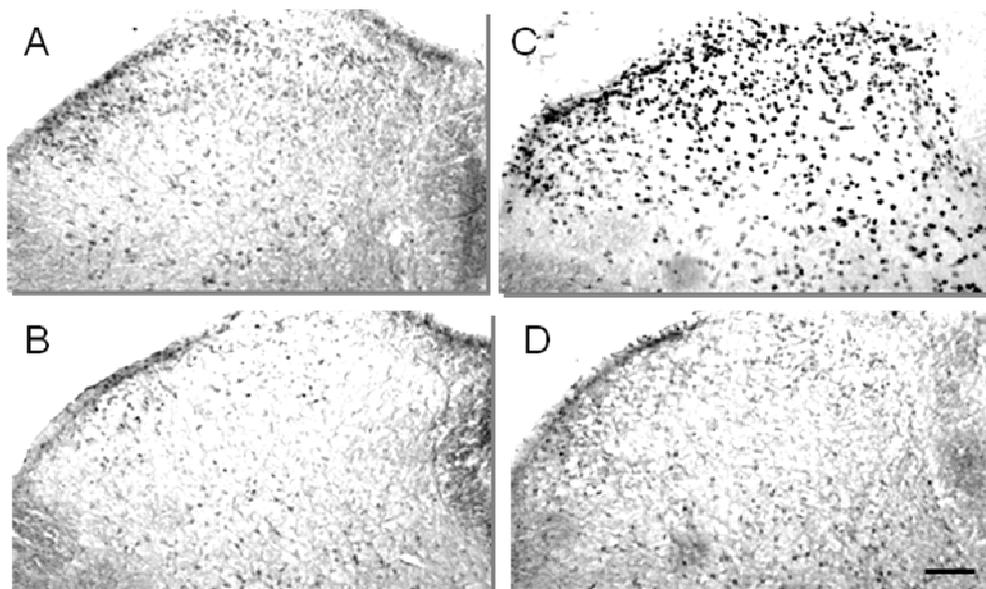


Figura 15: Efeito do tratamento crônico com imipramina sobre a distribuição de fosfoCREB na coluna dorsal da medula espinal. Fotomicrografias do corno dorsal da medula espinal (L4-L6) mostrando a distribuição dos perfis marcados com fosfoCREB. (A) animal com lesão fictícia, tratado com salina, (B) animal com lesão fictícia, tratado com imipramina por 21 dias, (C) animal com lesão efetiva, tratado com salina por 21 dias e (D) animal com lesão efetiva, tratado com imipramina por 21 dias. Barra representa 50 μ m.

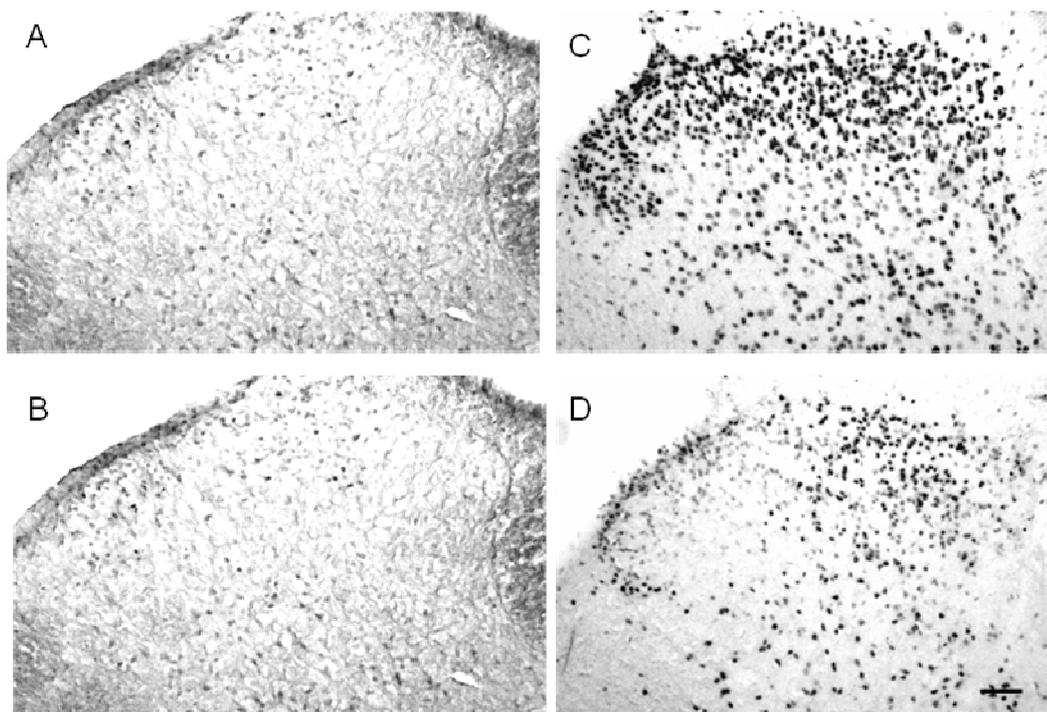


Figura 16: Efeito da interrupção de imipramina por 3 semanas na expressão de pCREB. Fotomicrografias do corno dorsal da medula espinhal (L4-L6) mostrando a distribuição dos perfis marcados com fosfoCREB. (A) animal com lesão fictícia, tratado com salina, (B) animal com lesão fictícia, tratado com imipramina por 21 dias, (C) animal com lesão efetiva, tratado com salina por 21 dias e (D) animal com lesão efetiva, tratado com imipramina por 21 dias. Em todos esses grupos os animais permaneceram por 3 semanas sem tratamento, sendo perfundidos no 49^o dia após a cirurgia. Barra representa 50 μ m.

V. DISCUSSÃO

Os testes comportamentais de hipersensibilidade ao estímulo mecânico e hipernocicepção demonstram que o modelo experimental utilizado foi capaz de induzir alterações de sensibilidade decorrentes da lesão de nervo periférico. Neste modelo, observamos que o tratamento agudo com imipramina não exerce qualquer atividade antinociceptiva nos animais lesados. Entretanto, nos animais tratados cronicamente com imipramina, há uma progressiva reversão da alteração de sensibilidade desenvolvida pelos animais lesados. Ao final de 21 dias de tratamento, não havia mais diferença significativa entre as respostas comportamentais antes e após a lesão do nervo, indicando que o uso prolongado da droga reverteu completamente as alterações de sensibilidade decorrentes desta lesão. Ainda mais interessante foi a observação de que, dependendo da dose utilizada, as alterações de sensibilidade permaneceram inalteradas após a interrupção do tratamento. Observamos ainda que 7 dias após a lesão do nervo há um aumento de CREB, corroborando dados da literatura (Miyabe and Miletic 2005). Entretanto, observamos aqui, que este aumento perdurou por até 49 dias após a lesão, sugerindo uma participação efetiva desse fator de transcrição nos mecanismos tardios de manutenção da dor. Observamos, também, que o tratamento crônico com imipramina reduziu significativamente a fosforilação de CREB.

Muitos fármacos com atividade antidepressiva agem pelo bloqueio de sítios de recaptação de serotonina e noradrenalina (Berton and Nestler 2006). O efeito terapêutico dessas drogas contra a depressão, geralmente, necessita de tratamento prolongado (Frazer and Morilak 2005). Este atraso no início do efeito terapêutico leva a idéia de que essas drogas agem por alterações moleculares e celulares a longo-prazo, se valendo da plasticidade neuronal conseqüente ao uso prolongado dos fármacos (Duman 2002; Nestler, Barrot *et al.* 2002). Ainda que o efeito terapêutico de antidepressivos contra as dores crônicas de origem neuropática ocorra de maneira mais rápida, eles ainda necessitam de uma ou duas semanas de tratamento para que o efeito analgésico apareça (Sindrup, Otto *et al.* 2005; Mico, Ardid *et al.* 2006). Esses dados reforçam a idéia da presença de plasticidade celular secundária ao uso dos fármacos.

Se eficácia clínica de antidepressivos contra dor neuropática seja bem documentada, ainda sabemos muito pouco sobre os possíveis mecanismos pelos quais essas drogas aliviam a dor. Antidepressivos tricíclicos (IRSN), que inibem, tanto a recaptação de serotonina, quanto noradrenalina e inibidores específicos de serotonina

(ISRS) têm sido exaustivamente testados como agentes antinociceptivos. Entretanto, os resultados clínicos com ISRS são bastantes controversos. Alguns estudos sugerem eficácia terapêutica, enquanto outros demonstraram a falta dela (Sindrup, Otto *et al.* 2005; Max, Wu *et al.* 2006; Mico, Ardid *et al.* 2006) e não está claro se os ISRS são capazes de aliviar a dor de origem neuropática em pacientes não depressivos (Attal, Cruccu *et al.* 2006; Gilron, Watson *et al.* 2006; Moulin, Clark *et al.* 2007). Essa diferença entre ISRS e IRSN tem sido mostrada também em modelos experimentais (Attal, Cruccu *et al.* 2006; Gilron, Watson *et al.* 2006; Moulin, Clark *et al.* 2007). Juntos, esses resultados sugerem que a inibição crônica somente de serotonina não é suficiente para aliviar a alodinia induzida pela neuropatia periférica e que a inibição da recaptação de noradrenalina desempenha um papel fundamental no efeito analgésico de antidepressivos.

O uso de antidepressivos tricíclicos para o tratamento da dor crônica de origem neuropática foi introduzido há 30 anos (Davis, Whittington *et al.* 1997) e seu efeito analgésico tem se mostrado independente das alterações de humor que eles possam provocar (Wolfe and Trivedi 2004; Sindrup, Otto *et al.* 2005; Max, Wu *et al.* 2006). Nosso modelo experimental deixa claro que o uso crônico, mas não o agudo, de imipramina é capaz de suprimir a alodinia mecânica induzida pela lesão parcial do nervo isquiático e este efeito pode perdurar mesmo após a interrupção do tratamento, sugerindo, mais uma vez, que essas drogas promovem alterações celulares persistentes no sistema nociceptivo.

A fim de se entender os mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo, alguns modelos animais foram usados. Esses experimentos revelaram um efeito analgésico de IRSN em animais sem qualquer tipo de lesão (Hersh and Kaplan 1990; Zhao, Chiechio *et al.* 2007) ou em modelos de dor inflamatória aguda (Acton, McKenna *et al.* 1992; Zhao, Chiechio *et al.* 2007). Nesses trabalhos, as doses de antidepressivos foram relativamente altas e, na realidade, eles não representam o uso clínico de antidepressivos como analgésicos. Como ressaltado previamente, os IRSN são usados na clínica para o tratamento de síndromes de dor neuropática e não para o tratamento de dores agudas ou aquelas de origem inflamatória (Blackburn-Munro 2004; Wolfe and Trivedi 2004). Além disso, as doses terapêuticas contra dor neuropática são menores do que aquelas classicamente usadas contra a depressão (Sindrup, Otto *et al.* 2005). Por último, os IRSN requerem tratamento crônico para mostrar sua eficácia contra a dor (Wolfe and Trivedi 2004; Mico, Ardid *et al.* 2006), embora essa latência terapêutica seja menor no tratamento da dor neuropática quando comparada a depressão. Nos nossos

protocolos experimentais, a alodinia mecânica foi significativamente reduzida pela imipramina com doses 3-6 vezes menores do que aquelas usadas em modelos murinos de depressão. Além disso, o efeito antinociceptivo contra a hipersensibilidade mecânica só foi observado após duas semanas de tratamento, não sendo observado qualquer efeito agudo da droga. Nossos resultados são similares a outros trabalhos que demonstram uma ausência de analgesia pelo tratamento agudo com IRSN em animais sem qualquer lesão (Lee and Spencer 1980; Testa, Angelico *et al.* 1987; Bomholt, Mikkelsen *et al.* 2005) e mesmo naqueles com alodinia mecânica em modelos de neuropatia periférica (Jett, McGuirk *et al.* 1997; Esser and Sawynok 1999; Idanpaan-Heikkila and Guilbaud 1999; Bomholt, Mikkelsen *et al.* 2005).

O aspecto crônico do tratamento é uma importante característica de drogas antidepressivas, em particular de IRSN. Na área de investigação da depressão, esse atraso no início do efeito antidepressivo, tem indicado que o efeito clínico dessas drogas está associado a plasticidade neuronal e alterações moleculares de longo-prazo, levando a alterações na regulação e no perfil de expressão de genes e proteínas, no recrutamento de neurotrofinas, na reorganização da arborização dendrítica e neurogenesis (Duman 2002; Nestler, Barrot *et al.* 2002; Coyle and Duman 2003; Tsankova, Berton *et al.* 2006).

Embora os antidepressivos tricíclicos sejam usados a muitos anos, os seus mecanismos antinociceptivos permanecem desconhecidos. A hipótese mais comumente aceita refere-se ao recrutamento de sistemas descendentes noradrenérgicos. Parte desse sistema desempenha ação inibitória em resposta a estímulo nociceptivo (Yoshimura and Furue 2006) e agem, principalmente, por adrenoceptores do subtipo alfa 2. Ardid *et al.*, (1995) relataram que o efeito analgésico de clomipramine, um antidepressivo tricíclico, foi inibido por lesões no funículo dorso-lateral, um sistema de fibras bulbo-espinhais monoaminérgicas. Uma hipótese alternativa pode ser também levantada, olhando-se para os possíveis efeitos de tricíclicos na periferia. Experimentalmente, lesões do nervo periférico induz a uma invasão de axônios simpáticos noradrenérgicos para dentro do gânglio da raiz dorsal (Chung, Lee *et al.* 1996; Ramer, French *et al.* 1997; Ramer and Bisby 1999). Essa proliferação de fibras noradrenérgicas sobre neurônio sensoriais primários poderia ser um alvo de ação dos tricíclicos contra dor neuropática e explicaria, também, porque o efeito terapêutico dos tricíclicos é observado somente em condições de dor neuropática crônica. Recentemente, outros autores têm sugerido que o efeito antinociceptivo de antidepressivos tricíclicos ocorra pelo recrutamento do sistema

opioidérgico endógeno (Benbouzid, Choucair-Jaafar *et al.* 2008). Esses dados, corroboram os estudos que mostram que o antagonismo farmacológico de opióides bloqueia o efeito analgésico de TCAs (Valverde, Maldonado *et al.* 1994; Gray, Spencer *et al.* 1998). É importante ressaltar aqui, que outros autores não encontraram qualquer relação entre o efeito antinociceptivo dos TCAs e a ativação de opióides endógenos (Spiegel and Albert 1983; Ghelardini, Galeotti *et al.* 2000). Assim, nossos resultados indicam que o modelo experimental de dor neuropática, o uso crônico, mas não o agudo, de TCA é capaz de reverter a hipersensibilidade ao estímulo mecânico e, dependendo da dose administrada, esse efeito pode perdurar por até 3 semanas após a interrupção do tratamento.

Nossos resultados mostram, também, que o uso prolongado de IRSN foi capaz de reverter os efeitos da lesão de nervo periférico sobre a atividade de CREB na coluna dorsal da medula espinal. Esses dados reforçam a idéia de que o atraso no efeito antinociceptivo de IRSN se deve, em parte, a alterações na síntese de novas proteínas no sistema nociceptivo. A ativação de CREB é reconhecida como um passo crítico para o desenvolvimento de plasticidade sináptica dependente de atividade e que em último caso levaria às mudanças fenotípicas responsáveis pelas mudanças das funções neurais (Lonze and Ginty 2002; Bito 2003; Bito and Takemoto-Kimura 2003). Assim, o aumento da fosforilação de CREB pode ocorrer como consequência das alterações sensoriais induzidas pela lesão de nervo periférico, e desse modo, contribuir de maneira importante para a plasticidade sináptica provocada pela lesão neural (Zimmermann and Green 2001; Zimmermann 2001; Willis 2002). Têm sido descrito que uma associação entre o aparecimento de hiperalgesia térmica e o aumento da fosforilação de CREB após lesão de nervo periférico (Miletic, Pankratz *et al.* 2002; Miyabe and Miletic 2005). É importante ressaltar, também, que esse aumento da atividade de CREB foi, significativamente, reduzido pela injeção intratecal de K252a, um bloqueador inespecífico dos receptores tirosina-kinase (Miletic, Pankratz *et al.* 2002). Juntos esses dados corroboram a idéia de que a atividade de CREB na medula espinal é, pelo menos parcialmente, dependente de BDNF.

Diversos trabalhos clínicos e experimentais têm demonstrado que os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico desempenham papel um importante nos mecanismos de ação antinociceptivos de antidepressivos, em particular nas síndromes dolorosas de origem neuropática. Esses trabalhos não têm, entretanto, identificado que neurotransmissores ou receptores estariam envolvidos nesse fenômeno, uma vez que diferentes classes de antidepressivos, incluindo os inibidores seletivos (ou não) da

recaptação de serotonina e noradrenalina, apresentam efeitos bastantes distintos sobre os níveis de monoaminas. Além disso, o simples aumento da disponibilidade de serotonina e noradrenalina em resposta a exposição aguda às drogas, não é suficiente para provocar efeito antinociceptivo. Esses dados sugerem os mecanismos de ação antinociceptiva de IRSN envolve adaptações neurais pelo uso crônico dessas drogas. Uma explicação possível para este atraso no efeito analgésico de IRSN e que não envolveria a ação específica de serotonina ou noradrenalina, seria a instalação de adaptações intracelulares conseqüentes ao aumento persistente da disponibilidade desses neurotransmissores. Nesse caso, a regulação dos níveis de monoaminas e da atividade de seus receptores representariam efeito inicial que subsequentemente levaria a regulação de segundos-mensageiros intracelulares e genes, que finalmente mediarão a ação antinociceptiva de IRSN. Nesse contexto, CREB seria um forte candidato para a ação de serotonina/noradrenalina, mediando, assim, as adaptações neuronais em resposta ao uso crônico de IRSN. Um mecanismo de ação envolvendo a via de AMPc é respaldado por estudos prévios que demonstraram que o uso crônico de IRSN aumentam os níveis de adelicado ciclase e PKA no cérebro (Nestler, Erdos *et al.* 1989; Ozawa and Rasenick 1991). Nossos resultados corroboram esses resultados, sugerindo, claramente, que o efeito analgésico de imipramina pode estar associado com a redução da atividade de CREB na coluna dorsal da medula espinal.

VI. CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, concluimos que:

1. O efeito da administração crônica, mas não aguda, dos inibidores da recaptação de serotonina/noradrenalina reverte o aparecimento da alodínia e hipernocicepção provocadas por lesão do nervo periférico em camundongos.
2. O uso persistente dos inibidores da recaptação de serotonina/noradrenalina diminui, significativamente, a atividade do fator de transcrição CREB na coluna dorsal da medula espinal, sugerindo uma redução na síntese proteica e em um dos efeitos celulares provocados pela lesão do nervo periférico.
3. O uso crônico da imipramina induziu a efeitos anti-alodínicos e anti-hiperálgicos prolongados mesmo após a interrupção do tratamento. Efeito semelhante foi observado no estado de fosforilação da proteína CREB, sugerindo dessa forma uma ação prolongada deste fármaco sobre a plasticidade neural induzida pela lesão do nervo periférico.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acton, J., J. E. McKenna, et al. (1992). "Amitriptyline produces analgesia in the formalin pain test." Exp Neurol **117**(1): 94-96.
2. Afione, S., L. Debeljuk, et al. (1990). "Substance P affects the GABAergic system in the hypothalamo-pituitary axis." Peptides **11**(6): 1065-1068.
3. Aley, K. O. and J. D. Levine (2002). "Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat." Neuroscience **111**(2): 389-397.
4. Attal, N. and D. Bouhassira (2006). "Translating basic research on sodium channels in human neuropathic pain." J Pain **7**(1 Suppl 1): S31-37.
5. Attal, N., G. Cruccu, et al. (2006). "EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain." Eur J Neurol **13**(11): 1153-1169.
6. Basbaum, A. I. and H. L. Fields (1978). "Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis." Ann Neurol **4**(5): 451-462.
7. Bement, M. K. and K. A. Sluka (2007). "Co-localization of p-CREB and p-NR1 in spinothalamic neurons in a chronic muscle pain model." Neurosci Lett **418**(1): 22-27.
8. Benbouzid, M., N. Choucair-Jaafar, et al. (2008). "Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice." Eur J Pain **12**(8): 1008-1017.
9. Bennett, G. J. (2003). "Neuropathic pain: a crisis of definition?" Anesth Analg **97**(3): 619-620.
10. Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." Nat Rev Neurosci **7**(2): 137-151.
11. Besson, J. M. (1999). "The neurobiology of pain." Lancet **353**(9164): 1610-1615.
12. Bito, H. (2003). "Dynamic control of neuronal morphogenesis by rho signaling." J Biochem **134**(3): 315-319.
13. Bito, H. and S. Takemoto-Kimura (2003). "Ca(2+)/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival." Cell Calcium **34**(4-5): 425-430.
14. Blackburn-Munro, G. (2004). "Pain-like behaviours in animals - how human are they?" Trends Pharmacol Sci **25**(6): 299-305.
15. Bogduk, N. (1994). "Post whiplash syndrome." Aust Fam Physician **23**(12): 2303-2307.
16. Bomholt, S. F., J. D. Mikkelsen, et al. (2005). "Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain." Neuropharmacology **48**(2): 252-263.
17. Burstein, R., D. Yarnitsky, et al. (2000). "An association between migraine and cutaneous allodynia." Ann Neurol **47**(5): 614-624.
18. Chaplan, S. R., F. W. Bach, et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." J Neurosci Methods **53**(1): 55-63.

19. Chong, M. S. and Z. H. Bajwa (2003). "Diagnosis and treatment of neuropathic pain." J Pain Symptom Manage **25**(5 Suppl): S4-S11.
20. Chung, K., B. H. Lee, et al. (1996). "Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model." J Comp Neurol **376**(2): 241-252.
21. Colombo, B., P. O. Annovazzi, et al. (2006). "Medications for neuropathic pain: current trends." Neurol Sci **27 Suppl 2**: S183-189.
22. Coluzzi, F. and C. Mattia (2005). "Mechanism-based treatment in chronic neuropathic pain: the role of antidepressants." Curr Pharm Des **11**(23): 2945-2960.
23. Coyle, J. T. and R. S. Duman (2003). "Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments." Neuron **38**(2): 157-160.
24. Crown, E. D., Z. Ye, et al. (2005). "Upregulation of the phosphorylated form of CREB in spinothalamic tract cells following spinal cord injury: relation to central neuropathic pain." Neurosci Lett **384**(1-2): 139-144.
25. Davis, R., R. Whittington, et al. (1997). "Nefazodone. A review of its pharmacology and clinical efficacy in the management of major depression." Drugs **53**(4): 608-636.
26. Delgado, P. L. (2004). "Common pathways of depression and pain." J Clin Psychiatry **65 Suppl 12**: 16-19.
27. Dickinson, T., K. Lee, et al. (2003). "Leading the charge--pioneering treatments in the fight against neuropathic pain." Trends Pharmacol Sci **24**(11): 555-557.
28. Dray, A. (1997). "Kinins and their receptors in hyperalgesia." Can J Physiol Pharmacol **75**(6): 704-712.
29. Drewes, A. M. (2006). "[The physiology of pain]." Ugeskr Laeger **168**(20): 1941-1943.
30. Duman, R. S. (2002). "Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity." Eur Psychiatry **17 Suppl 3**: 306-310.
31. Duvilanski, B., A. Seilicovich, et al. (1994). "GABA transport and subcellular distribution in the rat anterior pituitary gland." Neuroendocrinology **59**(2): 183-188.
32. Eisenach, J. C. and G. F. Gebhart (1995). "Intrathecal amitriptyline. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats." Anesthesiology **83**(5): 1036-1045.
33. Esser, M. J. and J. Sawynok (1999). "Acute amitriptyline in a rat model of neuropathic pain: differential symptom and route effects." Pain **80**(3): 643-653.
34. Farber, L., T. H. Stratz, et al. (2001). "Short-term treatment of primary fibromyalgia with the 5-HT₃-receptor antagonist tropisetron. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial in 418 patients." Int J Clin Pharmacol Res **21**(1): 1-13.
35. Frazer, A. and D. A. Morilak (2005). "What should animal models of depression model?" Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 515-523.
36. Gass, P. and M. A. Riva (2007). "CREB, neurogenesis and depression." Bioessays **29**(10): 957-961.

37. Ghelardini, C., N. Galeotti, et al. (2000). "Antinociception induced by amitriptyline and imipramine is mediated by alpha2A-adrenoceptors." Jpn J Pharmacol **82**(2): 130-137.
38. Gilron, I., C. P. Watson, et al. (2006). "Neuropathic pain: a practical guide for the clinician." CMAJ **175**(3): 265-275.
39. Gordh, T., Jr., I. Jansson, et al. (1989). "Interactions between noradrenergic and cholinergic mechanisms involved in spinal nociceptive processing." Acta Anaesthesiol Scand **33**(1): 39-47.
40. Gray, A. M., P. S. Spencer, et al. (1998). "The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds." Br J Pharmacol **124**(4): 669-674.
41. Hama, A. T. and D. Borsook (2005). "The effect of antinociceptive drugs tested at different times after nerve injury in rats." Anesth Analg **101**(1): 175-179, table of contents.
42. Harden, R. N. (2005). "Chronic neuropathic pain. Mechanisms, diagnosis, and treatment." Neurologist **11**(2): 111-122.
43. Hargreaves, K., R. Dubner, et al. (1988). "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." Pain **32**(1): 77-88.
44. Healy, D. and T. McMonagle (1997). "The enhancement of social functioning as a therapeutic principle in the management of depression." J Psychopharmacol **11**(4 Suppl): S25-31.
45. Hersh, E. V. and P. Kaplan (1990). "Antinociceptive action of tricyclic antidepressant drugs in the rat." Anesth Prog **37**(4): 186-189.
46. Holdridge, S. V. and C. M. Cahill (2007). "Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain." Eur J Pain **11**(6): 685-693.
47. Hood, D. D., K. A. Mallak, et al. (1996). "Interaction between intrathecal neostigmine and epidural clonidine in human volunteers." Anesthesiology **85**(2): 315-325.
48. Hyman, S. E. and E. J. Nestler (1996). "Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action." Am J Psychiatry **153**(2): 151-162.
49. Idanpaan-Heikkila, J. J. and G. Guilbaud (1999). "Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour." Pain **79**(2-3): 281-290.
50. Jackson, K. C., 2nd (2006). "Pharmacotherapy for neuropathic pain." Pain Pract **6**(1): 27-33.
51. Jann, M. W. and J. H. Slade (2007). "Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression." Pharmacotherapy **27**(11): 1571-1587.
52. Jett, M. F., J. McGuirk, et al. (1997). "The effects of mexiletine, desipramine and fluoxetine in rat models involving central sensitization." Pain **69**(1-2): 161-169.
53. Ji, R. R., T. Kohno, et al. (2003). "Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?" Trends Neurosci **26**(12): 696-705.
54. Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." Nature **413**(6852): 203-210.

55. Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." Pain **50**(3): 355-363.
56. Lee, R. L. and P. S. Spencer (1980). "Effect of tricyclic antidepressants on analgesic activity in laboratory animals." Postgrad Med J **56 Suppl 1**: 19-24.
57. Lee, Y., C. H. Lee, et al. (2005). "Painful channels in sensory neurons." Mol Cells **20**(3): 315-324.
58. Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." Neuron **35**(4): 605-623.
59. Marchand, F., D. Ardid, et al. (2003). "Evidence for an involvement of supraspinal delta- and spinal mu-opioid receptors in the antihyperalgesic effect of chronically administered clomipramine in mononeuropathic rats." J Pharmacol Exp Ther **307**(1): 268-274.
60. Max, M. B., T. Wu, et al. (2006). "A clinical genetic method to identify mechanisms by which pain causes depression and anxiety." Mol Pain **2**: 14.
61. McCarson, K. E., A. Ralya, et al. (2005). "Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABA(B) receptor expression and function in an animal model of neuropathic pain." Biochem Pharmacol **71**(1-2): 196-202.
62. Melzack, R. (1999). "Pain--an overview." Acta Anaesthesiol Scand **43**(9): 880-884.
63. Mendell, J. R. and Z. Sahenk (2003). "Clinical practice. Painful sensory neuropathy." N Engl J Med **348**(13): 1243-1255.
64. Merskey, H. (1994). "Logic, truth and language in concepts of pain." Qual Life Res **3 Suppl 1**: S69-76.
65. Mico, J. A., D. Ardid, et al. (2006). "Antidepressants and pain." Trends Pharmacol Sci **27**(7): 348-354.
66. Mico, J. A., J. Gibert-Rahola, et al. (1997). "Implication of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in the antinociceptive effect of tricyclic antidepressants." Eur Neuropsychopharmacol **7**(2): 139-145.
67. Miletic, G., E. N. Hanson, et al. (2004). "Brain-derived neurotrophic factor-elicited or sciatic ligation-associated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the rat spinal dorsal horn is reduced by block of tyrosine kinase receptors." Neurosci Lett **361**(1-3): 269-271.
68. Miletic, G., M. T. Pankratz, et al. (2002). "Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats." Pain **99**(3): 493-500.
69. Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." Prog Neurobiol **57**(1): 1-164.
70. Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." Prog Neurobiol **66**(6): 355-474.
71. Miyabe, T. and V. Miletic (2005). "Multiple kinase pathways mediate the early sciatic ligation-associated activation of CREB in the rat spinal dorsal horn." Neurosci Lett **381**(1-2): 80-85.

72. Moulin, D. E., A. J. Clark, et al. (2007). "Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society." Pain Res Manag **12**(1): 13-21.
73. Nestler, E. J. and G. K. Aghajanian (1997). "Molecular and cellular basis of addiction." Science **278**(5335): 58-63.
74. Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.
75. Nestler, E. J., J. J. Erdos, et al. (1989). "Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus." Brain Res **476**(2): 230-239.
76. Obata, H., S. Saito, et al. (2005). "The monoamine-mediated antiallodynic effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a rat model of neuropathic pain." Anesth Analg **100**(5): 1406-1410, table of contents.
77. Ozawa, H. and M. M. Rasenick (1991). "Chronic electroconvulsive treatment augments coupling of the GTP-binding protein Gs to the catalytic moiety of adenylyl cyclase in a manner similar to that seen with chronic antidepressant drugs." J Neurochem **56**(1): 330-338.
78. Pampillo, M., A. De Laurentiis, et al. (1999). "NMDA receptor-mediated control of GABA release from neurointermediate lobes of female and male rats." Brain Res **842**(2): 469-472.
79. Ramer, M. S. and M. A. Bisby (1999). "Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment." Eur J Neurosci **11**(3): 837-846.
80. Ramer, M. S., G. D. French, et al. (1997). "Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG." Pain **72**(1-2): 71-78.
81. Rocha, A. P., L. Lemonica, et al. (2002). "[Intrathecal drugs for chronic pain control.]" Rev Bras Anestesiol **52**(5): 628-643.
82. Rygh, L. J., F. Svendsen, et al. (2005). "Long-term potentiation in spinal nociceptive systems--how acute pain may become chronic." Psychoneuroendocrinology **30**(10): 959-964.
83. Saarto, T. and P. J. Wiffen (2005). "Antidepressants for neuropathic pain." Cochrane Database Syst Rev(3): CD005454.
84. Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" Nat Neurosci **5 Suppl**: 1062-1067.
85. Sindrup, S. H., M. Otto, et al. (2005). "Antidepressants in the treatment of neuropathic pain." Basic Clin Pharmacol Toxicol **96**(6): 399-409.
86. Song, X. S., J. L. Cao, et al. (2005). "Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats." Acta Pharmacol Sin **26**(7): 789-798.
87. Spiegel, D. and L. H. Albert (1983). "Naloxone fails to reverse hypnotic alleviation of chronic pain." Psychopharmacology (Berl) **81**(2): 140-143.
88. Testa, R., P. Angelico, et al. (1987). "Effect of citalopram, amineptine, imipramine and nortriptyline on stress-induced (footshock) analgesia in rats." Pain **29**(2): 247-255.

89. Tsankova, N. M., O. Berton, et al. (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nat Neurosci 9(4): 519-525.
90. Valverde, O., R. Maldonado, et al. (1994). "Cholecystokinin B antagonists strongly potentiate antinociception mediated by endogenous enkephalins." J Pharmacol Exp Ther 270(1): 77-88.
91. Willis, W. D. (2002). "Long-term potentiation in spinothalamic neurons." Brain Res Brain Res Rev 40(1-3): 202-214.
92. Wolfe, G. I. and J. R. Trivedi (2004). "Painful peripheral neuropathy and its nonsurgical treatment." Muscle Nerve 30(1): 3-19.
93. Woolf, C. J. (1983). "Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity." Nature 306(5944): 686-688.
94. Woolf, C. J. (2004). "Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy." Life Sci 74(21): 2605-2610.
95. Woolf, C. J. (2004). "Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management." Ann Intern Med 140(6): 441-451.
96. Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). "Neuronal plasticity: increasing the gain in pain." Science 288(5472): 1765-1769.
97. Wu, J., L. Fang, et al. (2002). "The role of nitric oxide in the phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein in the spinal cord after intradermal injection of capsaicin." J Pain 3(3): 190-198.
98. Yoshimura, M. and H. Furue (2006). "Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord." J Pharmacol Sci 101(2): 107-117.
99. Zhao, Z. Q., S. Chiechio, et al. (2007). "Mice lacking central serotonergic neurons show enhanced inflammatory pain and an impaired analgesic response to antidepressant drugs." J Neurosci 27(22): 6045-6053.
100. Zimmermann, K. C. and D. R. Green (2001). "How cells die: apoptosis pathways." J Allergy Clin Immunol 108(4 Suppl): S99-103.
101. Zimmermann, M. (2001). "Pathobiology of neuropathic pain." Eur J Pharmacol 429(1-3): 23-37.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)