



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E FISILOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CARLOS CAMPOS CÂMARA**

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS,  
COMPORTAMENTAIS E REGENERATIVOS DO TRATAMENTO  
COM GABAPENTINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR  
NEUROPÁTICA.**

FORTALEZA

2009.

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**CARLOS CAMPOS CÂMARA**

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS, COMPORTAMENTAIS E  
REGENERATIVOS DO TRATAMENTO COM GABAPENTINA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

Fortaleza

2009.

C172e Câmara, Carlos Campos

Estudo dos efeitos analgésicos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática / Carlos Campos Câmara. – Fortaleza, 2009.  
220f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Mauricio de Castro Costa  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Anticonvulsivos 2. Dor 3. Nervo Ciático 4. Comportamento 5. Fator de Necrose Tumoral 6. Interleucina-1 I. de Castro Costa, Carlos Mauricio (orient.) II. Título.

CDD 615.78

CARLOS CAMPOS CÂMARA

ESTUDO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS, COMPORTAMENTAIS E  
REGENERATIVOS DO TRATAMENTO COM GABAPENTINA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA.

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa (orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Mariana Lima Vale  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Ana Maria Blanco Martinez  
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

---

Prof. Dra. Leda Menescal de Oliveira  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

**"Nunca confunda conhecimento com sabedoria. Aquele o ajuda a ganhar o sustento; esta o ajuda a alcançar a Vida".**

*Sandra Carey*

**“Amar a Deus, obedecendo a seus mandamentos e fazendo a Sua vontade, é o princípio da sabedoria.”**

*Provérbios 9:10.*

**"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em corações humanos, o que Deus tem preparado para aqueles que o amam."**

*I corintios 2:9*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, O caminho, a Verdade e a Vida.

Ao Prof. Carlos Maurício de Castro e Costa pela orientação, paciência, exemplo de sabedoria, amizade e todas as possibilidades geradas através dele.

Ao Prof. Reinaldo Oriá pelo intenso estímulo, entusiasmo e acompanhamento diário deste trabalho.

À Professora Mariana Vale pela grande colaboração, pelas grandes idéias e contribuições, amizade e apoio.

À Professora Elisabeth Morais e ao Professor Odorico Morais pelo imenso apoio, estímulo e amizade.

À professora Helena Serra Azul pela administração da coordenação do Curso de Pós-graduação. E também pelo estímulo e amizade.

À ilustre secretária do curso de pós-graduação, Áurea, pelo apoio, amizade e serviços prestados.

Às professoras Ana Maria Blanco Martinez (UFRJ) e Leda Menescal de Oliveira por terem prontamente se disponibilizado a participar da banca de defesa de tese e por suas importantes contribuições.

À professora Geane Matos Cunha pelo intenso estímulo, participação na qualificação e sua amizade.

Ao amigo professor Marcelus (UFC) pelo apoio e estímulo.

Ao professor Ronaldo Albuquerque pelas grandes contribuições e apoio.

Ao professor Vietla S. Rao pela amizade, estímulo e bondade.

À professora Cléa pela amizade e apoio desde os tempos de mestrado.

À mestranda Antoniella (LAFICA) que muito colaborou nos estudos do Elisa.

Aos amigos pesquisadores do LAFICA, André Luiz, Roberto Lopes e Professor Pedro pela grande participação, amizade e estímulo.

Aos bolsistas Heitor Ferreira Ramos e Alan Paulino, fundamentais nos trabalhos de bancada durante este trabalho.

Como também à amiga Celina e ao amigo George do Laboratório de Bioquímica-IBIMED, fundamentais nos experimentos do *Western Blotting*.

À Vandinha, técnica do LAFICA, pelas suas imensas habilidades técnicas e imensa disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Haroldo (marido da Vandinha) pelos animais disponibilizados e pela importante ajuda na manutenção destes animais.

Aos próprios animais que são sacrificados em busca de conhecimento para melhorar a qualidade de vida da humanidade.

Ao apoio financeiro do **FUNCAP e CNPq**

À EMBRAPA que permitiu a realização dos procedimentos de microscopia eletrônica, em especial a pessoa da Bióloga Celly Rodrigues Muniz e seu orientado Daniel Cordeiro da Costa.

Ao Sílvio (Funcionário do Dr. Maurício) pela amizade e pelos serviços prestados

Ao Chiquinho, Íris, e todo pessoal que trabalha no Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

A minha esposa Daniela Oliveira e ao meu filho Ian Siqueira Araújo Câmara pelo constante apoio emocional e estímulo.

Aos meus pais: Maria Cecília C. Câmara e Gerardo Paiva Câmara, por tudo (em memória).

Às minhas irmãs Beatriz Câmara, Sônia Câmara, Gerado P. Câmara e Ruth Câmara.

A todos os meus amigos da Igreja Batista que me apoiaram em oração.

Se eu estiver me esquecendo de alguém me perdoe...

Saibam que todos foram muito importantes, inclusive os que ajudaram em secreto.

Muito obrigado a todos.

Apoio financeiro do **FUNCAP e CNPq**

## RESUMO

A dor neuropática possui mecanismos de difícil compreensão que se modificam com a sua evolução dificultando a terapêutica. O modelo por constrição crônica do nervo ciático (CCNC) simula esta condição. A gabapentina (GBP) é um anticonvulsivo muito utilizado como analgésico na dor neuropática e existem poucos relatos sobre seus efeitos na atividade inflamatória e regenerativa do nervo. As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão relacionadas à dor, inflamação e regeneração neural. É objetivo deste estudo avaliar os efeitos antinociceptivos, inflamatórios e regenerativos do tratamento preventivo e contínuo (80 min antes da CCNC e depois ao longo de 5 dias de 12 em 12h) com a GBP (30, 60, 120 mg/kg, via oral) através da observação (antes, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC) dos seguintes comportamentos: (1) espontâneos sugestivos de dor crônica: *Scratching* (coçar-se) e *Biting* (morder-se) (2) relacionados à motricidade e exploração: *Climbing* (escalar), *Rearing* (empinar-se), *Walking* (andando) (3) de dor induzida: alodínia mecânica (*von Frey* eletrônico) e alodínia ao frio (10º) em ratos machos *Wistar* (250-300g) com CCNC. Animais com CCNC tratados com salina e animais pseudo-operados foram utilizados como controles. Para avaliar os efeitos anti ou pró-inflamatórios da GBP (60, 120mg/kg, via oral) utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina em animais sem CCNC e a dosagem de mieloperoxidase no nervo sob constrição crônica. Os efeitos neuro-regenerativos da GBP foram avaliados indiretamente através da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, e da proteína básica de mielina (PBM) no mesmo protocolo, sendo que no 5º dia de tratamento após CCNC, foram feitas coletas dos nervos para dosagem destas citocinas através de ELISA e imunohistoquímica, e no 5º e 15º dia para expressão de PBM através de *Western Blot* e imunohistoquímica. **Resultados:** No 5º dia, as doses de GBP 30, 60 e 120mg provocaram redução de 86,76%\*; 83,82%\*; 80,09%\* (\*p < 0,01) no tempo de *Scratching* da pata ipsilateral e uma inibição de 56,27%; 90,53%\*; 65,06%\* (\*p < 0,01) no tempo do *Biting* lado direito em relação ao grupo salina. Aliviaram a alodínia mecânica provocando aumentos do limiar de retirada da pata de 225,42%\*, 246,01%\*, 309,20%\* (\*p < 0,001) e provocaram redução do escore de dor na alodínia ao frio em 18,19%; 21,29%; 42,26%\* (\*p < 0,01) em relação ao grupo salina. As doses de GBP 60 e 120mg provocaram aumentos significativos na motricidade espontânea de animais com CCNC e intactos sugerindo efeitos estimulantes e não sedativos. A GBP 60mg/kg também provocou efeitos relevantes (p<0,001) na migração de células visto pelo aumento de 982,16% na expressão da mieloperoxidase no nervo e pelo aumento de 53% no edema de pata em relação ao controle salina. Quanto à expressão do TNF- $\alpha$  no nervo as doses de 60 e 120mg provocaram aumentos de 120,95 % e de 91,99% em relação ao grupo salina (P< 0,01). Na expressão de IL-1 $\beta$  a dose de 60mg/kg provocou aumento de 59,26% em relação ao grupo salina (P< 0,05). No *Western Blot* ocorreu um aumento significativo de 158,06% da expressão de PBM (0,298  $\pm$  0,069 PBM/Act.) no nervo no 15º dia de tratamento com GBP em relação ao grupo salina (0,116  $\pm$  0,034 PBM/Act). **Conclusões:** O tratamento com GBP ao longo de cinco dias, apesar de seus efeitos pró-inflamatórios, demonstrou no 5º dia efeitos analgésicos significativos ao reduzir comportamentos espontâneos de dor crônica e aliviar a alodínia mecânica e térmica em estágio precoce da neuropatia. Considerando-se os efeitos relevantes da GBP no 5º dia de neuropatia no aumento da migração de células para o local da lesão, no aumento da expressão de TNF e IL-1 $\beta$  no nervo, o que levaria a maior ativação das células de *Schwann*, macrófagos, e maior liberação de fator de crescimento do nervo, e no aumento da expressão de PBM indicando uma ativa fragmentação da mielina, sugere-se que a GBP pode acelerar o processo de remoção dos fragmentos de mielina e axônios contribuindo assim para o posterior alongamento dos axônios e remielinização.

**Palavras-chave:** Anticonvulsivo. Dor. Nervo ciático. Comportamento. Fator de Necrose Tumoral. Interleucina-1.

## ABSTRACT

Neuropathic pain conveys mechanisms of difficult understanding, which changes with the disease progress, jeopardizing the therapeutics. The chronic constriction of the sciatic nerve (CCSN) model mimics this condition. Gabapentin (GBP) is an anti-convulsive drug often used as analgesics to control neuropathic pain. Few reports exist on their effects in the inflammatory and regenerative activity of the nerve. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  cytokines, although related to pain and inflammation, are also associated with early myelin and axonal fragmentos removal after nerve injury and thus contribute to nerve regeneration. This study aimed at evaluating the analgesics early treatment (80 min prior to CCSN and along 5-day treatment, 12h/12h) effects of GBP (30, 60, 120 mg/kg, given orally) by monitoring (before surgery, on the 3<sup>rd</sup> day and 5<sup>th</sup> day of post-surgery treatment, 12h to 12h) the following behaviors (1) spontaneous behavior, suggestive of chronic pain: *Scratching* and *Biting* (2) motor and exploratory-related behaviors: *Climbing*, *Rearing*, and *Walking*, (3) induced-pain behaviors: mechanical allodynia (electronic *von Frey*) and cold allodynia (10°C) in Wistar male rats (250-300g) with CCSN. CCSN animals treated with saline and pseudo-operated were used as controls. Another aim of this study was to evaluate the pro and anti-inflammatory effects of GBP (60 and 120mg/kg, given orally) by carragenin-induced paw edema in CCSN-free animals and yet nerve myeloperoxidase measurements under chronic constriction. The neural regenerative effects of GBP were indirectly evaluated by measuring TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, and myelin basic protein (PBM) expressions in the same protocol, as follows: 5<sup>th</sup> day of treatment following CCSN to draw nerves in order to quantify cytokines by ELISA and immunohistochemistry, and for MPB expression detected by Western blot and immunohistochemistry on the 5<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup>. **Results:** On the 5<sup>th</sup> day, GBP, at doses of 30, 60 and 120mg, reduced the scratching time in the ipsilateral paw of 86.76%\*; 83.82%\*; 80.09%\* (\*p<0.01) and an inhibition of the biting time of 56.27%; 90.53%\*; 65.06%\* (\*p<0.01) in the right side in comparison with the saline group. In addition, GBP alleviated mechanical allodynia causing increase paw retrieval thresholds of 225.42%\*, 246.01%\*, 309.20%\* (\*p <0.001) and the reduction of the pain scores for cold allodynia in the range of 18.19%; 21.29%; 42.26%\* (\*p < 0.01) in comparison with the saline group. GBP, at doses of 60 and 120mg, significantly increased spontaneous motricity in CCSN animals and controls suggesting excitatory effects rather than sedation. GBP (60 mg/kg) also caused relevant effects (p<0.001) in peritoneal cell migration, and a 982.16% increase in nerve myeloperoxidase expression and 53% increase in paw edema, as opposed to the saline control. Regarding nerve TNF- $\alpha$  expression, doses of 60 and 120mg caused significant increase of 120.95 % and 91.99% in comparison with the saline group (p<0.01). A dose of 60mg/kg caused 59.26% increase in IL-1 $\beta$  expression compared with the saline group (p<0.05). We found a 158% significant increase in PBM expression by western blots (0.298  $\pm$  0.069 PBM/Act) on the 15<sup>th</sup> treatment-day with GPB in comparison with the saline control (0.116  $\pm$  0.034 PBM/Act). **Conclusions:** 5-day GBP treatment, although with pro-inflammatory effects, was found to have significant pain killing effects by reducing chronic spontaneous pain behaviors and by alleviating mechanical and thermal allodynia in the early neuropathy course. By taking our relevant findings of increasing migration cell rates to the nerve injury site on the 5<sup>th</sup> day of the neuropathy and the nerve TNF and IL-1 $\beta$  expression with more macrophage and Schwann cell activation and supposedly more nerve growth factor release, along with higher PBM expression, altogether suggest that GBP may hasten the myelin and axonal fragmentos withdrawn, therefore contributing to axonal outgrowth and ultimately remyelination.

**Key words:** anticonvulsive drug, pain, sciatic nerve, behavior, tumoral necrosis factor, interleukin-1

## ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Teste estatístico da análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BK	Bradicinina
Ca <sup>++</sup>	Íon Cálcio
CCVD	Canais de Cálcio Voltagem Dependentes
Cg	Carragenina
C5a	Quinto componente sistema complemento ativado
CCNC	Constricção crônica do nervo ciático
DNA	Acido Desoxirribonucléico
DW	Degeneração Walleriana
EPM	Erro Padrão da Média
GBP	Gabapentina
g	grama
GCSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
GABA <sub>R</sub>	Receptor do Ácido Gama Amino Butírico
GABA <sub>B</sub>	Receptor B do Ácido Gama Amino Butírico
IFN	Interferon
IL-1 $\beta$	Interleucina- 1 $\beta$
IL-10	Interleucina-10
IL	Interleucina
K <sup>+</sup>	Íon potássio
Kg	Kilograma
Kg.p.v.	Kilograma por peso vivo
L	Litro
LRP	Limiar de retirada da pata
L-NAME	L-NG-nitro arginine methyl ester
LPS	Lipopolissacarídeo de bactéria

MCAF	Fator ativador e quimiotático para monócito
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
MPO	Mieloperoxidase
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetros
N	Número de animais por grupo
NO	Óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
NOSi	enzima óxido nítrico sintase induzida
NOSc	enzima óxido nítrico sintase constitutiva
PBM	Proteína básica de mielina
PGB	Pregabalina
RNA	ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real
s.c.	subcutâneo
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose Tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
sTNFR	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral
TRP	Tempo de Retirada da Pata
VWA	Von Willebrand factor-A" (domínio)
µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
<	menor que
>	maior que
*	significativo em relação ao controle salina
#	significativo em relação ao controle <i>sham</i>

## LISTA DE FIGURAS

- 1 Atividade ectópica em fibras sensitivas danificadas: O aumento da expressão de receptores VR1 e P2X<sub>3</sub> e de canais de sódio provocam despolarizações ectópicas em fibras C ou A.....23
- 2 Laminas do corno dorsal da medula espinal: Sítios de chegada de aferentes nociceptivos, temperatura (lamina I e II) e proprioceptivos (lamina V).....25
- 3 Brotamento de fibras A $\beta$  no corno dorsal da medula: alcançando às lâminas I e III, ou mais profundas permitindo conexões sinápticas com a lâmina II, sítio de chegada de aferentes nociceptivos, provocando a expressão clínica da dor neuropática.....26
- 4 Representação esquemática de diferentes lesões através de ligaduras em nervos periféricos para indução de neuropatias.....29
- 5 Estrutura molecular da gabapentina.....32
- 6 Canal de cálcio voltagem-dependente de alta voltagem (CCVD/HVA).....36
- 7 Suposto mecanismo para a ação da GBP em canais de cálcio voltagem dependente (CCVD).....38
- 8 Supostas vias de sinalização intracelular das superfamílias de receptores do fator de necrose tumoral (TNF).....53
- 9 Liberação de TNF logo após lesão neural e recrutamento de monócitos, macrófagos e células T.....66
- 10 Resposta rápida de TNF à injúria neural: Análise semiquantitativa da reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) dos níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  no segmento distal de nervos ciáticos em camundongos C57BL ao longo do tempo (dias) após esmagamento (*Crush*).....67
- 11 Níveis de proteínas de TNF- $\alpha$  ao longo da DW: Imunoreatividade para proteínas de TNF- $\alpha$  determinada por densitometria quantitativa em seções de nervo Ciático de ratos (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica.....68
- 12 Resposta rápida de IL-1  $\beta$  à injúria neural: Análise semiquantitativa da reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) dos níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  no segmento distal de nervo ciático de camundongos C57BL ao longo do tempo após esmagamento (*Crush*).....70

13	Níveis de proteínas de IL-1 $\beta$ ao longo da DW : Imunoreatividade para proteínas de IL-1 $\beta$ determinada por densitometria quantitativa em seções de nervo ciático de ratos (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica.....	71
14	Depleção de IL-10 logo no início da DW: Imunoreatividade para proteínas de IL-10 em seções de nervo ciático determinada por densitometria quantitativa em animais (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica.....	72
15	Participação das células de <i>Schwann</i> no alongamento de axônios liberando fatores de crescimento (NGF e GDNF) e formação das <i>bands of Büngner</i> .....	73
16	Painel A: Protocolo das observações de comportamentos espontâneos. Painel B: Caixa de observação dos comportamentos espontâneos.....	85
17	(A) Equipamento e (B) gaiola de contenção para teste de sensibilidade mecânica ( <i>Von Frey</i> ). (C) Esquema da aplicação do teste.....	87
18	Protocolo para teste de sensibilidade mecânica ( <i>Von Frey</i> ). O Limiar de retirada da pata (LRP) foi obtido antes, no 3 $^{\circ}$ e 5 $^{\circ}$ dia após a CCNC Delineamento das observações de comportamentos espontâneos.....	88
19	Execução do teste de alodínia ao frio 10 $^{\circ}$ C (Teste da Acetona).....	89
20	Execução do teste de hiperalgesia térmica ao calor de (46 $^{\circ}$ ).....	90
21	Delineamento do edema de pata induzido por carragenina e equipamento utilizado para medir o volume de edema (pletismômetro).....	92
22	Delineamento da migração de células para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em ratos <i>Wistar</i> .....	94
23	Esquema da coleta do nervo ciático para estudos de Elisa, <i>Western Blot</i> (WB), imunohistoquímica, mieloperoxidase (MPO) e MEV.....	95
24	Leitora de Placa.....	97
25	Aparelhos para eletroforese.....	99
26	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg, via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Scratching</i> .....	105
27	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Biting</i> .....	107
28	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg.p.v.) no tempo (s.) do comportamento <i>Lking</i> (lamber-se).....	108

29	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Rearing</i> .....	110
30	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg, via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Climbing</i> .....	112
31	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Walking</i> (andando).....	114
32	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Grooming</i> (escovando-se).....	116
33	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Sniffing</i> (cheirando).....	118
34	Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (seg.) do comportamento <i>Resting-Sleeping</i> (descansando ou dormindo) .....	120
35	Efeito da GBP (Zero, 30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento de imobilidade.....	122
36	Efeito da GBP (Zero, 30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento <i>Eating-Gnawing</i> . (comendo ou roendo) em ratos neuropáticos tratados cronicamente ao longo de cinco dias.....	124
37	Efeito da GBP (0, 30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na sensibilidade mecânica ( <i>von Frey</i> ).....	127
38	Efeito da GBP (0, 30, 60, 120, 240mg/kg. via oral) no teste de sensibilidade ao frio, 10°C (teste da acetona).....	129
39	Efeito da GBP (0, 30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na hiperalgesia térmica (sensibilidade ao calor, 46°C).....	131
40	Efeito da GBP no edema de pata induzido por carragenina em ratos não neuropáticos (Normais) tratados cronicamente ao longo de 5 dias.....	133
41	Efeito da GBP na migração de células para cavidade peritoneal induzida por carragenina (300µg).....	135
42	Efeito da GBP na contagem diferencial de células migradas para cavidade peritoneal.....	136
43	Efeito do tratamento com a GBP (60 e 120mg/kg., via oral) na atividade da mieloperoxidase (MPO).....	138
44	Placa de Elisa com 96 poços: mostrando a coloração com 1 minuto de reação após a aplicação da solução de leitura.....	139
45	Fotografias de nervos ciáticos coletados após cinco dias da constrição crônica:.....	140

46	Expressão de citocinas em nervo ciático de ratos com CCNC tratados com GBP ao longo de cinco dias.....	142
47	Expressão de PBM em <i>Western Blot</i> de nervo ciático de ratos com CCNC tratados com GBP ao longo de cinco dias (Painel A) ou quinze (15) dias (Painel B).....	144
48	Tratamento crônico (cinco dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-IL-1 em nervo ciático de ratos com CCNC.....	147
49	Tratamento crônico (05 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-TNF-alfa em nervo ciático de ratos com CCNC.....	148
50	Tratamento crônico (05 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com Anticorpo Anti-PBM em nervo Ciático de ratos com CCNC.....	149
51	Tratamento crônico (15 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo Anti-PBM em nervo ciático de ratos com CCNC. Corte longitudinal.....	150
52	Tratamento crônico (15 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-PBM em nervo ciático de ratos com CCNC. Corte transversal.....	151

### **Índice de Tabelas**

1. Classificação fisiológica e funções das fibras sensitivas.....	24
2. Modelos e grupos experimentais utilizados para observação dos comportamentos.....	83
3. Tabela de resultados dos comportamentos espontâneos (nos anexos).....	218

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1</b>	<b>Dor.....</b>	<b>20</b>
1.1.1	Dor neuropática.....	20
1.1.1.1	Mecanismos da dor neuropática.....	22
1.1.1.2	Modelos animais que utilizam constrição de nervo.....	27
1.1.1.3	Tratamento para a dor Neuropática.....	31
<b>1.2</b>	<b>Gabapentina.....</b>	<b>32</b>
1.2.1	Estrutura Química.....	32
1.2.2	Histórico da gabapentina.....	32
1.2.3	Uso clínico da gabapentina.....	33
1.2.4	Farmacocinética.....	33
1.2.5	Mecanismos de ação da gabapentina.....	34
1.2.5.1	Em receptores para o ácido gama amino butírico (GABA <sub>r</sub> ).....	34
1.2.5.2	Em canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD).....	35
1.2.5.3	Inibição em Canais de Cálcio tipo P/Q (pré-sinápticos)/ Glutamato.....	39
1.2.5.4	Gabapentina e liberação de neurotransmissores monoaminados.....	39
1.2.5.5	Gabapentina em estudos eletrofisiológicos (inibindo descargas ectópicas).....	40
1.2.5.6	Gabapentina e iNOS / NO-GMPc-PKG-Canais de K <sup>+</sup> .....	40
1.2.6	Efeitos da gabapentina nos modelos animais de ansiedade.....	41
1.2.7	Efeitos neuroprotetores da gabapentina.....	43
1.2.8	Estudos da gabapentina em modelos de dor neuropática experimental.....	47
1.2.9	Estudos da gabapentina em modelos de nocicepção aguda e inflamação.....	47
<b>1.3</b>	<b>Citocinas: Generalidades .....</b>	<b>50</b>
1.3.1	O Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	51
1.3.2	Interleucina -1 (IL-1).....	55
1.3.3	Interleucina -10 (IL-10).....	56
1.3.4	Citocinas e dor.....	57
1.3.5	Citocinas e inibição da resposta inflamatória e nociceptiva.....	60

1.4.	<b>Degeneração Walleriana (Dw), Inflamação e Sistema Imune.....</b>	62
1.4.1	Degeneração axonal aguda.....	64
1.4.2	Citocinas envolvidas na degeneração Walleriana (DW).....	65
1.4.2.1	Degeneração Walleriana e TNF- $\alpha$ .....	65
1.4.2.2	Degeneração Walleriana e Interleucina-1 (IL-1).....	70
1.4.2.3	Degeneração Walleriana e Interleucina-10 (IL-10).....	71
1.5	<b>Regeneração Neural.....</b>	73
1.5.1	Remielinização.....	75
1.5.2	Proteína Básica da Mielina – PBM.....	75
<b>1.6</b>	<b>Justificativa.....</b>	77
<b>1.7</b>	<b>Objetivos.....</b>	78
1.7.1	Objetivo Geral.....	78
1.7.2	Objetivos Específicos.....	78
<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS:.....</b>	79
2.1	Local de realização do trabalho:.....	79
2.2	Animais.....	79
2.3	Soluções, drogas e corantes utilizados.....	80
2.4	Aparelhos e equipamentos laboratoriais.....	81
2.5	Tratamento dos animais.....	82
<b>2.6</b>	<b>Modelo de indução de neuropatia - Constrição Crônica do Nervo Ciático</b>	82
<b>2.7</b>	<b>Modelos para observação dos comportamentos.....</b>	82
2.7.1	Observação de comportamentos espontâneos.....	84
2.7.2	Estudo comportamental de dor induzida em ratos neuropáticos.....	86
2.7.2.1	Teste de alodínia mecânica ( <i>Von Frey</i> eletrônico).....	86
2.7.2.2	Teste de sensibilidade térmica ao frio (10°C, teste da acetona).....	88
2.7.2.3	Teste de sensibilidade térmica ao calor de 46° (Hiperalgisia Térmica).....	90
<b>2.8</b>	<b>Estudo inflamatório.....</b>	91
2.8.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	91
2.8.2	Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina..	93
<b>2.9</b>	<b>Estudo molecular.....</b>	95
2.9.1	Ensaio de dosagem da mieloperoxidase (MPO).....	96
2.9.2	Dosagem de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 por Elisa.....	96
2.9.3	Western Blotting – Expressão de proteína básica de mielina (PBM) no nervo	98

2.9.4	Imunohistoquímica.....	100
<b>2.10</b>	<b>Estatística.....</b>	<b>101</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>102</b>
<b>3.1</b>	<b>Efeito da GBP nos comportamentos espontâneos.....</b>	<b>103</b>
3.1.1	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Scratching</i> (coçar-se).....	103
3.1.2	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Biting</i> (morder-se).....	106
3.1.3	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Liking</i> (lamber-se).....	108
3.1.4	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Rearing</i> (empinar-se).....	109
3.1.5	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Climbing</i> (escalar).....	111
3.1.6	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Walking</i> (Andando).....	113
3.1.7	Efeito da gabapentina no comportamento <i>grooming</i> (escovar-se).....	115
3.1.8	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Sniffing</i> (Cheirar).....	117
3.1.9	Efeito da gabapentina no comportamento <i>rest-sleeping</i> (descansar ou dormir)	119
3.1.10	Efeito da gabapentina no comportamento imobilidade .....	121
3.1.11	Efeito da gabapentina no comportamento <i>eating-gnawing</i> .....	123
3.1.12	Efeito da gabapentina no comportamento <i>Freezing</i> (congelar-se).....	125
<b>3.2</b>	<b>Efeitos da GBP nos comportamentos de dor induzida.....</b>	<b>126</b>
3.2.1	Efeito da gabapentina na sensibilidade mecânica ( <i>von Frey</i> ).....	126
3.2.2	Efeito da gabapentina na sensibilidade ao frio (10°C) (“ <i>Teste da acetona</i> ”)....	128
3.2.3	Efeito da gabapentina na sensibilidade ao calor (46°C) (hiperalgesia térmica).	130
3.3	Estudo Inflamatório.....	132
3.3.1	Efeitos da gabapentina no edema de pata induzido por carragenina.....	132
3.3.2	Efeito da gabapentina na migração de células para cavidade peritoneal.....	134
3.3.3	Contagem diferencial na migração de células para cavidade peritoneal.....	134
<b>3.4</b>	<b>Estudo Molecular.....</b>	<b>137</b>
3.4.4	Efeito da gabapentina na atividade da mieloperoxidase em pele de pata.....	137
3.4.5	Efeito da gabapentina na atividade da mieloperoxidase em nervo ciático.....	137
3.4.6	Efeito da gabapentina na expressão do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).....	141
3.4.7	Efeito da gabapentina na expressão da interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	141
3.4.8	Efeito da gabapentina na expressão da interleucina-10 (IL-10).....	141
3.4.9	Efeito da gabapentina na expressão da proteína básica de mielina (PBM).....	143
3.4.10	Efeito da gabapentina na expressão da PBM (15 dias de tratamento).....	143

3.4.11	Expressão de IL-1 por imunohistoquímica (após 05 dias de tratamento).....	145
3.4.12	Expressão de TNF-alfa por imunohistoquímica (após 05 dias de tratamento)	145
3.4.13	Estudo da remodelação do nervo.....	146
3.4.13.1	Expressão de PBM por imunohistoquímica (após 05 dias de tratamento).....	146
3.4.13.2	Expressão de PBM por Imunohistoquímica (após 15 dias de tratamento).....	146
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>153</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>186</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>189</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>212</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dor

A *International Association for the study of Pain* (IASP) definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual presente ou em potencial” (IASP, 1983). A dor é sempre subjetiva, cada indivíduo expressa a sua dor de acordo com o aprendizado frente as suas experiências prévias. Envolve sensações físicas e psíquicas o que a torna difícil defini-la e tratá-la, sendo responsável pela maioria das queixas dos pacientes.

Essa definição se mostra limitada quando se levam em conta aspectos tais como expressão neurológica clínica, correlação entre lesão e dor e suas respectivas comprovações (KOLTZENBURG, 2002).

A dor é uma condição inerente à vida. Foi considerada no passado um fator “ofensivo” ao indivíduo; simplesmente uma fonte de sofrimento e expressão de uma punição. O pensamento moderno identifica a dor como um sinal de presença de um “defensor” que alerta para existência de algum comprometimento da integridade física ou funcional do indivíduo, permitindo que mecanismos que propiciam prevenir ou limitar o agravamento de lesões teciduais sejam acionados. Sem a participação das unidades nociceptivas, a vida normal seria impossível (TEIXEIRA; FIGUERÓ, 2001).

Cumprido o seu valor biológico de alerta, a dor quando se torna crônica pode constituir razão para incapacidade funcional, situação esta que justifica medidas destinadas à sua supressão. Entretanto, muitas vezes manifesta-se mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, tal como ocorre em casos de neuropatia periférica ou central e em certas afecções psicopatológicas (TEIXEIRA; FIGUERÓ, 2001).

Existem várias formas de se descrever a dor, podendo ser descrita de acordo com o local de origem ou suas características temporais (GIGLI, 1999). Pode ser dividida de acordo com sua intensidade e duração, em dor aguda e dor crônica.

A dor crônica se prolonga por mais de seis meses e seus mecanismos não estão bem esclarecidos, o que dificulta uma terapêutica adequada e eficiente (KUPERS, 1994). Persiste além do tempo esperado de cura e geralmente não pode ser atribuída aos efeitos de uma lesão específica, apresentando ou não um início bem definido. Leva os pacientes a mudanças emocionais e vegetativas que influenciam comportamentos, com repercussões de ordem social e econômica para a família e sociedade.

Do ponto de vista orgânico, a dor crônica é causada por processos patológicos envolvendo estruturas somáticas (dor nociceptiva) ou do sistema nervoso periférico (nervos, gânglios e raízes) e central (medula, tálamo e córtex) ou ambos. A dor neuropática é resultado de lesões diretamente no sistema nervoso central ou periférico (DEVOR; SELTZER, 1999).

### **1.1.2. Dor neuropática**

É conceituada como sendo uma “dor por consequência direta de lesão ou doença afetando o sistema somato-sensitivo periférico ou central” (TREED *et al.*, 2008).

A dor neuropática é um problema comum na clínica neurológica. Faz parte de várias síndromes neurológicas e representa cerca de 25% dos sintomas observados em pacientes tratados em grandes clínicas de dor. Segundo Bennett (1994), estima-se que ela afete 1,5 % da população mundial. A dor neuropática é uma freqüente complicação de traumas acidentais, cirurgias e doenças que afetam o sistema nervoso central ou periférico.

Até o momento, não temos um sistema de classificação pontual para dor neuropática de forma a considerá-la como definida, provável ou possível, como existe em outras condições (WOLFE *et al.*, 1990), o que torna ainda mais difícil defini-la. Além disso, há situações com lesão neural definida, sem exibição de dor, como na síndrome de pernas inquietas, e condições com dor sem lesão neural comprovada, como nas neuralgias (GRIFFIN; MCARTHUR; POLYDEFKIS, 2001). Por outro lado, a origem da dor pode ser de neurônios não-lesados projetando-se para nervos lesados (KOLTZENBURG *et al.*, 1994a; ALI *et al.*, 1999).

De um modo geral, entretanto, podemos classificar a dor neuropática como central e periférica, quando se tem certeza da lesão neural definida nesses sítios. Entretanto, uma classificação baseada em mecanismos e sintomas poderia fornecer maior suporte para uma terapia adequada (KOLTZENBURG, 1996). A dificuldade para essa classificação está relacionada à detecção de lesão e disfunção neural por métodos ainda imperfeitos tais como exame de sensibilidade, métodos eletrofisiológicos, escalas de quantificação de dor, biópsia de nervo e métodos de neuroimagem, como a ressonância magnética (GRANT *et al.*, 2002; GALER; JENSEN, 1997).

A dor neuropática tem não apenas a sintomatologia diversa, mas as etiologias são abundantes, incluindo câncer, artrite, doenças vasculares, traumatismos (KUPERS *et al.*, 1992), neuropatias diabéticas e alcoólicas, neuromas, causalgia, dor do membro fantasma, síndrome talâmica, etc. É circundada por um número variado de síndromes de dor, no entanto, tem em comum a presença de hiperalgesia e/ou alodínia, dor espontânea e paraestesia

(BENNETT, 1994), sugerindo que existem mecanismos fundamentais que são comuns nas diferentes síndromes (WOOLF; MANION, 1999).

Um dos importantes desafios para a compreensão e eficácia terapêutica da dor neuropática vem da dificuldade de compreender os mecanismos subjacentes, tanto periféricos como centrais. Acrescido a isso, temos que considerar a mudança dinâmica dessas estruturas periféricas e centrais em consequência da neuroplasticidade. Esse fenômeno pode levar à diversidade de mecanismos ao longo da evolução temporal da condição. Nesse contexto, receptores de membrana e canais iônicos, igualmente, podem sofrer diversidade, tornando assim a intervenção terapêutica caótica e imprevisível dentro da bruma de sintomas inespecíficos (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1981)

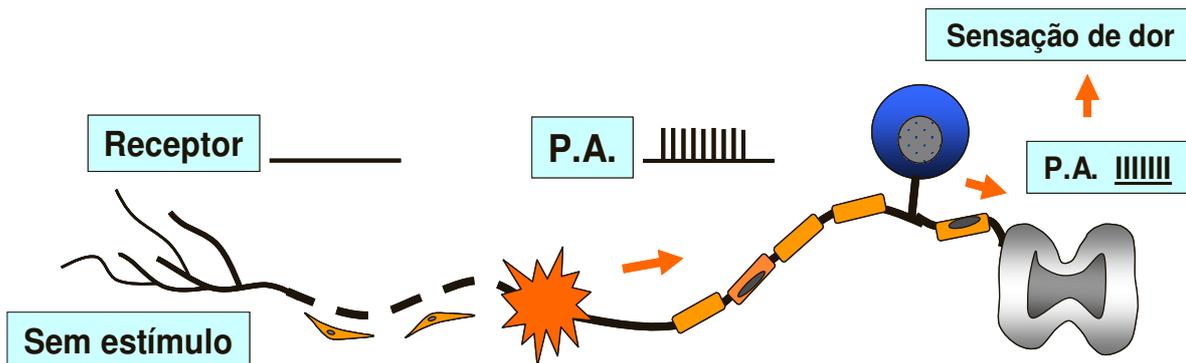
### **1.1.2.1. Mecanismos da dor neuropática**

Os mecanismos envolvidos na gênese da dor neuropática repousam sobre alterações eletrofisiológicas e de expressão gênica em neurônios.

As alterações eletrofisiológicas são expressas por atividade elétrica contínua anormal a partir de neuromas, já descrita por Wall e Gutnick (1974). Essa atividade elétrica anormal origina-se após lesão neural em neurônios aferentes axotomizados (DEVOR; SELTZER, 1999) e pode induzir sensibilização central (CODERRE *et al.*, 1993).

As fibras sensitivas lesadas sofrem alterações gênicas decorrentes de vários processos. Ao iniciarem o processo de degeneração Walleriana ficam separadas das fontes periféricas de fatores de crescimento (McMAHON; BENNETT, 1999), sendo isso uma das supostas causas que levam às alterações gênicas no corpo celular, cuja expressão pode ser a alteração do tipo e nível de neurotransmissor ou modulador tal como diminuição da substância P e BDNF na fibra C ou aumento de galanina e substância P em fibras A $\beta$  (MALCANGIO *et al.*, 2000), que parece ser importante para o processo de sensibilização central (WOOLF; SLATER, 2000). Outras alterações gênicas envolvem o aumento de expressão dos receptores VR1 e P2X<sub>3</sub> e de canais de sódio do tipo III ou Na V 1.3, Na V 1.4, Na V 1.7, Na V 1.8 SNS e Na V 1.9, o que pode explicar a atividade ectópica nas fibras danificadas (ver figura 1). Os receptores vanilóides (VR1) são canais catiônicos permeáveis a Na<sup>+</sup> e principalmente a Ca<sup>++</sup>, podendo ser ativado por baixo pH, altas temperaturas e alguns ligantes endógenos. São essenciais para o desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia térmica e alodínia relacionadas à inflamação e injúria tecidual. Os receptores purinérgicos (P2X) estão acoplados a canais de cátions ativados por ATP e são mediadores de corrente em neurônios sensitivos. A ativação destes

receptores por ATP causa despolarização. Também são importantes na nocicepção e estão localizados nos gânglios da raiz dorsal, lamina II da medula espinal e núcleo do trato solitário (FUKUOKA *et al.*, 2000).



**Figura 1** - Atividade ectópica em fibras sensitivas danificadas: O aumento da expressão de receptores vanilóides (VR1) e purinérgicos (P2X<sub>3</sub>) e de canais de sódio dependentes de voltagem (NaV) provoca despolarizações ectópicas em fibras C ou A. Obs.: P.A. = Potencial de Ação. Fonte: Fukuoka *et al.* (2000)

Por outro lado, os neurônios sensitivos poupados (intactos), inclusive as fibras tipo A $\beta$ , são também alvos de alterações gênicas, visto que ocorre um aumento da disponibilidade de fatores de crescimento na periferia para estas fibras, assim estes fatores podem se tornar um gatilho para as alterações gênicas. Desse modo, um aumento de disponibilidade de NGF leva a maior liberação de substância P pelas fibras A $\beta$ , *up-regulation* de receptores VR1 e P2X<sub>3</sub> (FUKUOKA *et al.*, 2000) e, em menor proporção, de canais de sódio apenas do tipo III ou Na V 1.8 (BOUCHER *et al.*, 2000), levando à expressão de maior atividade elétrica espontânea nessas fibras (MICHAELIS; LIU; JÄNIG, 2000). Assim o comprometimento paralelo de fibras A $\beta$  parece também ser importante para a manutenção da sensibilização central (BOUCHER *et al.*, 2000). Tal atividade elétrica espontânea parece existir também em aferentes não-mielinizados (fibras C) poupados da lesão (ALI *et al.*, 1999). (ver tipos de fibras na tabela 1).

**Tabela 1 - Classificação fisiológica e funções das fibras sensitivas**

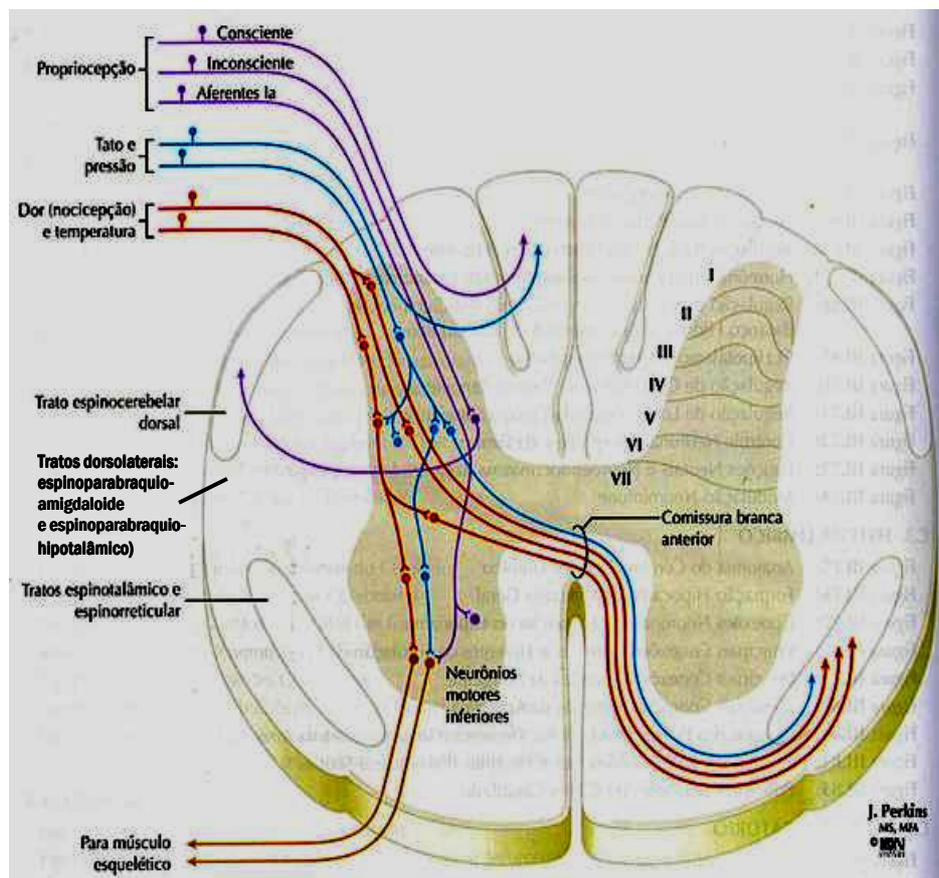
Fibra	Média do Diâmetro	Mielina	Velocidade de condução média	Sensação:
A $\alpha$	~17 $\mu\text{m}$ (micrometros)	presente	80 a 120m/s	Propriocepção : Fuso neuromuscular, òrgão tendinoso de Golgi
A $\beta$	~ 9 $\mu\text{m}$	presente	35 a 80 m/s	Tato fino e Vibração
A $\gamma$	~ 6 $\mu\text{m}$	presente	10 a 60 m/s	Pressão profunda e tato, receptores pilosos
A $\delta$	~3 $\mu\text{m}$	presente	5 a 35 m/s	<b>Dor</b> em alfinetada, profunda, tato grosseiro e pressão, <b>frio</b>
C	0,5 a 2,0 $\mu\text{m}$	ausente	0,5 a 2,0 m/s	<b>Dor</b> contínua, prurido, frio e calor, tato grosseiro e pressão
C	0,2 a 1 $\mu\text{m}$	ausente	0,5 a 1,0 m/s	Cócegas, <b>dor</b> contínua, prurido, <b>calor</b> , tato grosseiro

Nota: As fibras aumentam de diâmetro do tipo C ao tipo A $\alpha$ . As fibras do tipo A $\delta$  e C conduzem sensações de dor. Obs. A sensação de frio compreende fibras mais espêssas. A sensação de calor é conduzidas por fibras mais delgadas

Fonte: (CRUCCU *et al.*, 2004; SCHESTATSKY P. 2008)

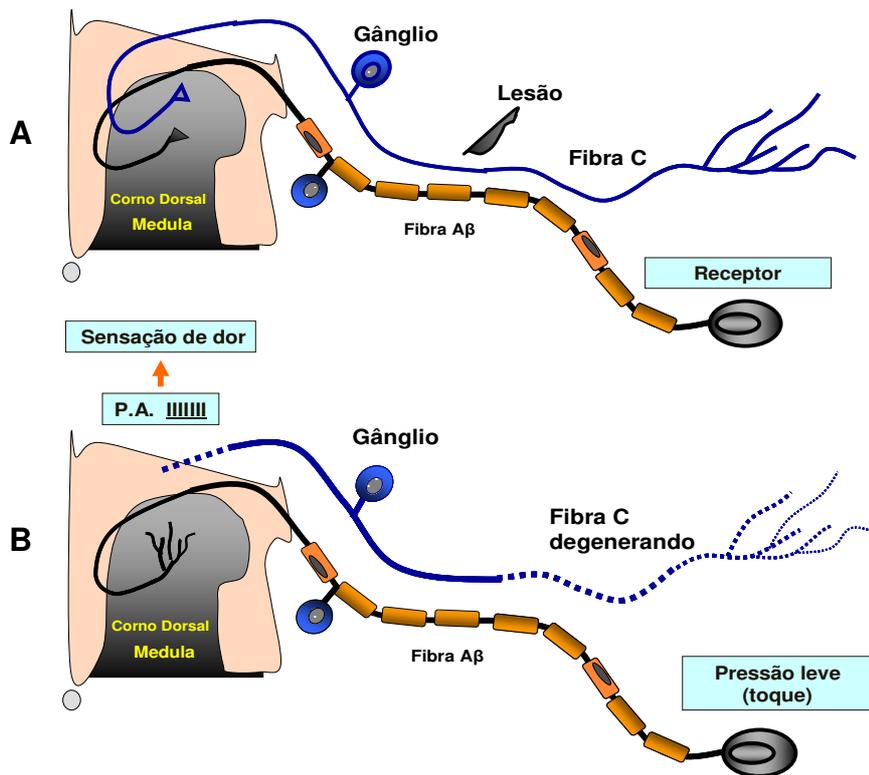
Alterações estruturais tais como brotamento de fibras A $\beta$  (mecanorreceptores de baixo limiar) no corno dorsal da medula podem estar implicadas no processo de dor neuropática. Esse brotamento de fibras A $\beta$ , que normalmente chega às lâminas I e II, ou mais profundas, permite conexões sinápticas com a lâmina II, sítio de chegada de aferentes nociceptivos da fibra C, ampliando o campo receptivo do neurônio e facilitando a interpretação de estímulos mecânicos periféricos inócuos como agressivos e causadores de sensação de dor, constituindo o sintoma clínico denominado alodínia mecânica (MANNION; WOOLF, 2000; WOOLF *et al.*, 1992; BENNETT *et al.*, 1996; MANNION *et al.*, 1996). Ver figura 2 e 3.

Outra possibilidade seria a do brotamento de axônio noradrenérgico simpático no gânglio da raiz dorsal, ao redor de neurônios de diâmetro largo (fibras A $\delta$ ), sugerindo a hipótese da ativação de fibras aferentes sensitivas após a estimulação simpática (CHOI, ROWBOTHAM, 1997). Além disso, pode existir alguma desproporção entre as vias excitatórias e as de supressão da dor, com redução da atividade inibitória da glicina, do GABA e dos opióides endógenos (McMAHON, 2002).



**Figura 2.** Laminae do corno dorsal da medula espinal: Sítios de chegada de aferentes nociceptivos, temperatura (lamina I e II) e proprioceptivos (lamina V).

Fonte: Neuroanatomia Humana de Barr. Kierman, J.A. 2007.



**Figura 3** – Depois da lesão neural em fibras C (painel A), brotamento de fibras A $\beta$  no corno dorsal da medula (painel B): alcançando a lâmina II, sítio de chegada de aferentes nociceptivos, provocando a expressão clínica da dor neuropática.

Fonte: Woolf *et al.* (1992); Bennett *et al.* (1996) Mannion *et al.* (1996).

(desenho de Carlos Campos Câmara).

A influência do sistema nervoso simpático em quadros de dor neuropática é muito relevante. A Síndrome complexa regional é o quadro clínico que se manifesta normalmente com dor intensa nas extremidades. Os pacientes apresentam edema, hiperalgesia ou alteração motora que pode melhorar com o emprego de bloqueio simpático ou de antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, indicando um componente simpático. Em modelos animais de dor neuropática de SNL no nível de L<sub>6</sub>, mais de 60% dos nociceptores intactos exibem atividade espontânea e mais de 50% respondem a antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (GARCIA-LARREA; MAGNIN, 2008; CAMPBELL; MEYER, 2006).

Outro dilema envolvendo as dores neuropáticas e nociceptivas reside no desenvolvimento de sensibilização neuronal mediada por receptor de NMDA. A hiperalgesia térmica é mediada primariamente por fibras C sensitivas, as quais produzem suas ações na medula espinal, principalmente via receptores de glutamato tipo NMDA, nos neurônios do corno dorsal da medula espinal (TAYLOR *et al.*, 1998). Antagonistas de receptores tipo

NMDA possuem efeitos analgésicos e neuroprotetores, no entanto, apresentam muitos efeitos colaterais (LAGRÉZE, 1998; LAGRÉZE, 1999; PARSONS, 1998). A inibição pré-sináptica da liberação de glutamato possui efeitos neuroprotetores e parece ser uma melhor alternativa, pois não causa os efeitos colaterais normalmente provocados pelos antagonistas de receptores tipo NMDA e AMPA (LAGRÉZE, 2001).

A dor neuropática responde pobremente aos opióides e aos antiinflamatórios não esteroidais, e vem sendo tratada com drogas anti-epilépticas e antidepressivas; entretanto, ambas têm um uso limitado devido aos seus efeitos adversos (BACKONJA, 2000; TREMONT - LUKATS *et al.*, 2000).

A dor neuropática ainda é um desafio para os pesquisadores clínicos e experimentais. Os complexos mecanismos, não estão completamente elucidados e se desenvolvem de forma dinâmica com resultados, por vezes, contraditórios. Entender a neurobiologia da dor neuropática é um passo para melhoria no tratamento dessa síndrome. Essa compreensão poderá resultar na elaboração de fármacos que visem alvos específicos e que proporcionem respostas eficazes.

#### **1.1.2.2. Modelos animais que utilizam constrição de nervos para o estudo da dor crônica:**

Ao longo dos anos muitas pesquisas têm sido realizadas objetivando desvendar os mecanismos que envolvem a dor neuropática crônica, para com isso aliviá-la e/ou curá-la. Para tentar compreender esses mecanismos muitos modelos animais foram desenvolvidos, pois os modelos humanos permitem apenas medir a dor evocada e espontânea através de escalas de dor. Porém, são limitados, pois restringem os processos invasivos e farmacológicos.

Os modelos animais de estudo da dor podem ser espontâneos ou induzidos. O primeiro ocorre em aparatos onde os animais manifestam a dor sem haver nenhum estímulo externo e o segundo ocorre em sistemas onde os animais manifestam a dor como resposta a algum estímulo como, por exemplo, o estímulo térmico (frio ou calor), mecânico (pressão), químico, etc.

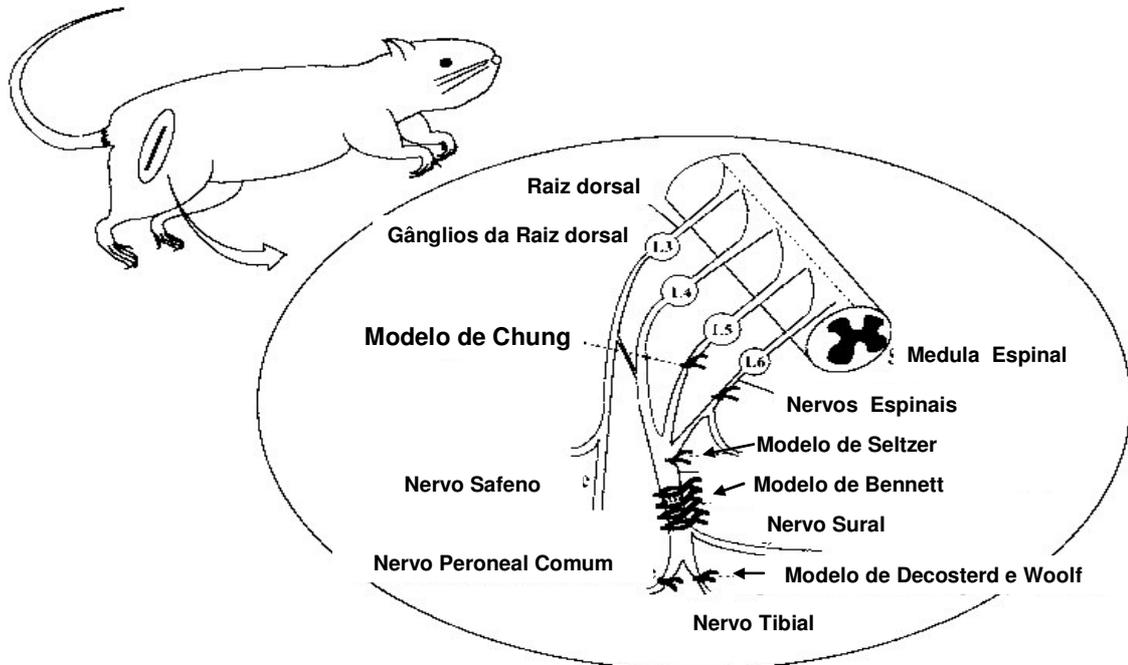
Os modelos desenvolvidos se dividem em nociceptivos e neuropáticos. Nos modelos animais de dor crônica, detectam-se seus sinais através das mudanças de vários comportamentos (MORTON; GRIFFITHS, 1985). Os modelos de poliartrite adjuvante e sua variante, a monoartrite adjuvante, representam parcialmente os modelos de dor crônica

nociceptiva (COLPAERT *et al.*, 1980; DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1981). Esses modelos nos permitem estudar as dores com envolvimento das vias nociceptivas, enquanto que as dores neuropáticas são estudadas pelos modelos da ligadura parcial de nervos periféricos ou a partir de modelos de neuropatias induzidos por quimioterápicos ou ainda por diabetes induzida (por exemplo, com estreptozotocina). Na figura 4, são esquematizados somente os modelos com ligadura de nervo.

Um modelo bastante utilizado é o modelo desenvolvido por Bennett e Xie (1988), que consiste na constrição crônica unilateral do nervo ciático utilizando-se ligaduras frouxas em torno do terço médio do nervo. Mais tarde este modelo foi modificado por Seltzer, Dubner e Shir (1990) consistindo na transfixação e ligadura firme entre um terço à metade do nervo ciático por meio de uma sutura com fio de seda, criando assim uma desnervação parcial. Mais recentemente, Decosterd e Woolf (2000) desenvolveram uma variante desse modelo ligando um ou mais dos ramos do nervo ciático, restringindo assim a área de inervação. Nestes modelos verificou-se o aparecimento de alodínia e hiperalgesia (JAZAT; GUILBAUD, 1991; KUPERS *et al.*, 1992). Existe ainda o modelo do neuroma (WALL *et al.*, 1979), da rizotomia dorsal (BASBAUM, 1974; LOMBARD *et al.*, 1979) e o modelo desenvolvido por Kim e Chung (1992), onde é feita uma ligadura de um ou dois nervos espinhais (L5 ou L5 e L6). Esses modelos levaram ao desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, térmica e alodínia ao frio. Ver figura 4.

No presente estudo foi utilizado o modelo de Bennett (1988) modificado por Sommer and Myers (1995) onde no lugar de quatro ligaduras frouxas foram utilizadas somente três ligaduras.

Particularmente em nosso laboratório, além dos comportamentos descritos acima, pode-se verificar também a incidência de comportamentos espontâneos auto-digiridos, notadamente o coçar-se (*Scratching*) que se destacou como um possível parâmetro de dor crônica, fácil de ser identificado e quantificado (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1987; KUPERS *et al.*, 1992).



**Figura 4** - Representação esquemática de diferentes lesões através de ligaduras em nervos periféricos para indução de neuropatias

Fonte: Ueda e Inoue (2001)

A avaliação quantitativa dos comportamentos de alimentar-se, beber, morder-se, dormir, lambar-se, coçar-se e comportamentos sexuais, num observatório controlado, possibilita a análise das funções normais do organismo animal, como também permite quantificar uma ampla variação de efeitos de drogas que afetam o sistema nervoso. Mudanças significativas nesses comportamentos podem ser produzidas em animais que apresentam dor severa e persistente.

Vários são os argumentos que sugerem que o coçar-se (*scratching*) é um sinal de dor crônica. Sweet (1981) e De Castro-Costa *et al.* (1981, 1987) observaram em ratos artríticos um aumento significativo desse comportamento, o qual era inibido pela morfina e acetilsalicilato e não por anti-histamínicos, excluindo assim sua origem pruriginosa. Kupers *et al.* (1992), fizeram análises dos comportamentos espontâneos no modelo de dor neuropática,

sendo evidenciado que o coçar-se se apresenta aumentado, sendo esse aumento revertido pela morfina e pela estimulação central.

Outros estudos também relatam que o comportamento de coçar-se (*Scratching*) tem sido observado nos modelos de dor crônica, apresentando-se aumentado de modo significativo (na pata ipsilateral à ligadura) quando comparado com o controle hígido (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1981, 1987; KUPERS *et al.*, 1992; MOURA *et al.*, 1995; SANTOS, 1995; ALVES, 1997). Utilizando estes parâmetros e seus significados, várias manipulações farmacológicas foram realizadas em nosso Laboratório de Neurologia Experimental-UFC. As drogas como a morfina (potente analgésico; agonista de receptores opióides), o baclofen (agonista GABA<sub>B</sub>, anti-espástico e analgésico em algumas neuropatias), a vigabatrina (anticonvulsivante e analgésico em algumas neuropatias, atua provocando aumento do GABA através da inibição da GABA-aminotransferase), carbamazepina (analgésico em algumas neuropatias, atua em canais de sódio), entre outras empregadas nesses estudos, apresentaram ação analgésica por diferentes mecanismos, conseguindo reduzir esse comportamento, após indução de dor crônica, confirmada pelo aumento do *scratching* e de outros parâmetros (ALVES *et al.*, 1999; SANTOS, 1995).

A injeção intratecal e intraventricular de neurotransmissores e substâncias excitatórias (substância P, bombesina, mescalina, anfetamina, 5-metoxitriptamina, somatostatina e aminoácidos excitatórios) induzem em animais normais, o aumento significativo deste comportamento (DOBRY *et al.*, 1981; HYLDEN; WILCOX, 1981; PIERCEY *et al.*, 1981; SHARE; RACKMAN, 1981; COWAN *et al.*, 1985; KULKARNI, 1973; URCA e RAIGORADSKY, 1988).

O comportamento *biting* (morder-se) também aparece com sua expressão significativamente aumentada em vários estudos de neuropatias em nosso laboratório, parecendo estar também relacionado a alguma manifestação clínica da neuropatia, inclusive de dor, embora tenha uma curva temporal diferente do *scratching* (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1981; ALVES *et al.*, 1997).

Outros comportamentos como *rearing*, *climbing*, *walking*, *etc.* possuem escassos relatos na literatura científica sobre os seus significados no comportamento de animais experimentais. No entanto sabe-se que estes comportamentos exigem maior atividade motora.

Autotomia (auto-mutilação) nos animais após lesão neural foi observada em 50% dos animais no estudo de Santos (1995) e em outros modelos de neuropatia experimental (WALL *et al.*, 1979) e tem sido interpretada como parâmetro de dor crônica (LEVITT, 1985), porém

há controvérsias quanto a esta interpretação (GYBELS; KUPPER, 1991). Segundo experimentos já realizados em nosso laboratório, com a constrição sem transfixação do nervo, de acordo com o modelo original de Bennett e Xie (1988), não ocorreu em nenhum animal este comportamento de autotomia, o que torna este modelo eticamente mais correto e com melhor aproveitamento dos animais.

A sensibilidade térmica ao calor é um parâmetro importante a ser avaliado em síndromes dolorosas. Essa importância da avaliação da sensibilidade ao calor foi demonstrada no trabalho publicado por Attal *et al.* (1990), no qual desenvolveram parâmetros de avaliação de dor crônica induzida pelo modelo de Bennett e Xie (1988). Inicialmente trabalhando com animais normais, encontraram um limiar de  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,9^{\circ}\text{C}$  para animais normais, ou seja, estímulos com temperaturas acima deste valor foram considerados nocivos aos animais normais, porque eles desencadeavam respostas comportamentais típicas de dor. Neste estudo, os comportamentos, como resposta aos estímulos térmicos observados nos animais supostamente neuropáticos, foram semelhantes ao que ocorrem na clínica médica, ou seja, foram reproduzidos os sintomas de alodínia e hiperalgesia. Considera-se alodínia como sendo a presença de resposta dolorosa a estímulos não-nocivos, ou seja, um comportamento de dor provocado por estímulo com temperatura abaixo do limiar de dor ( $<44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ), e hiperalgesia como sendo o comportamento de hipersensibilidade dolorosa frente a estímulos nocivos, por exemplo, a retirada da pata em um tempo bem inferior que o demonstrado em ratos saudáveis ou pseudo-operados expostos à temperaturas acima do limiar ( $> 44,5^{\circ}\text{C}$ ) (ATTAL *et al.*, 1990; BENNETT; XIE, 1988). No presente estudo, utilizamos a temperatura de  $46^{\circ}\text{C}$  para avaliar a hiperalgesia nos animais.

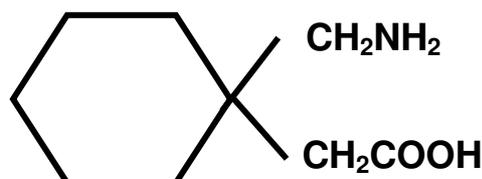
### **1.1.2.3. Tratamento para a dor Neuropática**

A dor neuropática costuma responder pobremente aos analgésicos comuns, sendo os fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes os principais representantes no tratamento deste tipo de dor, seja de origem periférica. As principais drogas e suas dosagens em humanos são: Gabapentina (600 a 1200 mg 3x/dia), pregabalina (50 a 100mg 3x/dia), tramadol (200-400 mg/dia), oxicodona-cr (60-120 mg/dia), lidocaína tópica, carbamazepina (até 1000 mg/dia), tricíclicos (até 75 mg/dia), lamotrigina (até 200 mg/dia), carbamazepina (até 1000 mg/dia) (FINNERUP *et al.*, 2005).

## 1.2 GABAPENTINA

### 1.2.1 Estrutura química

A Gabapentina é descrita como sendo o ácido 1-(aminometil) ciclohexano acético como fórmula molecular  $C_9H_{17}NO_2$  e peso molecular de 171.24. Com estrutura molecular conforme ilustrado abaixo. Ver figura 5:



**Figura 5** - Estrutura molecular da gabapentina. Fonte: Sigma Aldrich

### 1.2.2 Histórico da gabapentina

A gabapentina (Neurontin®) foi sintetizada pela Parke Davis (filial da *Pfizer*) através da inserção de um anel ciclohexano na molécula do ácido gama-amino butírico (GABA) para facilitar a entrada no sistema nervoso central, atravessando a barreira hematoencefálica. Inicialmente o composto não tinha uso terapêutico para epilepsia e sim contra espasticidade. Subseqüentemente as propriedades antiepilépticas ficaram evidentes. Contraditoriamente, hoje sua principal indicação terapêutica é no tratamento de dor (GUERREIRO, 2001).

*Neurontin*® foi introduzido pela primeira vez como anticonvulsivante em 1994 (SMITH *et al.*, 2007). E sua atividade analgésica foi identificada e posteriormente descrita em publicação por Mellick pela primeira vez em 20 de maio de 1994, quando indicado a uma paciente com Distrofia Reflexa do Simpático, a qual obteve alívio da dor e melhora substancial do quadro clínico (MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B., 1995a). Daí então a gabapentina (GBP) começou a ser utilizada em várias síndromes dolorosas do SN. (MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B., 1995b, 1996).

### 1.2.3 Uso clínico da gabapentina

Como já descrito acima, resultados em um estudo clínico em pacientes com distrofia reflexa do simpático (RSD) demonstraram o alívio da dor e melhora substancial do quadro clínico nestes pacientes com o uso de GBP (300 ou 600mg/dia). A GBP melhorou a temperatura e cor da pele, reduziu alodínia, hiperalgesia, e hiperpatia na maioria dos pacientes (MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B., 1995a).

Em estudo duplo-cego, randomizado e placebo-controlado, durante 8 semanas, para avaliar a eficácia e segurança da GBP no tratamento de dor neuropática em doses até 2400mg/dia concluiu-se que a GBP reduziu a dor e melhorou a qualidade de vida em pacientes com uma variação extensa de síndromes de dor neuropática (SERPELL, 2002).

Em doses de 1800 a 3600mg/dia, a GBP se mostrou efetiva e bem tolerada em pacientes adultos durante o tratamento de dor neuropática. (BACKONJA; GLANZMAN, 2003).

A GBP preveniu ataques epiléticos parciais e ataques tônico-clônicos em estudos clínicos placebo-controlados em mono ou politerapia (ANDREWS *et al.*, 1990; McLEAN *et al.*, 1993; MARSON *et al.*, 1996; BURGEY *et al.*, 1997).

### 1.2.4 Farmacocinética

Em estudos com GBP marcada com carbono 14 (C14) administrada por via intragástrica e intravenosa em ratos e humanos, foi demonstrado que a GBP intra-gástrica é bem absorvida atingindo concentrações máximas no sangue dentro de 1 a 3 horas após administração. Após administração intravenosa são observados níveis semelhantes de GBP no sangue e cérebro após curta fase de distribuição. São encontradas altas concentrações no pâncreas e rins e baixas concentrações no tecido adiposo. Não é observada a GBP ligada às proteínas plasmáticas ou albumina do soro em humanos. Tendo coeficiente de distribuição igual a  $7.5 \times 10^{-2}$ . E volume de distribuição aparente (VDA) de  $58 \pm 6$  litros. Nenhuma biotransformação foi observada em humanos e ratos. A eliminação renal da GBP é de 99,8% nos ratos e 80% nos humanos. A meia vida da GBP é de 2 a 3 horas em ratos e de 5 a 6 horas em humanos. Estes experimentos em ratos e humanos demonstraram uma farmacocinética independente de sexo e sem alterações após múltiplas dosagens (VOLLMER; VON HODENBERG; KÖLLE, 1986). Outro estudo relatou que em camundongos e ratos a

biodisponibilidade foi de 79% quando estes animais recebem 50mg/kg. As proteínas plasmáticas ligantes à GBP foram inferiores a 3%. E a máxima concentração plasmática geralmente foi atingida em 2h após administração oral. A meia vida de eliminação após injeção intravenosa foi de 1,7 horas. Administrações repetitivas em ratos não alteraram a farmacocinética da GBP(C14). Não existiram alterações da farmacocinética relacionadas com a idade. O metabolismo em ratos e camundongos foi menor do que 5%. A principal via de excreção foi a urinária. E a GBP não foi indutora do citocromo 450 hepático. Em suma a GBP demonstrou propriedades farmacocinéticas desejáveis (RADULOVIC L.L., *et al.*, 1987).

A biodisponibilidade oral em pacientes com epilepsia foi de aproximadamente 60% em dose de 3600mg/dia administrada três vezes ao dia. Diminuindo com o aumento da dose diária. (GIDAL *et al.*, 1998).

Neste estudo as observações eram realizadas depois de 80 minutos de aplicada a GBP via gavagem, tendo em vista que vários trabalhos demonstraram efeitos analgésicos máximos da GBP após 60 minutos de aplicação da mesma em ratos, se estendendo até 3 ou 4 horas depois (KAYSER; CHRISTENSEN, 2000).

A GBP atravessa muitas barreiras membranosas utilizando um transportador de aminoácido específico do intestino (STEWART *et al.*, 1993) e de neurônios e astrócitos (SU *et al.*, 1995), conhecido como Sistema L, que compete pelo transporte da L-leucina, L-isoleucina, L-valina, e L-fenilalanina. (STEWART *et al.*, 1993). A GBP está 10 vezes mais concentrada no citosol das células do tecido cerebral que no espaço extracelular (WELTY *et al.*, 1993).

### **1.2.5. Mecanismos de ação da gabapentina**

Embora muitos estudos tenham colaborado para estabelecer os alvos moleculares e celulares para as ações da GBP como anticonvulsivantes, antinociceptivo, ansiolítico e neuroprotetor, não foi obtido ainda um consenso. É provável que muitas ações celulares diferentes contribuam para os vários aspectos farmacológicos da GBP (TAYLOR *et al.*, 1998).

### 1.2.5.1 Em receptores GABA

Apesar de a GBP ter sido sintetizada através da inserção de um anel ciclohexano na molécula do GABA, com intuito de obter uma molécula com efeitos semelhantes e que tivesse boa penetração no S.N.C, ela não interage diretamente com receptores do GABA pois não altera a ligação de radioligantes em receptores GABA<sub>A</sub> ou GABA<sub>B</sub> em concentrações maiores que 100µM (TAYLOR, 1995) nem altera a captação de [3H]GABA em cultura de neurônios ou glia (SU *et al.*, 1995). Além disso, a GBP não altera respostas neuronais induzidas pelo GABA em experimentos eletrofisiológicos (ROCK; KELLY; MACDONALD, 1993). Além do mais, convulsões clônicas causadas pelo antagonismo de receptores do GABA são prevenidas por GBP de forma bem menos potente do que aquelas convulsões provocadas pela inibição da síntese do GABA (TAYLOR, 1998).

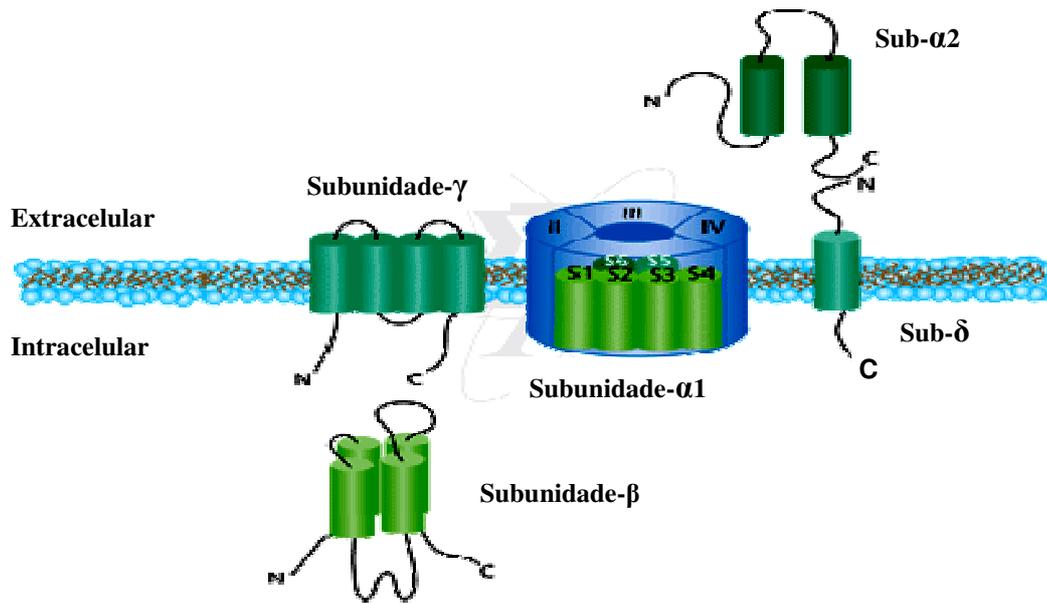
Em estudo com tecido de *neo-striatum* de ratos foi demonstrado que a GBP aumenta a concentração e provavelmente a taxa de síntese do GABA no cérebro, o qual pode aumentar a liberação não vesicular de GABA durante os distúrbios nervosos (GOTZ *et al.*, 1993).

No entanto, mais recentemente foi relatado que a GBP ativa o receptor GABA<sub>B</sub> em neurônios de hipocampo de rato. Este agonismo seletivo da GBP em receptores pós-sinápticos GABA<sub>B</sub> pode ser a chave das suas vantagens terapêuticas como anticonvulsivante (NG *et al.*, 2001). O receptor GABA<sub>B</sub> está acoplado com proteínas Gi/Go cuja ativação pode inibir o sistema adenilato ciclase (FRANEK, 2004). Segundo Bertrand *et al.*, (2001) a ativação dos receptores GABA<sub>B</sub> pela GBP está negativamente acoplada aos canais de Ca<sup>++</sup> voltagem dependentes, o que explicaria os efeitos depressores da GBP nas respostas do Ca<sup>++</sup>.

GBP *in vitro* aumentou atividade da enzima GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), sugerindo que o tratamento com GBP pode aumentar a síntese de GABA a partir do glutamato nos tecidos cerebrais (TAYLOR *et al.*, 1992). Corroborando com estes achados, estudos sugerem que a GBP pode agir seletivamente contra os inibidores da GAD. (BARTOSZYK *et al.*, 1986; TAYLOR, 1995).

### 1.2.5.2 Em canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD)

Gee (1996), do centro de pesquisas em neurociências da *Parke-Davis*, a partir do isolamento e caracterização de proteínas ligantes para [H]-gabapentina encontradas em membranas do córtex cerebral de porco, mostrou que a GBP se ligava à subunidade  $\alpha 2\delta$  dos canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD). Ver fig. 6.



**Figura 6 - Canal de Cálcio Voltagem-Dependente de Alta Voltagem (CCVD/HVA)**

Fonte: SigmaAldrich

Nota: A subunidade  $\alpha 1$  contém o orifício de passagem do íon cálcio, sendo alvo para várias drogas e é composta por quatro domínios homólogos (I, II, III, IV), cada um contém seis hélices transmembranas (S1, S2, S3, S4, S5, S6). O domínio S4 é sensível às mudanças de voltagem na membrana e desencadeia a abertura do canal. As outras subunidades acessórias são moduladoras: a subunidade  $\beta$  intracelular parece ter função de âncora e está associada com a subunidade  $\alpha 1$ . A subunidade  $\gamma$  é uma glicoproteína que possui quatro segmentos transmembranas. A subunidade  $\alpha 2$  é extracelular e altamente glicolizada e associada com a subunidade  $\delta$  transmembrana via pontes dissulfídicas

Fonte: Veizerová (2007)

Antes dos achados Nicolas S. Gee, já era proposto que um nível aumentado do cálcio intracelular, via seu influxo através dos canais de cálcio voltagem dependentes (CCVD), seria um importante mecanismo para a sensibilização central associada com a dor neuropática (CODERRE *et al.*, 1993). Estudos farmacológicos e comportamentais também indicam um papel dos canais de cálcio no processo da dor neuropática, uma vez que a aplicação de bloqueadores específicos para canais de cálcio pode prevenir a alodínia em animais com nervos lesionados (CALCUTT; CHAPLAN, 1997; CHAPLAN *et al.*, 1994).

Um dos principais efeitos da subunidade  $\alpha 2\delta$  é a modulação do tráfico de cálcio através da membrana plasmática, utilizando um domínio “Von Willebrand factor-A”(VWA), o qual está contido na subunidade  $\alpha 2$ . Este domínio VWA contém um sítio de adesão para íon metal (*metal-ion-dependent adhesion site* - MIDAS) que se liga ao cátion divalente. A subunidade  $\alpha 2\delta$  interage com a subunidade  $\alpha 1$  desde o início da formação e maturação do

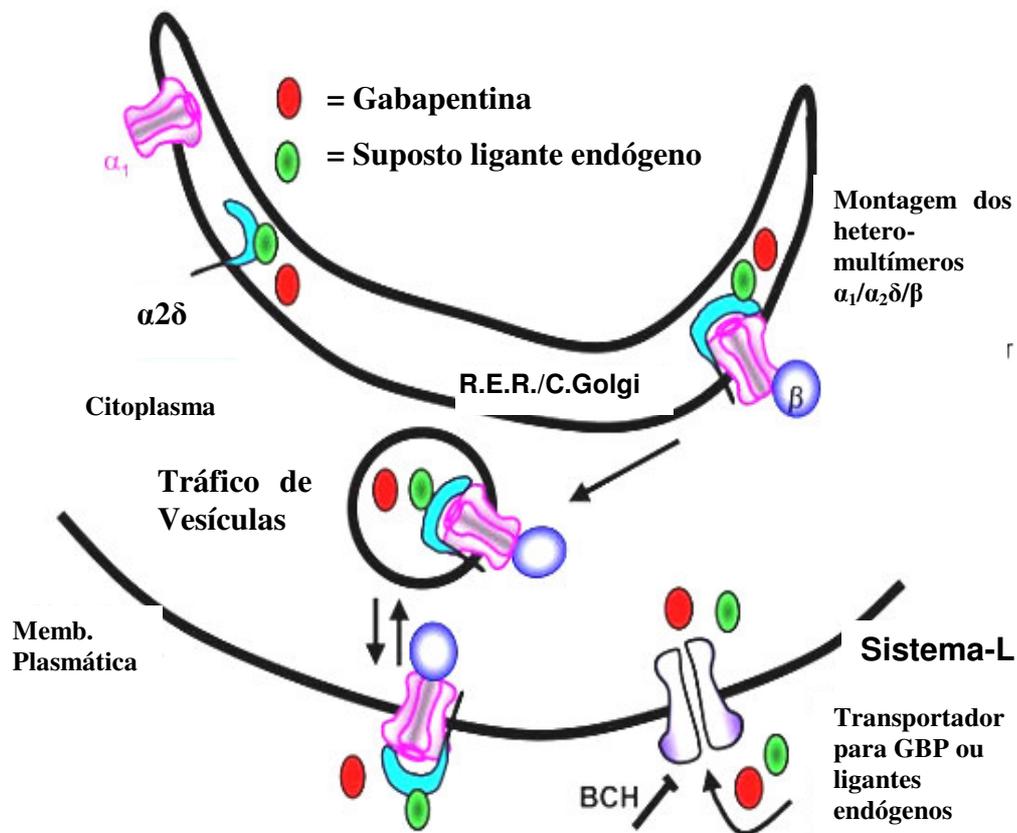
canal, antes mesmo dele aparecer na membrana. E o motif MIDAS no VWA/ $\alpha 2\delta$  é requerido posteriormente para promover tráfico na subunidade  $\alpha 1$  através da membrana plasmática (CANTÍ *et al.*, 2005). Ressaltando o papel da subunidade  $\alpha 2\delta$  no influxo de cálcio; foi demonstrado que em células cardíacas as subunidades auxiliares  $\alpha 2\delta$  e  $\beta 2$ , quando co-existent, aumentam a corrente de cálcio em 100 vezes (SHISTIK *et al.*, 1995)

A GBP inibe a corrente de cálcio se ligando às subunidades  $\alpha 2\delta-1$  e  $\alpha 2\delta-2$ , não em  $\alpha 2\delta-3$ , dos CCVD de alta voltagem. A subunidade  $\alpha 2\delta-1$  é encontrada no cérebro, coração, pulmão, fígado, músculo esquelético e a  $\alpha 2\delta-2$  se encontra em altas concentrações no cérebro e coração (MARAIS; KLUGBAUER; HOFMANN, 2001).

Os efeitos antialodínicos da GBP podem estar relacionados à sua ligação específica à subunidade  $\alpha 2\delta$  (BACK *et al.*, 2004), pois a expressão dessa subunidade está significativamente aumentada nos gânglios da raiz dorsal de animais com nervo espinal lesionado (LUO *et al.*, 2001; NEWTON *et al.*, 2001).

Em estudos eletrofisiológicos, a GBP foi significativamente efetiva em inibir a corrente de cálcio em canais  $\text{CaV}2.1/\beta_4/\alpha 2\delta-2$  se incubada cronicamente (por 17 a 20 horas antes do registro), mas não quando incubada agudamente (por 3 a 6 horas) em ambos os sistemas de expressão heterólogo ( $\alpha 2\delta-1$  e  $\alpha 2\delta-2$ ) e em neurônios ganglionares da raiz dorsal (HEBLICH; DOLPHIN *et al.*, 2008). A GBP atuaria primeiramente em alvos intracelulares, requerendo captação para o interior da célula. O uso de bloqueadores do Sistema-L de transporte de aminoácidos bloqueou os efeitos da GBP aplicada cronicamente, e a co-expressão de um transportador aumentou seus efeitos. Este efeito é mediado pelas subunidades  $\alpha 2\delta-1$  e  $\alpha 2\delta-2$ , visto que o efeito da GBP foi bloqueado por mutantes de ambas as subunidades, impedindo a ligação da GBP. A GBP também reduziu a expressão da subunidade  $\alpha 2\delta$  e do canal de cálcio  $\text{Cav}2.1$ . (HENDRICH *et al.*, 2008).

A GBP inicialmente é transportada por um sistema-L de transporte de aminoácidos para o meio intracelular. E ao nível do retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, a GBP desloca um suposto ligante endógeno (que normalmente se liga à Subunidade  $\alpha 2\delta$  modulando positivamente a função do fluxo de cálcio), impedindo a habilidade da  $\alpha 2\delta-1$  e  $\alpha 2\delta-2$  de aumentar a concentração de VGCC na membrana plasmática. Desta forma, a GBP pode exercer seu efeito em subunidades  $\alpha 2\delta$  intracelulares durante a maturação e o tráfico vesicular dos complexos de VGCC para a membrana plasmática, diminuindo a expressão de VGCC na membrana plasmática e/ou impedindo a reciclagem da  $\alpha 2\delta/\text{Cav}2.1$  a partir da membrana plasmática para o retículo endoplasmático rugoso (HENDRICH *et al.*, 2008). Ver figura 7.



**Figura 7** - Suposto mecanismo para a ação da GBP em canais de cálcio voltagem dependente (CCVD)

A GBP inicialmente é transportada por um sistema-L de transporte de aminoácidos para o meio intracelular. E ao nível do retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi, a GBP desloca um suposto ligante endógeno que normalmente se liga à subunidade  $\alpha_2\delta$  e modula positivamente a função do fluxo de cálcio. E através do tráfego vesicular, o receptor é exposto na membrana plasmática com a subunidade ligada ao suposto ligante juntamente com a GBP na face externa. Desta forma a GBP impediria a função de aumento de influxo de íons cálcio da subunidade  $\alpha_2\delta$  Fonte: Hendrich *et al.* (2008)

Sabendo-se que a subunidade  $\alpha_2\delta$  está presente em todos os canais de cálcio voltagem dependente (ISOM; DE JONGH; CATTERALL, 1994; HOFMANN; BIEL; FLOCKERZI, 1994) é de se esperar que a GBP module a atividade de vários tipos de canais de cálcio (ROCK; KELLY; MACDONALD, 1993).

### **1.2.5.3 Inibição em Canais de Cálcio tipo P/Q (pré-sinápticos)/ Glutamato/ Noradrenalina**

Desde muito antes já se comentava a possibilidade de inibição da liberação de neurotransmissores monoaminados tendo como causa a interação da GBP com os canais de cálcio (REIMANN, 1983; SCHLICKER *et al.*, 1985; DOOLEY *et al.*, 1996). Fink *et al.* (2002) demonstraram que a GBP pode se ligar às subunidades  $\alpha 2\delta$  para seletivamente atenuar o influxo de cálcio induzido por despolarização ( $K^+$ ) em canais de cálcio tipo P/Q (pré-sinápticos) resultando em diminuição da liberação de glutamato/aspartato das terminações nervosas excitatórias com reduzida ativação de receptores AMPA nos terminais noradrenérgicos. Assim, segundo este mesmo autor, a GBP ( $IC_{50}=17\mu M$ ) produziu inibição dose-dependente do aumento do influxo de cálcio em sinaptosomas neocorticais. O efeito inibitório da GBP no aumento de influxo de cálcio induzido por despolarização ( $K^+$ ) foi bloqueado por  $\omega$ -agatoxin (bloqueador de canais tipo P/Q). As subunidades  $\alpha 2\delta-1$ ,  $\alpha 2\delta-2$ ,  $\alpha 2\delta-3$ , possíveis sítios de ligação para a GBP, foram detectadas através de imunoensaio para sinaptosomas neocorticais. A liberação de noradrenalina-((3)H) de fatias de neocórtex também foi inibida por GBP. E este efeito foi revertido com uso de antagonista de receptor AMPA, denominado como NBQX (FINK *et al.*, 2002).

Colaborando com o estudo anterior, foi também demonstrado que a GBP inibiu a liberação de glutamato no hipocampo e neocórtex de rato, substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) na medula espinal de ratos, somente após inflamação ou ativação de proteína quinase C (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003)

### **1.2.5.4 Gabapentina e liberação de neurotransmissores monoaminados**

A GBP provocou significantes decréscimos (em 1 mmol/L bloqueio de 20-30%) na liberação de noradrenalina e serotonina em fatias de córtex cerebral de ratos (SCHLICKER *et al.*, 1985). Efeitos semelhantes também foram obtidos em fatias de núcleo caudado de coelho (REIMANN, 1983) e em fatias de néocórtex de ratos (DOOLEY *et al.*, 1996) estimuladas por despolarização com  $K^+$  (20 a 50mM). A liberação reduzida de monoaminas pode estar também relacionada à ação da GBP nos canais de cálcio (PUGSLEY *et al.*, 1997). As alterações nas funções das monoaminas induzidas pela GBP estão mais relacionadas com os efeitos comportamentais da GBP (ações ansiolíticas ou analgésicas) do que propriamente com os efeitos anticonvulsivos (TAYLOR *et al.*, 1998).

Foram investigados os estágios de sono e os níveis séricos de serotonina em homens adultos saudáveis após administração oral de GBP. Com o aumento dos níveis séricos da GBP os pacientes apresentaram um aumento nos níveis séricos de serotonina e nas fases 3 e 4 do sono ( $p < 0,05$ ). O aumento na serotonina periférica aponta paradigmaticamente para um aumento na biodisponibilidade da serotonina a qual pode contribuir para o aumento nos estágios 3 e 4 do sono. Provavelmente, este aumento de serotonina ocorreu por alterações provocadas pela GBP na liberação ou metabolismo de serotonina nas plaquetas sanguíneas ou ainda alterando a captação da serotonina pelas plaquetas sanguíneas (RAO *et al.*, 1988).

#### **1.2.5.5 Gabapentina em estudos eletrofisiológicos (inibindo Descargas Ectópicas)**

Devor *et al.* (1992) concluíram que a GBP inibe a geração do impulso antidrômico em neuromas, mas não inibe o impulso de propagação. Em consonância com estes dados, estudos eletrofisiológicos *in vivo* demonstraram que a GBP suprime descargas ectópicas em nervo de ratos neuropáticos e reverte a alodínea. No entanto, a GBP não suprime descargas ectópicas em fibras nervosa normais (PAN; EISENACH; CHEN, 1999), indicando mais uma vez que existe a necessidade de um estado ativado (inflamação) do nervo para que a GBP exerça seu efeito anti-alodínico.

Um trabalho com a pregabalina (PGB), conhecida como S(+)-3-isobutilgaba ou CI-1008 e análoga a GBP (ambas possuem o ácido 3-alquil gama-aminobutírico) que também atua em subunidades  $\alpha 2\delta$  de maneira estereoseletiva (BROWN *et al.*, 1998), sugeriu fortemente que esta droga tem seu efeito analgésico na dor neuropática provavelmente, pelo menos em parte, através de ação inibitória periférica na geração de impulsos de descargas ectópicas induzidos pela lesão do nervo (CHEN; XU; PAN, 2001).

#### **1.2.5.6. Gabapentina e iNOS / NO-GMPc-PKG-Canais de K+**

O óxido nítrico (NO) tem importante e complexo envolvimento na transmissão e modulação nociceptiva (MELLER; GEBHART, 1993). A ativação da via NO/GMPc é um dos mecanismos responsáveis pela analgesia induzida por várias drogas, especialmente aquelas que agem em sítios periféricos (DUARTE; FERREIRA, 1992; HERRERO *et al.*, 2003).

Um estudo recente demonstrou que a GBP (30 a 300 $\mu$ g), administrada por via subcutânea na superfície dorsal da pata, 20 min antes da injeção de formalina (mesma via e

mesma pata) inibiu o tempo de *Flinches* na fase 2 deste modelo. Esse efeito foi revertido pelo L-NAME ( $N^G$ -L-Nitro-arginine methyl ester) um inibidor da NOS (enzima sintetizadora de NO), pelo ODQ [1*H*-(1,2,4)-oxadiazolo(4,2-*a*)quinoxalin-1-one] um inibidor de Guanilato Ciclase, e pelo KT-5823 (inibidor de proteína quinase G - PKG). Isto sugere fortemente que a GBP produz antinocicepção periférica local (não teve efeito quando aplicada na pata contralateral) por ativação da via NO/GMPc/PKG/canais de potássio (ORTIZ *et al.*, 2006).

Outro estudo do mesmo laboratório demonstra resultados semelhantes em neuropatia: a GBP administrada por via intratecal induziu um efeito anti-alodínico em ratos com constrição de nervos espinais (Modelo de KIM; CHUNG, 1992) provavelmente, e pelo menos em parte, através do aumento da ativação da via NO/GMPc/PKG/canais de K<sup>+</sup>. Pois esse efeito foi revertido por todos os bloqueadores desta via: L-NAME (inibidor de NOS) ODQ (inibidor de Guanilato Ciclase) e KT-5823 (inibidor de PKG), respectivamente. Em adição, os resultados deste trabalho sugerem que a ativação da PKG, e não proteína fosfatase 1 ou 2, é um importante passo no efeito antialodínico espinal da GBP (MIXCOATL-ZECUATL; FLORES-MURRIETA; GRANADOS-SOTO, 2006). É provável que a ativação (induzida por NO) da PKG dependente de GMPc pode desencadear a abertura dos canais de K<sup>+</sup> ativados por alta condutância de cálcio como reportado no músculo liso (LINCOLN *et al.*, 1994; CARRIER *et al.*, 1997; FUKAO *et al.*, 1999) e em miócitos ventriculares (HAN *et al.*, 2001, 2002). A PKG dependente de GMPc tem sido demonstrada regular muitas vias que controlam os níveis de cálcio citoplasmático: produção e ação de Inositol 1,4,5-trisfosfato, ativação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase e ativação dos canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> (LINCOLN *et al.*, 1994).

Corroborando com os efeitos do NO na analgesia e com os possíveis efeitos da GBP na ativação da via do NO/GMPc/PKG/canais de potássio, foi demonstrado que o doador de NO, [1-(aminomethyl) cyclohexane acetic acid 3-(nitroxymethyl) phenylester], denominado como NCX8001, o qual possui um grupamento liberador de NO (sintetizada a partir da molécula da GBP), produziu um aumento dose-dependente da atividade da guanilato ciclase solúvel e relaxamento em anéis de aorta de coelho *In vitro*. Como também provocou significativamente o aumento da expressão da iNOS em cultura de macrófagos (RAW264.7) estimulados por lipopolissacarídeos. Além do mais, este novo composto também inibiu a liberação de TNF-alfa nestas células de macrófagos estimuladas. Essa mesma droga, NCX8001 na dose de 28–280 μmol/kg i.p. provocou efeito anti-alodínico de forma dose-dependente e mais efetiva que a GBP, sem alterações motoras. Neste estudo se utilizaram ratos com medula espinal lesionada por irradiação a laser (induzida com cinco meses antes) e

avaliando-se a dor através do limiar de vocalização com o aumento gradual de pressão utilizando-se os filamentos de *von Frey* e respostas ao frio utilizando o *spray* de cloreto de Etil aplicado em região de pele raspada. Os animais eram testados a cada 60 minutos após a aplicação das drogas, GBP ou NCX8001 (tempo zero) (WU *et al.*, 2004).

Entretanto, outros estudos na literatura indicam que a via NO/GMPc pode ter mais efeitos pro-nociceptivos do que anti-nociceptivos (ALEY *et al.*, 1998). Como o trabalho de Patil *et al.* (2006) relata que o sildenafil (100 e 200 µg/rat) um inibidor de PDE5 (fosfodiesterase 5) administrado por via intratecal demonstrou aumento da hiperalgesia através da ativação da via NO/GMPc. De qualquer forma a GBP teria efeito analgésico também ao nível central, pois segundo Oka *et al.* (2003), a GBP **inibiu** a ativação da NOS induzida por despolarização (K+) em neurônios corticais via bloqueio dos canais de cálcio tipo P/Q e L. O efeito da GBP em canais de cálcio envolvendo a ativação da NOS foi investigado em cultura de neurônios do córtex cerebral de camundongos. A expressão da subunidade  $\alpha 2\delta$  foi investigada através de RT-PCR. A atividade da NOS evocada por K+ foi estimada através da formação de GMPc. Os resultados mostraram a presença de RNAm para  $\alpha 2\delta$  nestas células. A GBP bloqueou a atividade da NOS (estimada pela formação de GMPc) de maneira dose-dependente. E o aumento da atividade da NOS estimulada por K+ foi quase completamente revertida pela combinação de nifedipina (bloqueador de canais tipo L) e  $\omega$ -agatoxin (bloqueador de canais tipo P/Q). Por outro lado,  $\omega$ -Conotoxin (bloqueador de canais tipo N) falhou em reverter o aumento da atividade da NOS. (OKA *et al.*, 2003).

Os efeitos da GBP na atividade da iNOS ou através da via NO-GMPc parecem variar de acordo com os modelos experimentais utilizados, diferentes tipos de tecidos, como também devido à variações nos conteúdos intracelulares de NO e GMPc (KAWABATA *et al.*, 1994; PEHL; SCHIMID, 1997; TEGEDER *et al.*, 2002)

### **1.2.6. Efeitos da gabapentina nos modelos animais de ansiedade**

A GBP produziu efeitos do tipo ansiolítico em três reconhecidos modelos animais, sugerindo sua utilidade no tratamento da ansiedade: O teste de ameaça humana (Marmoset Human Anxiety), o labirinto elevado em “X” (Elevated X-Maze), e o teste de conflito em ratos (Rat Conflict Test), com a dose efetiva mínima variando de 3 a 30mg/kg (SINGH *et al.*, 1996). Nos três modelos a GBP produziu atividade com similar eficácia ao dos benzodiazepínicos. A atividade da GBP foi mais pronunciada que a da buspirona ou outros compostos experimentais como o antagonista de CCK<sub>B</sub> (colecystokinin) (SINGH *et al.*, 1991)

ou o antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub> da serotonina. Em um estudo com o antidepressivo *Phenylzine* (PASLAWSKI *et al.*, 1996) sugere-se que a elevação da concentração de GABA no cérebro inteiro poderia estar associada aos seus efeitos ansiolíticos. O que se pode também propor para a GBP, uma vez que esta droga também aumentou a liberação não vesicular de GABA a partir de fatias de *neo-striato* em ratos (GOTZ *et al.*, 1993).

### 1.2.7. Efeitos neuroprotetores da gabapentina

Embora a GBP não previna ataques epiléticos induzidos por agonistas análogos ao glutamato, altas doses de GBP significativamente retarda estes ataques, sugerindo que a GBP pode interagir com sinapses glutamatérgicas (BARTOSZYK *et al.*, 1986; TAYLOR, 1995)

Estudos em modelos animais que mimetizam alguns aspectos da doença crônica de neurônios motores (Esclerose Lateral Amiotrófica- ALS) mostraram que a morte neuronal foi prevenida pelo pré-tratamento com a GBP (ROTHSTEIN; KUNCL, 1995). Este modelo utiliza a aplicação de inibidor seletivo da captação de glutamato para induzir a morte neuronal, e esta é reduzida por antagonistas do receptor de glutamato tipo AMPA.

Outro estudo utilizou o modelo de Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar (FALS) em camundongos com genes mutantes que codificam a superóxido dismutase Cu, Zn humana (Cu,ZnSOD) contendo uma substituição de glicina por alanina na posição 93, uma mudança que provoca alteração na atividade desta enzima causando neuro-degeneração motora nestes camundongos. A expressão deste gene mutante que codifica a SOD em camundongos expõe o cérebro e a medula ao estresse oxidativo. O tratamento crônico com altas doses de GBP retardou significativamente a paralisia e morte nestes camundongos sugerindo que a lesão oxidativa produzida pela expressão da enzima Cu,ZnSOD, causando lenta ou fraca excitotoxicidade, pode ser inibida em parte pela prevenção da liberação ou síntese pré-sináptica de glutamato (GURNEY *et al.*, 1994; GURNEY *et al.*, 1996).

É possível que os efeitos neuroprotetores da GBP sejam em virtude de alterações no metabolismo do glutamato ou na sua liberação (TAYLOR, 1998). Welty *et al.* (1995) descrevem uma hipótese para a ação neuroprotetora da GBP: envolvendo a inibição da síntese de glutamato no cérebro a partir da inibição da enzima aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada (enzyme branched-chain amino acid aminotransferase- BCAA-T). Segundo Goldlust *et al.* (1995) a GBP é um inibidor competitivo da BCAA-T com a constante de inibição equivalente à afinidade de substrato endógeno dos aminoácidos de cadeia

ramificada. Ou seja, a GBP compete com os aminoácidos endógenos pelo sítio de ação da enzima BCAA-T, o que inibe competitivamente a síntese de glutamato.

Um estudo *in vitro* demonstrou que a ação da GBP é seletiva para a isoforma da enzima aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada (*Enzyme Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase*- BCAA-T) encontrada no citosol de neurônios cerebrais, e com pouco efeito na forma mitocondrial (forma astroglial) (HUTSON *et al.*, 1995).

Por outro lado, a GBP em altas concentrações estimulou a atividade da enzima catabólica glutamato desidrogenase (GDH) *in vitro* (GOLDLUST *et al.*, 1995). Embora esse achado precise de comprovação *in vivo*.

Em doenças oculares tal como glaucoma (DREYER *et al.*, 1996) e lesão de nervo óptico (YOLES; SCHWARTZ, 1998) a morte neuronal é parcialmente mediada pela excitotoxicidade do neurotransmissor glutamato, através de estimulação do receptor de NMDA, desencadeando um aumento no cálcio intracelular (CHOI, 1985) e iniciando uma cascata de eventos que leva à apoptose. Um novo composto gabapentina-lactam (GBP-L), derivado da GBP, foi neuroprotetor em modelo animal de isquemia aguda da retina quando aplicado por via i.p. (75m/kg) uma hora antes (70% de sobrevivência neuronal) e até 4 horas (45% de proteção) após a indução da isquemia. Neste modelo, a máxima liberação de glutamato induzida pelo evento isquêmico ocorre de 1/2 a 1 hora após a lesão (LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 1992). Desde que GBP-L é ainda protetora quando administrada após este tempo, sua ação pode não depender somente na liberação de glutamato. Desta forma, é proposto um efeito pós-sináptico adicional: A ação da GBP-L inibindo a liberação de glutamato *in vitro* foi completamente abolida por glibenclamida (JEHLE *et al.*, 2000) sugerindo que a GBP-L atua também abrindo canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP, uma vez que a glibenclamida bloqueia estes canais (ASHCROFT; ASHCROFT, 1992).

Um trabalho recente, desenvolvido por Kim *et al.* (2009), sugeriu que a GBP pode exercer seus efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade induzida por glutamato, pelo menos em parte, inibindo a corrente iônica ativada pelo receptor NMDA. O pré-tratamento com a GBP reduziu o grau de lesão neuronal induzida pela exposição ao NMDA (N-metil-D-aspartato) em cultura de fatias de hipocampo. Estudos de *patch-clamp* revelaram que a GBP significativamente inibiu a corrente de íon ativada pelo receptor de NMDA em neurônios CA1 dissociados de hipocampo resultando em supressão da lesão neuronal induzida por glutamato.

### 1.2.8 Estudos da Gabapentina em modelos de dor neuropática experimental

A GBP reduz as respostas dolorosas de neuropatias produzidas por constrição crônica do nervo ciático (HUNTER *et al.*, 1997; XIAO; BENNETT, 1997) ou pela ligação de nervo periférico nos níveis de L5 e L6, no modelo de Kim e Chung (1992) (HUNTER *et al.*, 1997; HWANG; YAKSH, 1997). Estes resultados foram obtidos de vários modelos animais onde demonstram que a GBP reduziu hiperalgesia mecânica (avaliada pelo teste “Pin Prick test”), Alodínia Mecânica (pelo modelo de *Von Frey*), hiperalgesia térmica (pelo modelo de fonte radiante de calor), alodínia térmica por frio (água fria).

A administração de GBP por via subaracnóide em ratos com neuropatia induzida por ligação de nervos espinais L5 e L6 (modelo de CHUNG) bloqueou de forma dose-dependente (10 a 1.000µg) a alodínia térmica e mecânica. Antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> (bicuculina, 0,3 µg e CGP 35348, 30 µg) foram administrados 5 minutos antes da GBP e não reverteram os efeitos (HWANG; YAKSH, 1997). Segundo estes autores, o mecanismo pelo qual a GBP via intratecal exerce seus efeitos é ainda desconhecido. No entanto, se comprovou que neste estudo a GBP está envolvida na modulação de sistemas espinais que não envolvem receptores GABA. Outros trabalhos com a GBP intratecal demonstraram resultados semelhantes (XIAO; BENNETT, 1996).

Mais recentemente foi demonstrado que a GBP i.p. (30, 100, 300 mg/kg) significativamente aliviou a alodínia mecânica (medida pelo teste de *von Frey*) e térmica (imersão da cauda em água fria, 4°C e calor, 40°C) em modelo de ligação do nervo espinal da cauda (BACK *et al.*, 2004). A administração de GBP por via i.p. foi realizada no 14º dia após a injúria no nervo caudal (modelo de BACK *et al.*, 1998) e os testes de comportamentos foram realizados 1, 3, 5 horas após a aplicação da GBP. Os efeitos da GBP permaneceram praticamente constantes nos tempos de 1 a 5 horas (BACK *et al.*, 2004).

Comparando os efeitos da GBP no limiar de retirada da pata quando pressionada (um reflexo integrado em nível de medula espinal) com o limiar de vocalização obtido por pressão na pata (um reflexo integrado a nível supra-espinal) em ratos com constrição do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988), doses baixas de GBP (1 a 30mg/kg i.p.) produziram potente antinocicepção no teste do limiar de vocalização com ausência de efeitos no teste do limiar de retirada da pata. Somente a dose alta de 100mg foi capaz de induzir aumento do limiar nestes dois testes. Estes resultados sugerem que baixas doses de GBP têm ação preferencial em comportamentos relacionados à dor integrados mais complexamente em centros supra-espinais (KAYSER; CHRISTSEM, 2000). Sugerindo diferentes mecanismos de analgesia

da GBP, um espinal e outro supra-espinal (Além dos mecanismos periféricos comentados anteriormente). Interessante observar neste trabalho que o aumento do limiar de dor nos dois testes provocado pela GBP foi significativo a partir do tempo de 60 min após aplicação da droga, perdurando até 160 min sem alterações significativas. Um pico desse efeito ocorreu sempre com 80 min após a aplicação da GBP. Os testes foram realizados após 2 semanas da constrição do nervo. Neste tempo, como descrito por Bennett e Xie (1988) e Attal *et al.* (1990), os comportamentos de dor estão estabilizados ao máximo (KAYSER; CHRISTENSEM, 2000).

Em modelo de constrição do nervo espinal (L5), foram avaliados os efeitos de várias drogas de interesse com envolvimento na dor neuropática e na sensibilidade táctil (com o uso do *von Frey monofilaments*), comprovando-se a validade deste modelo (KIM; CHUNG, 1992). A alodínea táctil foi completamente revertida por GBP (30, 60 e 120mg/kg i.p.), morfina (1, 3 e 6 mg/kg s.c.) e o agente WIN55,212-2 (0.5, 1 e 2,5 mg/kg i.p., um agonista não seletivo de receptor canabinóide). Os três produziram níveis semelhantes de atividade anti-alodínica. A alodínia táctil foi parcialmente revertida por amitriptilina (1.5, 3 e 10 mg/kg s.c.) e fluoxetina (1,3 e 10 mg/kg s.c.). A indometacina, um inibidor não seletivo de COX, não teve efeito significativo. Os efeitos da Morfina e do WIN55,212-2 suportam os relatos já conhecidos de que agonistas do receptor canabinóide e de opióides são ativos na dor neuropática. As três doses de GBP (30, 60 e 120mg/kg i.p.) produziram efeitos anti-alodínicos significativos nos animais com lesão de nervo espinal ( $p < 0,01$ ). Os aumentos dos limiares de retirada da pata em relação ao grupo neuropático tratado com salina foram de 143, 206 e 180%, respectivamente. Ou seja, a dose de 60mg/kg obteve maior aumento no limiar. Os testes foram realizados 1h após aplicação da droga. (LaBUDA; LITTLE, 2005).

Outro trabalho semelhante, no entanto com o objetivo de avaliar a sensibilidade do modelo de lesão por constrição crônica que consiste na ligadura frouxa unilateral do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988) também utilizado no trabalho em questão, demonstrou que a GBP (50mg/kg, i.p.) aplicada 60 min antes dos testes de hiperalgesia térmica (*Plantar Test*) e alodínia mecânica (*von Frey* eletrônico) em animais no 27º dia pós-cirúrgico, provocou eficácia moderada de 31% e 35%, respectivamente. A dose de 100mg/kg teve efeito um pouco inferior. Os efeitos da GBP neste modelo foram semelhantes aos da carbamazepina, em doses equivalentes (De VRY *et al.*, 2004). Este modelo de Constrição Crônica do nervo ciático se mostrou menos sensível que o modelo anterior de constrição do nervo espinal (L5) na avaliação dos efeitos anti-alodínicos da GBP.

### 1.2.9. Estudos da gabapentina em modelos de nociceção aguda e inflamação

Gustafsson *et al.* (2003), utilizando um modelo novo de neuropatia periférica em camundongos gerada por lesão isquêmica e fotoquímica do nervo ciático, utilizando-se a ativação induzida por *laser* de um pigmento fotossensível (eritrosina B), investigaram os efeitos da GBP administrada por via subcutânea (175 a 300 $\mu$ mol/kg  $\approx$  30 a 51 mg/kg), em doses cumulativas, a cada 1 hora de intervalo, no 9º dia após a lesão. A dose máxima de GBP (100+75+125 $\mu$ mol/kg  $\approx$  51mg/kg) aumentou o limiar táctil de retirada da pata de forma significativa, em torno de 77% do limiar dos animais normais. Já a dose de GBP 100 $\mu$ mol/kg sc. ( $\approx$ 17 mg/kg), que não teve efeito na alodínia, no teste de formalina (20  $\mu$ l de formaldeído 1%, s.c., no dorso da pata, 30 min após última aplicação de GBP) reduziu significativamente o comportamento de dor durante a fase 2 (de 15 a 30 min após aplicação de formalina), no entanto com ausência de efeitos na fase 1 (de 0 a 5 min após aplicação de formalina) mesmo em doses mais elevadas de GBP. Esses resultados sugerem que a GBP age como uma substância anti-alodínica e/ou anti-hiperalgésica (FIELD *et al.*, 1997), uma vez que a GBP não tem efeito na nociceção aguda (que ocorre durante a fase 1 do teste de formalina) e não afetou o limiar de retirada táctil em animais normais. Ou seja, é necessário um estado de sensibilidade aumentada (plasticidade neuronal induzida pela lesão) do sistema nervoso para a ação deste composto (GUSTAFSSON *et al.*, 2003). A existência de um sítio de ação periférico para a GBP na nociceção aguda induzida por formalina parece ser improvável em virtude da sua ausência de efeito na fase 1 (de 0 a 5min após formalina), a qual é considerada envolver mecanismos nociceptivos periféricos (DICKENSON; SULLIVAN, 1987).

O trabalho de Ortiz (2006) confirma os dados de Gustafsson *et al.* (2003) quando demonstrou que a GBP aplicada por via subcutânea na superfície dorsal da pata (30 a 300  $\mu$ g/kg por pata) produziu antinociceção periférica local de forma dose-dependente. A GBP foi aplicada 20 min antes da aplicação de formalina(1%) s.c. ipsilateral. Outro grupo de animais foi tratado com GBP (300  $\mu$ g/kg) na pata contralateral para verificar se os seus efeitos são devido à ação local. A GBP inibiu o tempo de *Flinches* produzido na 2ª fase, sem efeito na 1ª fase do Modelo de Formalina. O pré-tratamento através da mesma via de administração (10 min antes da GBP) com todos os bloqueadores da via NO/GMPC/PKG, como também com bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> (glibenclamida e tolbutamida), reverteram significativamente os efeitos da GBP na fase 2 do modelo de formalina. Isto sugere primeiro que os efeitos antihiperálgicos da GBP envolvem a sua ligação aos sítios periféricos e

segundo que os efeitos antinociceptivos periféricos da GBP atuam aumentando a atividade da via NO/GMPC/PKG e abertura de canais de K<sup>+</sup> (acoplados a proteína G e/ou canais de K<sup>+</sup> retificadores internos) (KASE *et al.*, 1987).

Na verdade, nenhuma das duas drogas derivadas do ácido  $\gamma$ -amino-butírico, GBP e PGL, possuem efeito em alterar respostas nociceptivas agudas (HUNTER *et al.*, 1997; STANFA *et al.*, 1997), sugerindo que a ação antinociceptiva destas drogas é dependente das alterações que ocorrem especificamente nas condições de neuropatia ou outras condições inflamatórias (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003).

Gabapentina, pregabalina (S(+)-3-isobutilgaba, análoga à GBP) e naproxeno, via gavagem, aplicados 2,5 horas após carragenina (intraplantar) reverteram a hiperalgesia térmica induzida por fonte de calor com ED<sub>50</sub> igual a 19.2, 6.0, e 0,5 mg/kg respectivamente. Associações de GBP + naproxeno ou pregabalina (PGL) + naproxeno interagiram sinergicamente para reverter a hiperalgesia térmica induzida por carragenina. Estes achados sugerem que essa associação é eficaz para o tratamento de dor neuropática de origem inflamatória. Já no modelo de edema de pata induzido por carragenina, o naproxeno reduziu o edema em 12% quando comparado com o grupo salina. Entretanto, a GBP (dissolvida em solução salina a 0,9%, via gavagem, aplicada 2,5h depois da carragenina) em dose máxima (300mg/kg) não teve efeito significativo na redução do edema. Nenhuma combinação de GBP + Naproxeno decresceu o edema de maneira aditiva (ou seja, maior do que naproxeno aplicado isoladamente). A PGL (30mg/kg) sozinha também não reduziu o edema de forma significativa. Como também nenhuma combinação de PGL+Naproxeno teve efeito aditivo. Embora haja uma interação sinérgica na anti-hiperalgesia da GBP ou PGL + Naproxeno na inflamação induzida por carragenina, GBP e PGL não possuem efeitos antiinflamatórios ou pro-inflamatórios como verificado no edema de pata induzido por carragenina (HURLEY *et al.*, 2002).

Inúmeros estudos demonstram que existe um aumento no conteúdo e liberação de peptídeos neurotransmissores; substância P (SP), e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a partir de neurônios sensitivos de pequeno diâmetro (Fibras C e A $\delta$ ) durante inflamação ou em modelos de dor neuropática (OKU *et al.*, 1987; NANAYAMA *et al.*, 1989; DONNERER; SCHULIGOI; STEIN, 1992; GARRY; HARGREAVES, 1992; VASKO, 1995; SOUTHALL; MICHAEL; VASKO, 1998; VANDERAH *et al.*, 2001). Este aumento de liberação de transmissores dos neurônios sensitivos é mimetizado por ativação do monofosfato de adenosina 3'5' cíclico (AMPc) e/ou proteína quinase C (PKC), sugerindo-se que a sensibilização é mediada em parte pela ativação das vias da PKA e PKC (HINGTEN *et*

*al.*, 1995; YASHPAL *et al.*, 1995). De forma que as drogas capazes de atenuar o aumento de liberação destes peptídeos neurotransmissores podem ser efetivas em aliviar sintomas da inflamação e da dor neuropática sem, no entanto, alterar a nocicepção aguda (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003).

Para se verificar se GBP e PGL possuem efeitos em neurônios sensitivos, foram estudadas as ações destas drogas na liberação estimulada por capsaicina de neuropeptídeos sensitivos, substância P e CGRP, em fatias de medula espinal de ratos *in vitro*. A aplicação de uma solução de adjuvante de *Freund* (FDA) por via subcutânea na superfície plantar da pata aumentou a liberação destes neuropeptídeos imunorreativos nestes tecidos *in vitro* e foi atenuada pela pré-exposição com GBP (10 $\mu$ M) e PGL (10 $\mu$ M). Exposição das fatias contralaterais (à pata inflamada com FDA) a 10 $\mu$ M de GBP ou PGL, antes do estímulo com capsaicina, não causou alteração na liberação destes neuropeptídeos. A liberação de neuropeptídeos a partir de tecidos de ratos não inflamados previamente (não sensibilizados com FDA) não foi afetada pelo tratamento com GBP e PGL. Estas drogas também reduziram a liberação de neuropeptídeos em medula espinal pré-tratados *in vitro* com o ativador de PKC (dibutirato de forbol 12, 13). Estes resultados sugerem que a GBP e PGL reduzem a liberação dos neuropeptídeos SP e CGRP a partir de neurônios sensitivos, mas somente em condições de significativa sensibilização da medula espinal induzida por inflamação. Sendo que a GBP foi mais potente do que a PGL em inibir esta liberação (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003).

### 1.3. CITOCINAS: GENERALIDADES

Citocinas são polipeptídeos simples, ou glicopeptídeos, de peso molecular menor ou igual a 80 kDa, com propriedades pleiotrópicas e regulatórias. São produzidas e secretadas por diversos tipos celulares em resposta a uma infinidade de estímulos, para agir em receptores específicos presentes em células alvo. Como são substâncias com diversas funções regulatórias, tais moléculas não são produzidas de maneira contínua. A sua produção é induzida ou suprimida por estímulos aos quais o organismo precisa responder. Os vários tipos de citocinas incluem as interleucinas (IL), os fatores de necrose tumoral (TNF), os fatores estimulantes de colônia da medula óssea e uma variedade de outros fatores de crescimento (fatores de crescimento derivados de fibroblastos, da epiderme e das plaquetas) (HOPKINS, 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que citocinas podem influenciar a direção de uma resposta imune por mecanismos parácrinos, endócrinos e autócrinos. A capacidade que possuem de exercer efeito local, regional e sistêmico é um ponto importante da biologia dessas substâncias, pois demonstra o papel fisiopatológico desses mediadores na doença. A elevação da temperatura, indução de sono e supressão do apetite são manifestações sistêmicas de doença, porém, isso pode representar apenas alterações dos níveis de citocinas que normalmente controlam a nossa fisiologia circadiana. Um aumento dos níveis de citocinas que estão associados com a inflamação pode concomitantemente ativar células inflamatórias e alterar a fisiologia normal. Ambos os eventos podem ser importantes no combate à doença através dos mecanismos de defesa. Em adição, os efeitos sistêmicos associados com inflamação severa podem ser exercidos pela produção exacerbada de citocinas e pela manutenção dessa produção pelas próprias citocinas (KUNKEL *et al.*, 1991)

Consideradas também de grande importância na regulação da resposta imune, as citocinas são polipeptídeos habitualmente ausentes no plasma em condições estéreis. As mesmas são produzidas após estimulação antigênica; podem ser sintetizadas principalmente por monócitos e macrófagos ou podem se originar de linfócitos. As citocinas atuam como mediadores na comunicação intracelular, por meio de maturação, proliferação, diferenciação, ativação ou inibição de diferentes células do sistema imunológico, aumentando ou diminuindo a resposta imune (FORTE, 2004).

De acordo com suas atividades biológicas, as citocinas são classificadas em: a) Pró-inflamatórias, onde exercem função de destaque a IL-1, a IL-2, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o IFN; b) Das doenças alérgicas e das parasitoses, representadas por IL-4, IL-5 e IL-

6; c) Imunossupressoras, como as IL-10, IL-13 e IL-19; d) Estimuladoras de crescimento de colônias, ou seja, IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14 e IL-17; e) Quimiocinas, onde ressalta-se a IL-8 (FORTE, 2004).

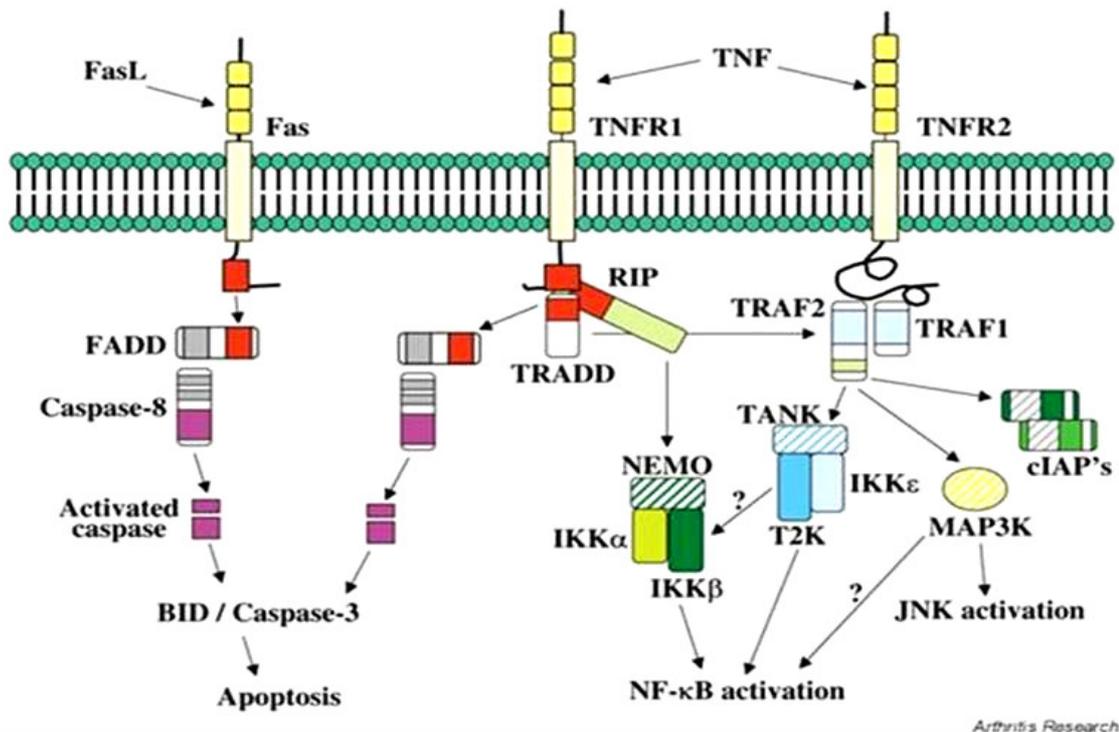
Uma citocina tende a ter múltiplas células alvo e múltiplas funções, no entanto, citocinas diferentes podem ter ações similares. A exposição de células a duas ou mais citocinas diferentes pode levar a respostas qualitativamente diferentes. Além disso, uma citocina pode aumentar (ou diminuir) a produção de outra citocina (ou dela mesma) ou a expressão de receptores para outra citocina e assim resultar em ações indiretas. Um exemplo disso seria a demonstração da ação mitogênica da IL-1 em timócitos murinos, uma das primeiras descobertas nesse sentido. Essa ação mitogênica envolve a estimulação da produção de IL-2 por IL-1. IL-2 é a verdadeira molécula efetora responsável pela estimulação da proliferação de timócitos (SMITH *et al.*, 1980). Esse efeito estimulatório de IL-1 na produção de IL-2 e o papel dessa interação na proliferação de células T tornaram-se um paradigma para as ações de muitas outras citocinas. Após isto, descobriu-se que IL-1 também é capaz de estimular a produção de IL-6 (CONTENT *et al.*, 1985) GM-CSF (ZUCALI *et al.*, 1986), IL-8 (MATSUSHIMA *et al.*, 1989), e o fator ativador e quimiotático para monócito (MCAF) (LARSEN *et al.*, 1989) em vários tipos celulares. Todas essas citocinas são também induzidas por TNF o que está em consonância com as inúmeras similaridades vistas entre as ações de IL-1 e TNF (LE; VILCEK, 1987; NETA; SAYERS; OPPENHEIM, 1991). Em monócitos, tanto TNF como IL-1 agem como agentes estimulatórios com respostas individuais, e em adição, eles estimulam a produção um do outro, o que amplifica a resposta individual de ambos (NETA; SAYERS; OPPENHEIM, 1991).

### **1.3.1 O fator de necrose tumoral (TNF)**

TNF, sigla para *tumor necrosis factor* (BEUTLER *et al.*, 1985a), é um termo que pode ser usado tanto para designar o grupo de citocinas associadas como “TNF” (que incluem TNF-alfa, TNF-beta e FasL), quanto para indicar apenas o membro mais expressivo do grupo, o TNF-alfa. Primeiramente descritas por Carswell *et al.* (1975) sobre “um fator sérico induzido por endotoxinas que causava *necrose tumoral*”, elas foram se tornando mais conhecidas e mais numerosas, compreendendo hoje 18 membros (LOCKSLEY *et al.*, 2001). O membro da família mais estudado, o TNF- $\alpha$ , é um trímero com cada um de seus monômeros unidos por cadeias beta hidrofóbicas (ECK; SPRANG, 1989).

O TNF- $\alpha$  é pluripotente, sendo secretado por macrófagos em resposta a variados agentes inflamatórios, particularmente endotoxinas bacterianas. O TNF- $\alpha$  também foi isolado como caquexina (BEUTLER; MAHONEY *et al.*, 1985b; BEUTLER; GREENWALD *et al.*, 1985), que mostrou ser mediadora de febre induzida por endotoxinas (DINARELLO *et al.*, 1986), choque (BEUTLER *et al.*, 1985c; TRACEY *et al.*, 1986) e caquexia (OLIFF *et al.*, 1987), e acredita-se que o TNF- $\alpha$  tem um papel importante na caquexia induzida por doenças crônicas incluindo o câncer e a AIDS. Esta citocina também induz necrose hemorrágica de tumores transplantáveis em ratos e é especificamente citotóxica em vários tipos de células tumorais (CARSWELL *et al.*, 1975; SUGARMAN *et al.*, 1985). As funções biológicas da molécula são mediadas por ligações de alta afinidade a receptores expressos em muitos tipos celulares; efeitos específicos da ligação ao receptor incluem inibição do metabolismo de triglicerídios em adipócitos (BEUTLER *et al.*, 1985b; KAWAKAMI *et al.*, 1981; TORTI *et al.*, 1985); ativação de neutrófilos (SHALABY *et al.*, 1985; KLEBANOFF *et al.*, 1986) e estimulação dos protooncogenes *c-myc* e *c-fos* em fibroblastos (KRONKE *et al.*, 1994). O TNF possui também importância nos processos imuno-mediados, pois genes que codificam o TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  também estão envolvidos com a expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (SPIES *et al.*, 1986; MULLER *et al.*, 1987).

Paralelamente, se descobriu muito sobre as proteínas celulares que interagem com os membros da família TNF: os receptores de TNF, ou TNFR, uma família de proteínas transmembranas que incluem TNFR1, TNFR2 e o Fas (um dos “receptores de morte”), dentre outros (LOCKSLEY *et al.*, 2001). As funções do TNF- $\alpha$  são mediadas através dos dois receptores, TNFR1(p55) e TNFR2(p75), ambos expressos em muitos tipos de células, especialmente nas superfícies de células T, subtipos CD8 e CD4 ativados (WARE *et al.*, 1991). A maioria das respostas biológicas classicamente atribuídas ao TNF- $\alpha$  são mediadas pelo receptor TNFR1, o qual possui atividades inflamatórias, ativação de fibroblastos e apoptose. Enquanto o TNFR2 está relacionado à proliferação de linfócitos e sinalização nos processos inflamatórios (BAO *et al.*, 2003). Ver figura 8.



**Figura 8 - Supostas vias de sinalização intracelular das superfamílias de receptores do fator de necrose tumoral (TNF)**

Nota: O Fas, Receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) e Receptor de TNF tipo 2 (TNFR2) são mostrados ao longo da membrana celular com seus domínios extracelulares se projetando no espaço extracelular. Varias proteínas adaptadoras e moléculas de transdução de sinais que convergem sinais iniciados a partir da ligação dos ligantes tais com o Ligante “Fas” (FasL) ao receptor Fas e TNF aos receptores TNFR1 e TNFR2, respectivamente, são mostrados, como sendo uma interação cruzada entre várias moléculas e vias. Domínios funcionais com a proteína são mostrados como blocos coloridos. Recrutamentos de uma proteína com outra é indicada por justaposição de blocos de domínio tipo-amoldados e tipo-coloridos. Domínio de Beta interação (**BID**, Beta Interaction Domain); Inibidores de apoptose Celular (**cIAPs**, Cellular Inhibitors of Apoptosis); Proteínas de domínio de morte associados ao Fas (**FADD**, Faz-Associated Death Domain Protein); Kinase do IkappaB (**IKK**, IkappaB Kinase); Kinase do N-Terminal de c-Jun (**JNK**, C-Jun N-Terminal Kinase); Kinase de proteína 3 ativada por Mitose (**MAP3K**, Mitogen-Activated Protein 3 Kinase); Proteína Moduladora do Essencial NF-kappaB (**NEMO**, NF-kB Essential Modulator Protein); Proteína de Interação entre receptores (RIP, Receptor Interacting Protein), Kinase Associada a TRAF2 (**T2K**, TRAF2-Associated Kinase); Ativador de NF-kB associado a membro da Família TRAF (**TANK**, TRAF Family Member Associated NF-kappaB activator); Proteína de Domínio de Morte Associada ao receptor de TNF (**TRADD**, TNF Receptor-Associated Death Domain Protein); Fator Associado ao Receptor de TNF (**TRAF**, TNF Receptor-Associated Factor 1 e 2.).

**Fonte:** Mak e Yeh, *Arthritis Research*, 2002.

TNFR1 e TNFR2 foram os primeiros membros da família de TNFR a ser identificados. Estudos têm demonstrado que o TNFR1 está envolvido em sinalização que desencadeia inflamação e sobrevivência celular. Em resposta a um único ligante (TNF), TNFR1 pode, contraditoriamente, mediar sinalização apoptótica. Em contraste, TNFR2 está envolvido na transdução de sinais principalmente para sobrevivência e inflamação. O Receptor Fas (CD95), medeia principalmente sinais para apoptose em resposta a ligações de ligantes do Fas. Em respostas à ligação dos agonistas várias proteínas são recrutadas para domínios específicos nas caudas citoplasmáticas dos receptores. São estes os supostos efetores (ver figura 8) os quais variam em estrutura e função, que determinam os sinais resultantes. Alguns efetores são enzimas, tais como kinases, fosfatases e proteases e outros são proteínas adaptadoras que servem para recrutar mais sinais intermediários, e outras são proteínas reguladoras. Entender a natureza e função destes efetores irá nos permitir explicar muitas respostas celulares específicas (MAK; YEH, 2002). Ver figura 8.

O TNF $\alpha$  é sintetizado como um polipeptídeo precursor de dupla-camada de 26kDa que é clivado por proteólise para liberar uma subunidade de 17kDa. A proteólise é mediada por uma enzima conversora de TNF (TNF $\alpha$  converting enzyme-TACE), Uma proteinase que pertence à família de Adamalins de mamíferos (ADAMs- A Desintegrins e Metaloproteinases). Desta forma, TACE/ADAM17 é o único conhecido ADAM para processar o TNF $\alpha$  (BLACK *et al.*, 1997, MOSS *et al.*, 1997). Existem muitos trabalhos indicando um envolvimento da TACE no mecanismo de neuroproteção (HURTADO *et al.*, 2001, 2002). Na clivagem, a liberação das formas de TNF formam um homo-trímero bioativo, o qual exerce seus efeitos de maneira autócrina e/ou parácrina. As ações pleiotrópicas do TNF- $\alpha$  são mediadas através de dois distintos receptores: TNFR1 (p55) e TNFR2(p75). Somente TNFR1 contém um domínio de morte citoplasmático e pode diretamente induzir apoptose. Entretanto, a via de transdução do TNFR1 é mais complexa. Resumidamente, a ligação do trimero TNF com o domínio extracelular do TNFR1 é reconhecida por uma proteína adaptadora chamada de domínio de morte associado ao receptor de TNF (TNF receptor-associated death domain = TRADD), a qual recruta proteínas adicionais: proteína que interage com receptor (receptor-interacting protein = RIP), Um fator associado ao receptor de TNF (TNF receptor-associated factor = TRAF1 e TRAF2) e um domínio de morte associado ao FAZ (FAZ-associated death domain (FADD). Essas duas últimas proteínas recrutam enzimas chave que são responsáveis pela iniciação dos eventos de sinalização do TNFR1. Por exemplo, Caspase-8 é recrutada pelo FADD para o complexo do TNFR1 e inicia a cascata de proteólise que direciona à apoptose. Por outro lado TRAF2 recruta inibidor celular de apoptose (inhibitor of apoptosis protein-1 e

2 – cIAP-1 e cIAP-2), duas proteínas anti-apoptose que também possuem atividade de se ligar a proteína Ubiquitina. Além disso, TRAF2 pode ativar uma via da proteína Kinase ativada por Mitose (Mitogen-Activated Protein Kinase-MAPK) desencadeando a ativação da Kinase de N-Terminal do c-Jun (c-Jun N-Terminal Kinase - JNK) que provoca fosforilação do c-Jun, aumentando sua atividade transcricional. Finalmente, a proteína kinase RIP é crítica para a ativação do fator de transcrição NF-kappaB. Então TNF- $\alpha$  se ligando ao TNFR1 pode resultar em ativação de apoptose ou atividade transcricional (revisado por FIGIEL, 2008). Ver figura 8.

O papel do TNFR2 no cérebro é menos conhecido. Por um longo tempo tem sido sugerido ser responsável pelos sinais regulatórios proliferativos. Entretanto, apesar do fato de que TNFR2 não estar envolvido com a via de apoptose diretamente, estudos com anticorpos específicos para receptores de TNF- $\alpha$  mostraram que a estimulação deste receptor resulta na indução do TNF- $\alpha$  precursor endógeno, o qual subsequentemente ativa TNFR1 (GRELL *et al.*, 1999). Fotin-Mleczek *et al.*, (2002) reportaram que em linhagem de células de câncer TNFR2 pode competir com TNFR1 para o recrutamento do fator anti-apoptótico TRAF2-*bound* recentemente sintetizado, desta forma promovendo a formação do complexo TNFR1-ativador da Caspase-8. Entretanto, a fisiológica relevância da depleção de TRAF2 e interferência cruzada dos receptores de TNF- $\alpha$  necessitam ser melhor avaliadas (Revisado por FIGIEL, 2008).

### 1.3.2 Interleucina -1 (IL-1)

“IL-1” é a denominação dada a um grupo de citocinas que compreende as variantes IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1ra (DINARELLO, 1991), descritas em 1972 como fator ativador de linfócitos (LAF) (GERY *et al.*, 1972) e clonadas em 1984 (DINARELLO, 1991; AURON *et al.*, 1984), que participam de cadeias de reações químicas em quase todo o organismo (DINARELLO, 1994). A IL-1 tem ações inflamatórias, hematopoiéticas, imunológicas, metabólicas e fisiológicas (DINARELLO, 1991), sendo que das quais as mais conhecidas são as ligadas a mecanismos imunes e inflamatórios. Quimicamente, o grupo IL-1 é composto por resíduos de 17kDa a partir de uma proteína precursora de 31kDa, no caso dos agonistas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e de uma proteína precursora de 23kDa, no caso do antagonista IL-1ra. Tanto os precursores dos agonistas da família IL-1 quanto o antagonista são codificados por genes bastante relacionados na região 2q12-q21 do cromossomo 2. Fisiologicamente, a IL-1 é uma citocina secretada principalmente por fagócitos mononucleares em resposta a um estímulo,

para então interagir com diversos tipos de células (por meio de uma proteína do grupo dos receptores de IL-1 (IL-1r)), sendo descrita como uma citocina de altíssima eficiência. (BORASCHI *et al.*, 1996).

### 1.3.3. Interleucina -10 (IL-10)

Originalmente identificada como Fator Inibitório de Sínteses de Citocinas CSIF (FIORENTINO, 1989) foi descoberta como um produto das células Th2 (linfócitos *T Helper* tipo 2) que suprimem a produção de IFN- $\gamma$  em células Th1 (FIORENTINO *et al.*, 1989; MOSMANN *et al.*, 1991; MOORE *et al.*, 1990). IL-10 inibe a produção de citocinas em células Th1 somente na presença de células acessórias, especialmente macrófagos, atuando no sistema de apresentação de antígenos (MHC, complexo de histocompatibilidade maior, classe II) (FIORENTINO *et al.*, 1991). IL-10 inibiu a produção de muitas citocinas em vários tipos de células (MOORE *et al.*, 1993) por exemplo, suprimiu síntese de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$  em monócitos e macrófagos (de WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991b; BOGDAM *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1994a; WANG *et al.*, 1994b), de IL-1, IL-8 e TNF $\alpha$  em neutrófilos (WANG *et al.*, 1994a) e de IL-2, TNF $\beta$ , interferon- $\gamma$ , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, e outros fatores em células T (FIORENTINO *et al.*, 1991a). IL-10 junto com TGF- $\beta$  (*Transforming Growing Factor- $\beta$* , um inibidor da proliferação de linfócitos dependente de IL-1) são fatores supressores de linfócitos já purificados e clonados (KEHRL *et al.*, 1986; WAHL *et al.*, 1988).

Segundo o estudo *in vitro* de Bogdan (1992), IL-10 pode suprimir a liberação de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  a partir de macrófagos e células Th1, promovendo degradação dos RNAm destas citocinas através da indução da atividade da ribonuclease sobre os transcritos destas citocinas (RNAm) ou induzindo uma proteína que aumenta a susceptibilidade dos RNAm de TNF, e IL-1 à ação das ribonucleases. IL-10 também atua aumentando a sobrevivência e proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos. Na verdade, esta citocina pode bloquear a atividade do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B, exercendo suas funções biológicas através da via Janus Kinase / Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (JAK/STAT) (WANG *et al.*, 1995).

### Supostas vias de atuação da IL-10

Em monócitos estimulados por Lipolisacarideo (LPS) ou TNF $\alpha$ , IL-10 inibiu seletivamente a localização nuclear do Fator Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição envolvido na expressão de genes de citocinas inflamatórias. Inibição da ativação do NF- $\kappa$ B pode ser um importante mecanismo da IL-10 para supressão da transcrição dos genes de citocinas inflamatórias em monócitos humanos (WANG *et al.*, 1995).

Segundo Zhou, (2009) IL-10 exerce uma influência trófica direta nos neurônios da medula espinal, e que a ativação do receptor de IL-10 neuronal proporciona suporte trófico e atributos de sobrevivência para as conseqüências dos efeitos *in vitro* do Glutamato. O tratamento com IL-10 resultou na ativação da via Jak-Stat3 e PI3K-AKT nos neurônios para aumentar a expressão de Bcl-2 e Bcl-x(L). Sob condições de estresse IL-10 bloqueou a liberação do Citocromo C e clivagem da Caspase. IL-10 ativando a via do NF- $\kappa$ B aumentou translocação do p50 e p65 e aumentaram suas ligações com as seqüências de DNA para o NF- $\kappa$ B, com o p50 tendo um papel predominante na sobrevivência neuronal. Estes dados indicam que, em adição aos já conhecidos efeitos anti-inflamatórios através da astróglia em outras células inflamatórias, IL-10 possui efeitos neuronais diretos com importantes implicações para o desenvolvimento e neuroproteção.

Em células RAW 264.7 estimuladas por LPS e IL-10, a expressão de Bcl-3 que inibi a ativação de NF- $\kappa$ B foi significativamente aumentada. A expressão de Ikappa-zeta (induzida em resposta ao LPS), a qual promove produção de IL-6, foi definitivamente suprimida na presença de IL-10. A partir de outros experimentos, foi sugerido que Bcl-3 induzido por IL-10 pode reduzir a atividade de IkappaB-zeta via ativação do NF- $\kappa$ B (DAGVADORJ *et al.*, 2009)

#### 1.3.4. Citocinas e dor

A participação das citocinas na hiperalgesia inflamatória tem sido muito estudada atualmente. A hiperalgesia parece ser causada pela ação de mediadores liberados por duas vias distintas: a hiperalgesia causada por eicosanóides e a hiperalgesia causada por simpaticomiméticos. Após essas confirmações, foi demonstrado que a liberação de produtos da cicloxegenase e de aminas simpaticomiméticas é subsequente à liberação IL-1 $\beta$  (FERREIRA *et al.*, 1988) e de IL-8 (CUNHA *et al.*, 1991) respectivamente, o que foi evidenciado no modelo de hiperalgesia mecânica em pata de rato (Randal-Sellito modificado por FERREIRA *et al.*, 1978). Nesses estudos, a hiperalgesia induzida por IL-1 $\beta$  foi bloqueada

por indometacina (inibidor de ciclooxigenase), mas não por drogas simpato-líticas (propranolol, atenolol ou guanetidina), enquanto que a hiperalgesia induzida por IL-8 foi bloqueada pelo pré-tratamento com simpato-líticos, mas não por indometacina. Ademais, a hiperalgesia induzida por carragenina foi parcialmente bloqueada por ambos os tipos de drogas (CUNHA *et al.*, 1991).

Sabendo-se da capacidade de várias citocinas em induzir a sua própria produção e a produção de outras citocinas como: TNF que induz a produção de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986), IL-1 que induz a produção de IL-2 (DINARELLO *et al.*, 1987), IL-6 (VAN DAMME *et al.*, 1987), e IL-8 (STRIETER *et al.*, 1989), esses mesmos autores e Cunha *et al.* (1992a), demonstraram um papel de pivô para o TNF na modulação da hiperalgesia induzida por carragenina no mesmo modelo experimental. Foi proposto que TNF ativa uma cascata de liberação de citocinas. A indução da liberação de IL-8 ou CINC-1 (quimioatraente para neutrófilo) por TNF leva à hiperalgesia mediada por simpaticomiméticos, e a indução de IL-1 $\beta$  e IL-6 por TNF leva à hiperalgesia mediada por produtos da ciclooxigenase. Isso foi confirmado pelo fato de que a injeção de TNF mimetizou a capacidade da Carragenina em induzir a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8/CINC-1 e também pelo fato de que uma única injeção com o anticorpo anti-TNF foi capaz de abolir esse efeito da Carragenina (CUNHA *et al.*, 1992a; LORENZETTI *et al.*, 2002). As mesmas evidências foram demonstradas no modelo de contorções abdominais (DUARTE *et al.*, 1988; THOMAZZI, 1996). A cascata de citocinas iniciada por TNF já havia sido demonstrada em um modelo de sepse experimental onde foi sugerido que TNF exerce importante papel na propagação da cascata de mediadores que participam da defesa do hospedeiro. Fong e Lowry (1990) revisaram tal assunto e tiveram três conclusões importantes: (1) que TNF é um dos primeiros mediadores secretados em resposta a um estímulo nocivo, a sua administração a animais e humanos induz a liberação de outros mediadores endógenos; a neutralização da sua atividade diminui a liberação de outros mediadores durante uma bacteremia. (2) Dentre os mediadores que são liberados em resposta ao TNF estão as citocinas IL-1 e IL-6. Esta liberação ocorre em forma de cascata. TNF é liberado após 15-30 min da injeção de um agente infeccioso, sendo o pico de TNF circulante aos 90min. IL-1 não atinge o pico antes das 4 horas após a injeção do agente estimulante enquanto que os níveis de IL-6 ainda estão subindo ao final de 8h de observação. (3) A administração profilática do anticorpo anti-TNF foi capaz de inibir a liberação de IL-1 e IL-6 no modelo de sepse observado em tal estudo confirmando os dados anteriores.

Hoje se sabe que a cascata de citocinas promovida por TNF na hiperalgesia inflamatória, em alguns casos, é subsequente à ação da bradicinina, dependendo da

intensidade e do tipo de estímulo (FERREIRA *et al.*, 1993). Se o estímulo hiperalgésico é de magnitude suficiente, a cascata de citocinas pode ser acionada independentemente da estimulação do receptor de bradicinina Bk<sub>2</sub> (FERREIRA *et al.*, 1993).

Bradicinina pode não só iniciar a cascata de mediadores, mas também contribuir para a manutenção dessa cascata e da injúria através dos receptores Bk<sub>1</sub>, receptores que são ativados por IL-1 $\beta$  mas não por TNF, demonstrado em modelos de hiperalgisia térmica e mecânica (PERKINS; KELLY, 1993; DAVIS; PERKINS, 1994). Foi proposto, então, que receptores BK<sub>2</sub> participariam da fase inicial da resposta dolorosa inflamatória e Bk<sub>1</sub> manteria o estado doloroso (DRAY; PERKINS, 1993).

O contrário também é válido; TNF induz a liberação de bradicinina. Foi demonstrado por Tonussi e Ferreira (1999) que TNF pode induzir incapacitação articular quando dado em articulações previamente estimuladas (72 h antes) com carragenina. Esta incapacitação é mais intensa, atinge o pico em 1 hora e pode durar até 5 horas. A incapacitação é inibida pelo pré-tratamento com o antagonista de receptor B<sub>1</sub> da Bradicininina. Os autores sugerem que a persistência da incapacitação deve-se a um *feedback* positivo entre os dois mediadores (Bradicinina gerando TNF e TNF gerando Bracinina). Neste mesmo estudo foi observado ainda que a incapacitação induzida por Carragenina é mediada por TNF, pois o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF inibiu a nocicepção. Além disso, TNF também induz a liberação de leucotrieno, visto que o inibidor da lipoxigenase MK886 inibiu a incapacitação persistente induzida por TNF (TONUSSI; FERREIRA, 1999).

Os papéis do TNF, IL-1 $\beta$  e IL-8 foram observados também na hiperalgisia persistente. Sachs *et al.* (2002) demonstraram que injeção diária de TNF, IL-1  $\beta$  ou IL-8 por mais de 18 dias induzia uma hiperalgisia persistente que durava 30 dias após o término da indução. A hiperalgisia persistente induzida por IL-8 era abolida pelo pré-tratamento diário com Atenolol, a induzida por IL-1 $\beta$  era abolida pelo tratamento diário com indometacina e a hiperalgisia persistente induzida por TNF era totalmente abolida pelo tratamento diário com a associação Idometacina e Atenolol. Estudos prévios relatam que a hiperalgisia persistente é causada por estímulo persistente e os autores sugerem que estímulos persistentes induzem uma produção contínua de TNF o que levaria a liberação de IL-1  $\beta$  e IL-8 assim induzindo a liberação de mediadores finais como eicosanóides e simpatomimédicos que então sensibilizariam o nociceptor.

Parada *et al.* (2003) demonstraram que TNF media a facilitação da hiperalgisia crônica (ou hiperalgisia crônica latente) induzida por Carragenina pois o tratamento com anticorpo anti-TNF antes da Carragenina tanto inibiu a hiperalgisia aguda como a facilitação

crônica que foi medida depois de 5 dias da injeção de Carragenina e evocada com PGE<sub>2</sub>. Os mesmos autores ainda observaram que TNF também por si só induz tanto a hiperalgesia aguda como a facilitação da hiperalgesia crônica e que essa hiperalgesia latente não é inibida por indometacina ou por um inibidor simpático indicando que o papel de TNF na facilitação da hiperalgesia crônica é diferente do da hiperalgesia aguda. Outros dados do mesmo estudo sugerem que TNF induz a hiperalgesia crônica latente através de seu receptor TNFR1 ativando a Proteína Quinase C (PKC) enquanto que sua ação na hiperalgesia aguda seria de uma maneira indireta talvez induzindo a liberação de outros mediadores.

Outro estudo relata que a atividade nociceptiva de TNF está relacionada principalmente às fibras do tipo C onde a citocina produziria uma sensibilização aguda de mecanismo rápido talvez por ação em receptores presentes nas fibras C ou então ativando a enzima COX levando a geração de eicosanóides (JUNGER; SORKIN, 2000).

### **1.3.5. Citocinas e inibição da resposta inflamatória e nociceptiva**

O estudo da inibição de citocinas pró-inflamatórias e nociceptivas têm se desenvolvido muito por ser de fundamental importância para o controle do processo inflamatório e nociceptivo. Muitos estudos utilizam inibidores como antagonistas do receptor para IL-1 (IL-1ra) ou proteínas ligantes para TNF ou IL-1, como os seus receptores solúveis para esse fim. Outros trabalhos utilizando citocinas que inibem a síntese de TNF e IL-1, dentre outras citocinas pró-inflamatórias, como também citocinas que promovem a produção de seus inibidores naturais, mostraram que a resposta inflamatória tem moduladores negativos endógenos, servindo como um freio para a inflamação. Essas citocinas têm a vantagem de inibir tanto a síntese de IL-1 e TNF como a de outras citocinas e mediadores. Na lista de citocinas que possuem essas propriedades inibitórias estão: IL-4, IL-10, IL-13, IL-6, TGF- $\beta$  e IFN $\alpha$ .

IL-10 é produzida por diversos tipos celulares incluindo linfócitos Th2, Monócitos, Macrófagos e Mastócitos (FIORENTINO *et al.*, 1989). Acredita-se que IL-10 tem um papel inibitório importante nas reações de hipersensibilidade tardia (HOWARD; O'GARRA, 1992) e na supressão das funções de macrófagos como a expressão de MHC classe II (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991b) adesão (FIORENTINO *et al.*, 1991), síntese de citocinas pró-inflamatórias e expressão de COX-2 e NOSi (BOGDAN *et al.*, 1991; DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991a; FIORENTINO *et al.*, 1991; OSWALD *et al.*, 1992; CUNHA *et al.* 1992b; NIIRO *et al.*, 1995, 1997). Também já foi demonstrado que IL-10 inibe a hiperalgesia

inflamatória mecânica induzida por Carragenina através de dois mecanismos: inibição de citocinas hiperalgênicas e bloqueio da indução de COX-2 (POOLE *et al.*, 1995).

Em modelos de incapacitação articular e contorções abdominais se verificou que os níveis de citocinas pró-inflamatórias em fluido articular e peritoneal estavam diminuídos em animais tratados com IL-4, IL-10 e IL-13. E o tratamento com anti-soror anti-IL-10, anti-IL-4 e anti-IL-13 amplificou as contorções abdominais assim como aumentou a incapacitação articular, sugerindo um papel modulador negativo endógeno para essas citocinas na dor inflamatória (VALE *et al.*, 2003).

#### 1.4. DEGENERAÇÃO WALLERIANA (DW), INFLAMAÇÃO E SISTEMA IMUNE

O processo de degeneração no nervo periférico consiste cronologicamente em degeneração neuronal (degeneração axonal aguda), degradação da bainha mielina, fagocitose dos fragmentos (fragmentos) de mielina e dos fragmentos de axônios (remoção dos resíduos não necessários ao nervo) proporcionando um ambiente favorável para posterior alongamento dos axônios e remielinização (HIRAGA *et al.*, 2006), viabilizando a recuperação da propagação normal do potencial de ação e das funções sensitivas ou motoras.

O processo de degeneração do nervo periférico inicia quando o axônio se encontra submetido a qualquer tipo de trauma. Um fator de ativação e proliferação produzido a partir do axônio, presente na membrana axonal, chamado de neuregulina (GUERTIN *et al.*, 2005) sinaliza para a ativação e proliferação das células de *Schwann* através de receptores tipo tirosina kinase (ErbB2) presentes na membrana destas células (CARROLL *et al.*, 1997). As células de *Schwann* em contato com axônios íntegros não são ativadas (MURINSON *et al.*, 2005). A ativação das células de *Schwann* é um evento importante no início da DW. Possuem um papel chave tanto na quebra da bainha de mielina como também promovem uma rápida remoção dos fragmentos de mielina e do axônio na ausência dos macrófagos (STOLL *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 1995, FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995).

Células de *Schwann* e macrófagos produzem altos níveis de metaloproteases (WEE YOUNG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996) que degradam a mielina e desta forma promovem especificamente a digestão das proteínas da mielina (MATYSZAK; PERRY, 1996; CHANDLER *et al.*, 1997; PROOST *et al.*, 1993; SHUBAYEV; MYERS, 2000; MYERS *et al.*, 2001).

Em seguida, a fagocitose a partir das células de *Schwann* e macrófagos são importantes para a remoção (*clearance*) dos fragmentos (fragmentos) de axônios e de mielina (BRÜCK, 1997).

Logo após a injúria neural, ambas as células de *Schwann* mielinizantes como não mielinizantes (*Remak*) entram em estado de des-diferenciação, ou seja, entram em ciclo celular (PELLEGRINO *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 1995, MURINSON *et al.*, 2005), interrompem sua síntese de mielina, proliferam e realizam a remoção da mielina. O processo de remoção pela célula de *Schwann* consiste de três maneiras: degradação de sua própria mielina, fagocitose dos resíduos de mielina extracelulares e apresentação da mielina para os macrófagos. As células de *Schwann* digerem mielina em vacúolos intracelulares através da ação de enzimas hidrolíticas (revisto por VARGAS; BARRES, 2007).

A remoção de mielina no SNP está dividido em duas fases: uma fase precoce independente de anticorpos mediada por células de *Schwann* e outra fase tardia dependente de anticorpos mediada por fagócitos hematógenos (revisto por VARGAS; BARRES, 2007). O que poderia explicar a intensa infiltração de células T, monócitos e macrófagos no local da injúria em nervo periférico observado em 1928 por Ramon y Cajal.

No entanto, foi em 1850 que Augustus Volney Waller descreveu a desintegração do nervo glossofaríngeo e hipoglosso de anfíbio após axotomia. Ele observou que os axônios começavam a ficar desorganizados. Em seu trabalho Waller (1850) descreveu: “*Em torno de cinco ou seis dias após secção os axônios se tornavam mais distintos como um tipo de coalhada e, as vezes se tornavam com aspecto de esponja, como se mielina e axônio se misturassem*”. Em torno do décimo dia, descreveu as massas fusiformes em intervalos (provavelmente as estruturas ovóides da mielina em degeneração) e comentou que a bainha de mielina não era mais visível no segmento distal, e em torno do décimo segundo ou décimo quinto dia muitos dos axônios não eram mais vistos, sendo removidos por absorção (fagocitose) (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

Meio século depois, Ramon y Cajal contribui de forma relevante com os achados de Waller. Ele observou que os leucócitos se infiltravam em nervos sob DW provocada por lesão e achou que esse fenômeno representava uma lesão “imune e paradigmática”. Cajal confirmou as observações de Waller e complementou com uma brilhante e detalhada descrição histológica da degeneração axonal, formação “ovóide” da mielina, ativação das células de *Schwann* e infiltrações leucocitárias (RAMON Y CAJAL, 1928, traduzido e reimpresso em 1991).

Análises imunocitoquímicas posteriores confirmaram que, após injúria, células T e macrófagos se infiltram no sítio de lesão dentro de dois dias, e no 4º dia começam a se dispersar no coto distal. Semelhante fenômeno se pode observar no modelo experimental da síndrome de Guillain Barré (neurite auto-imune), onde nervos periféricos são infiltrados por células T e macrófagos, direcionados para uma larga extensão da área de desmielinização e da lesão axonal. Por outro lado, o processo inflamatório após axotomia tem um papel benéfico na reparação neural (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

O que Waller descreveu como sendo um processo em consequência de lesão do nervo glossofaríngeo de rã é agora aceito e aplicado para todas as lesões que comprometem à integridade do axoplasma. Desta forma os processos de degeneração Walleriana podem ser causados por processos inflamatórios ou lesões auto-ímmunes no axônio, como também lesões traumáticas tais como secções ou esmagamento. As respostas imunológicas que ocorrem nas

doenças auto-imunes parecem também ocorrer na DW de nervos lesados por secção ou esmagamento (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

Avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos na degeneração e regeneração do nervo são freqüentes no campo da neuroimunologia. Atualmente se sabe que interações neuro-imunes são fundamentais para o processo da DW (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

No processo auto-imune, as respostas de células T e macrófagos são orquestradas por uma complexa rede de citocinas, incluindo citocinas pró e anti-inflamatórias. Uma seqüência altamente ordenada de eventos envolvendo a expressão de citocinas ocorre ao longo do coto distal durante a degeneração Walleriana no SNP. Hall (1978) considerava que a rápida proliferação das células de *Schwan* (3 a 4 dias após à lesão) seria um evento decisivo para promover a regeneração do axônio (HALL, 1978; FAWCETT; KEYNES, 1990). Mais recentemente, estudos imunocitoquímicos e de hibridização *in situ* revelaram que as células de *Schwann* são as maiores fontes das respostas precoces de citocinas (na liberação/concentração de citocinas) (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

#### **1.4.1 Degeneração axonal aguda**

Antes mesmo da DW propriamente dita ocorre o processo chamado de degeneração axonal aguda (AAD), sendo uma precoce resposta axonal à injúria. Kerschenstein *et al.* (2005) demonstrou em um bonito estudo de imagens *in vivo* que em 30 min centenas de micrômetros de axônios degeneram.

Pouco se sabe sobre os mecanismos intracelulares que desencadeiam a AAD. No entanto, o Influxo de cálcio é um dos eventos mais precoces e sinaliza o início da degeneração (KRAUSE *et al.*, 1994).

A desintegração granular do citoesqueleto axonal está relacionada à ativação de uma protease dependente de íon (SCHLAEPFER; BUNGE, 1973). A ativação desta enzima, a m-calpaina (uma proteinase ativada por cálcio), ocorre precocemente na DW, antes mesmo do início da degeneração em nervos periféricos. No entanto, outros autores demonstram evidências de que o axolema é destruído por um mecanismo independente de cálcio (FINN *et al.*, 2000; GEORGE *et al.*, 1995; ZHAI *et al.*, 2003).

Muitas evidências sugerem que a degeneração axonal é um mecanismo distinto de apoptose. A procaspase-3 ativada em apoptose neuronal é desencadeada pela retirada de NGF. Mas não é ativada durante a DW em nervo óptico (FINN *et al.*, 2000). Outro fato intrigante é

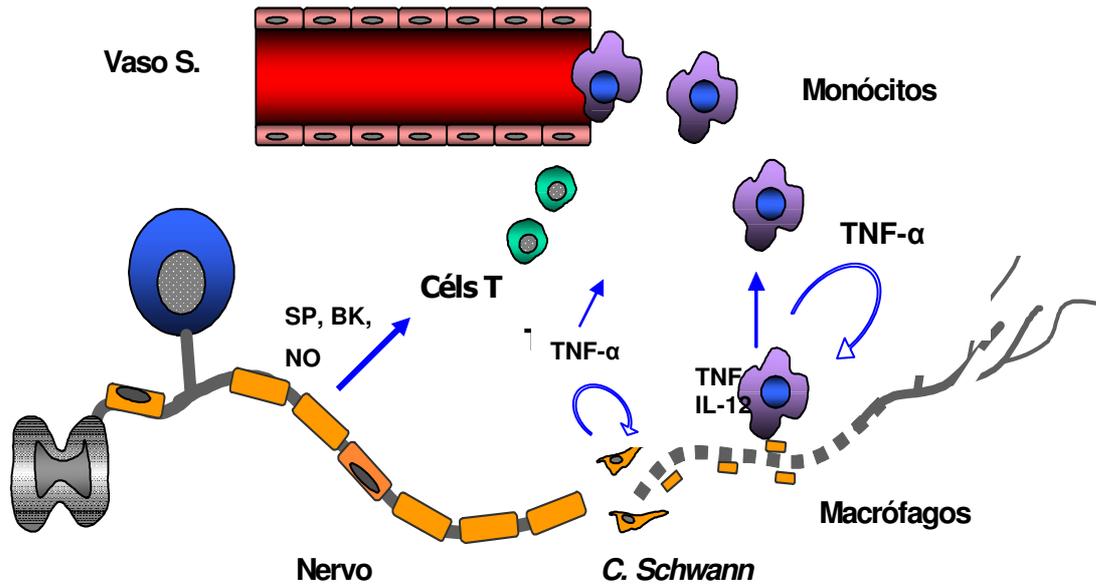
que a expressão do BCL-2, um inibidor intracelular de apoptose, não inibe a degeneração axonal distal ao sítio da injúria (DUBOIS-DAUPHIN *et al.*, 1994).

#### **1.4.2. Citocinas envolvidas na degeneração Walleriana (DW)**

##### **1.4.2.1 Degeneração Walleriana e TNF- $\alpha$**

Logo no início da DW o TNF- $\alpha$  é liberado pelas células de *Schwann* e atua em receptores de TNF na membrana destas mesmas células, ou seja, o TNF- $\alpha$  é mediador autócrino nas células de *Schwann*. Este “Loop” pode estar envolvido na prolongada ativação das células de *Schwann* (QIN; CHENG, 2007). O TNF- $\alpha$  pode ainda ser liberado pelo endotélio, macrófagos residentes, e no SNC por oligodentrócitos e astrócitos após lesão axonal (STOLL *et al.*, 1993; WAGNER; MYERS, 1996). Ver figura 9.

Quando o nervo inicia o processo de DW a própria presença de fragmentos de mielina é estímulo para ativação de macrófagos. Foi demonstrado *in vitro* que macrófagos estimulados por fragmentos de mielina liberaram IL-12 e TNF $\alpha$  e este último pode atuar novamente de forma autócrina nos macrófagos. Esta liberação foi bloqueada por anticorpos que atuam contra os receptores do sistema complemento (Anti-CCR-3) envolvido na fagocitose de mielina. (CONSTANTINESCU *et al.*, 2000). Sugerindo que TNF $\alpha$  e IL-12 podem potencializar ou regular a atividade dos macrófagos na fagocitose dos fragmentos de mielina no nervo sob DW. Ver figura 9.



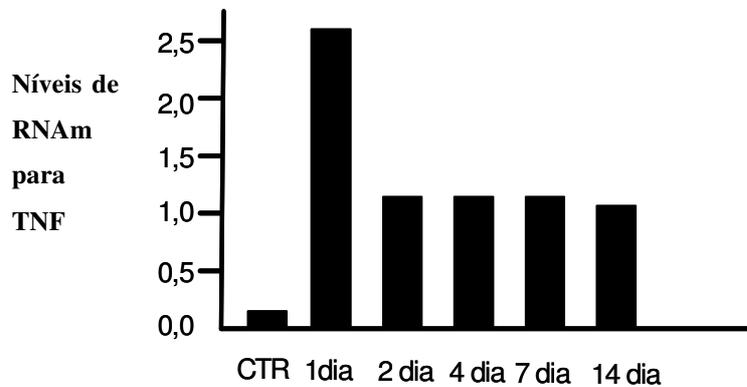
**Figura 9** - Liberação de TNF- $\alpha$  logo após lesão neural induzindo recrutamento de monócitos, macrófagos e células T. Substância P (SP), bradicinina (BK) e Óxido Nítrico (NO) facilitam também a migração de células  
 Fonte: Stoll *et al.* (1993); Wagner, Janjigian e Myers (1998); Liefner *et al.* (2000) e Scholz (2007)

O papel mais importante do TNF parece ser no recrutamento de macrófagos. Haja vista que em camundongos *knock-out* para TNF- $\alpha$ , o número de macrófagos presentes no nervo sob DW foi significativamente reduzido (LIEFNER *et al.*, 2000). TNF- $\alpha$  induz a produção de metaloproteases (MMP-9) em macrófagos e células de Schwann e estas por sua vez facilitam a infiltração de macrófagos hematogênicos para o interior do nervo periférico lesado, pois controlam a integridade do espaço extracelular e desencadeiam a quebra da barreira hemato-neural, facilitando a passagem de células em migração para o endoneuro (SHUBAYEV; MYERS, 2000; MYERS *et al.*, 2001). Substância P, CGRP, bradicinina e NO são liberados a partir do segmento proximal do nervo sob DW, induzem hiperemia e edema, promovendo a invasão de mais monócitos e linfócitos T (SCHOLZ, 2007). Ver figura 9.

É importante lembrar aqui o papel pivô do TNF- $\alpha$  induzindo a produção de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986), e a IL-1 que induz a produção de IL-2 (DINARELLO *et al.*, 1987), IL-6 (VAN DAMME *et al.*, 1987), e IL-8 (STRIETER *et al.*, 1989). Ou seja, muitos efeitos de outras citocinas no nervo podem ser desencadeados a partir da liberação do TNF- $\alpha$ .

A curva de expressão do TNF- $\alpha$  ao longo do curso da DW pode indicar em que estágio da mesma ele é mais importante ou mais atuante. Sugerindo-se que muitos fenômenos que acontecem sincronicamente aos picos de TNF- $\alpha$  podem estar relacionados aos seus efeitos. Através de estudos de RT-PCR, a expressão do RNAm para TNF $\alpha$  após lesão em nervo

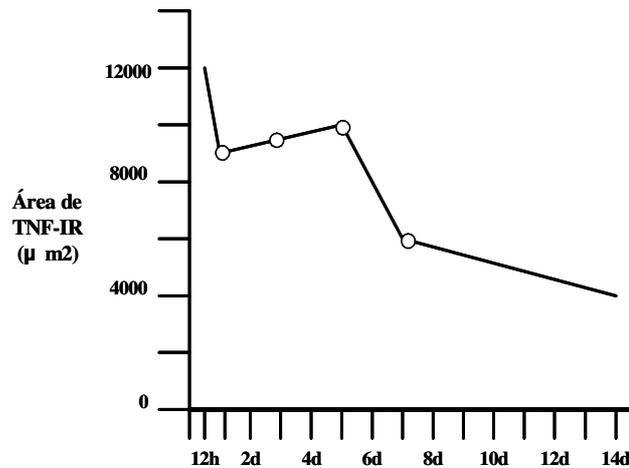
ciático demonstrou um pico no 1º dia, uma queda abrupta no segundo dia, se mantendo constante até o 14º dia (revisto por STOLL; JANDER; MYERS, 2002). Ver figura 10.



**Figura 10 - Resposta rápida de TNF à injúria neural:** Análise semiquantitativa da reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) dos níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  no segmento distal de nervos ciáticos em camundongos C57BL ao longo do tempo (dias) após esmagamento (*Crush*)

Fonte: (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

No entanto, através de estudos com morfometria quantificando-se a área imunoreativa para o TNF- $\alpha$ , George *et al.* (2004), relataram um pico de TNF- $\alpha$  já com 12 horas após lesão no nervo ciático de rato, uma queda (cerca de 20%) após o 1º dia se mantendo em níveis consideráveis até o 5º dia e a partir daí uma queda gradativa até o 14º dia. Voltando aos níveis basais a partir deste dia. Ver figura 11.



**Figura 11 – Níveis de proteínas de TNF-  $\alpha$  ao longo da DW:** Imunoreatividade para proteínas de TNF- $\alpha$  determinada por densitometria quantitativa em seções de nervo ciático de ratos (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica.

Fonte: George *et al.*(2004)

Um indicativo de que o TNF também possui funções constitutivas é o fato dele ter sido encontrado em níveis basais (proteínas de TNF- $\alpha$ , através de imunoensaio) em nervos normais, sem injúria. De forma diferente, a IL-1 $\beta$  está presente somente em neurônios lesados (SHAMASH *et al.*, 2002).

Como já comentado, a maioria das respostas biológicas classicamente atribuídas ao TNF- $\alpha$  são mediadas pelo receptor TNFR1, o qual possui atividades inflamatórias, ativação de fibroblastos e apoptose. Enquanto o TNFR2 está relacionado à proliferação de linfócitos e sinalização nos processos inflamatórios (BAO *et al.*, 2003). A partir disso se poderia perguntar se a expressão diferenciada dos receptores TNFR1 e TNFR2 ao longo do curso temporal dos processos inflamatórios, inclusive na DW, seria a chave para decidir qual direcionamento os mecanismos intracelulares iriam tomar: apoptose ou inflamação? Morte neuronal ou neuroproteção?

Através de estudos com ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) foram investigados os níveis TNFR1 e TNFR2 no endoneuro após constrição crônica do nervo ciático em camundongos. Foi demonstrado que o TNFR1 (apoptótico e inflamatório) endoneural aumentou duas vezes mais no 3º e 7º dia após lesão em nervo ciático. Enquanto que o TNFR2 (inflamatório) foi muito marcado já no 1º dia após lesão e aumentou de sete vezes mais no 3º e 7º dia e permaneceu elevado a um nível mais baixo até o 28º dia pós-lesão. Concluindo-se

que TNFR1 e TNFR2 endoneurais são diferentemente regulados durante DW (GEORGE, 2005). Outro estudo com medula espinal de ratos lesionada por trauma, demonstrou que o pico de TNFR2 ocorreu com 4h após a lesão enquanto que o do TNFR1 ocorreu com 8h (YAN, 2003), confirmando de certa forma a precocidade da expressão do receptor TNFR2.

Em condições de estresse, os efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  tais como a indução a apoptose neuronal, são presumivelmente atenuados pela formação de fragmentos solúveis dos receptores de TNF (TNFR-s). Com uma hora após lesão na medula espinal ocorre síntese e/ou secreção aumentada de TNF- $\alpha$  detectável no local da injúria. Entretanto a expressão de ectodomínios de TNFR-solúveis na medula espinal traumatizada não tinha ainda sido reportada. Em um estudo com ratos *Sprague-Dawley* adultos submetidos a uma injúria na medula espinal. E utilizando-se um cateter no espaço subaracnoideo para se coletar amostras do fluido cérebro-espinal (FCE), as quais foram analisadas por ELISA para detectar a presença do TNF- $\alpha$  e as formas solúveis de TNFR1-s e TNFR2-s. Os níveis de TNFR1 e TNFR1-s no tecido lesionado foram determinados por *Western blotting*. Em uma hora após a lesão os níveis de TNF- $\alpha$  estavam significativamente aumentados no FCE. Acompanhado por um relevante aumento nos níveis de TNFR1-s no FCE na 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora após injúria. Diferente do TNFR1-s, os níveis de TNFR2-s no FCE não sofreram alterações em nenhum tempo após a injúria. O aumento do desacoplamento do TNFR1 foi confirmado por *Western blotting*. Pode-se concluir que a desconexão do TNFR1 pode representar uma importante resposta fisiológica pós-traumática, visando a redução dos efeitos pro-apoptóticos do TNF- $\alpha$  (HARRINGTON, 2007).

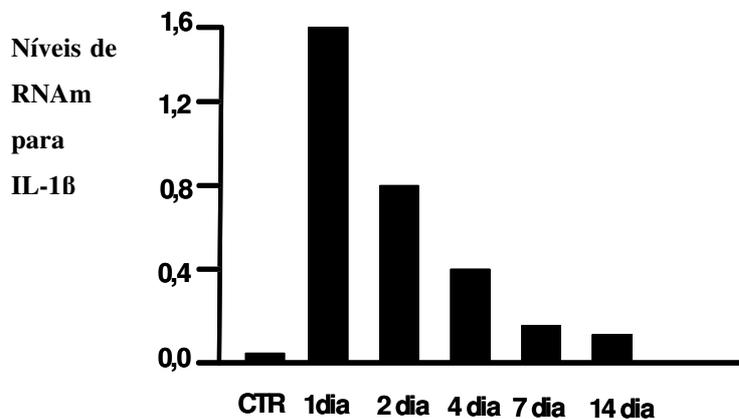
De acordo com os dados acima se observa a importância do TNF- $\alpha$  imediatamente após as injúrias no SNC ou periférico. A ativação das células de *Schwann* no início da DW é um dos primeiros eventos celulares, e estas células por sua vez degradam a bainha de mielina, liberam TNF- $\alpha$  que atua na própria célula de *Schwann*, ativa macrófagos e sua fagocitose, e desencadeia a cascata de liberação de muitas outras citocinas com muitas outras atividades biológicas. Quanto aos receptores para TNF- $\alpha$ , TNFR1 e TNFR2 sugere-se que são diferentemente regulados ao longo da DW, e talvez alguns subtipos (como o TNFR1) possam se fragmentar em receptores solúveis, os quais não possuem atividade, em alguma fase da DW após a injúria. Estas possibilidades podem gerar diferentes respostas na DW para o mesmo ligante (TNF- $\alpha$ ), dependendo do curso temporal da DW e dos níveis atuantes de TNF $\alpha$ .

Segundo Qin e Cheng (2007), o TNF- $\alpha$  e IL-6 estão envolvidos no controle neuronal e na ativação glial, proliferação, diferenciação e sobrevivência glial, desta forma influenciando

a plasticidade neuronal e glial, degeneração, como também no desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso.

#### 1.4.2.2 Degeneração Walleriana e Interleucina-1 (IL-1)

Através de estudos com RT-PCR avaliou-se os níveis de RNAm para interleucina IL-1 $\beta$  ao longo da degeneração em nervo ciático de camundongos. Ocorreu um pico precoce de RNAm/IL-1 $\beta$  dentro de 24 horas após injúria e gradualmente decresceram em seguida (STOLL; JANDER; MYERS, 2002). Ver figura 12.



*Gillen et al., 1998; Jander and Stoll, 1998; Shubayev and Myers, 2000, Menge et al., 2001.*

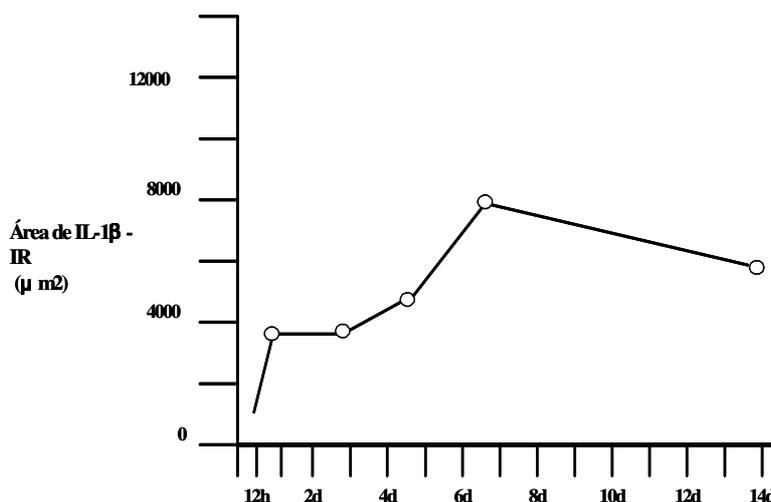
**Figura 12 - Resposta rápida de IL-1 $\beta$  à injúria neural:** Análise Semiquantitativa da Reação em Cadeia da Transcriptase Reversa em Tempo Real (RT-PCR) dos níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  no segmento distal de nervo Ciático de camundongos C57BL ao longo do tempo após esmagamento (*Crush*). **Fonte:** (STOLL; JANDER; MYERS, 2002).

No entanto, a expressão de RNAm e produção de proteínas de citocinas parecem não ser exatamente iguais. Pois em estudo com animais de rápida DW e animais mutantes que apresentam lenta DW (Wlds - *Wallerian degeneration slow mouse*), foi demonstrado que a produção de proteínas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi deficiente em animais com *Slow-WD*, embora a expressão de RNAm estivesse normal. A expressão do RNAm e produção de proteínas foram diferentemente reguladas durante a DW rápida (normal) e na DW lenta, sugerindo que a expressão de RNAm, por si só, não é uma indicação do envolvimento

funcional das citocinas na DW e que o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem acelerar a DW (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002).

As proteínas de IL- $\beta$  e IL-1 $\alpha$  não estão presentes em nervos de camundongos da linhagem C57/BL sem injúria, sendo secretadas somente após a injúria. O RNAm de IL- $\beta$  também não foi detectado em nervos de camundongos C57/BL sem injúria (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002). Sugerindo que esta tem sua liberação estimulada após o pico de TNF- $\alpha$  e que IL-1 não deve ter efeitos constitutivos.

Através de estudos com morfometria, quantificando-se a área imunoreativa para IL-1 $\beta$ , George *et al.* (2000) relatou níveis baixos com 12 horas, um pequeno pico já no 1º dia, um aumento gradativo até o 7º dia e uma queda suave e gradativa até o 14º dia após lesão em nervo Ciático de rato. Ver figura 13



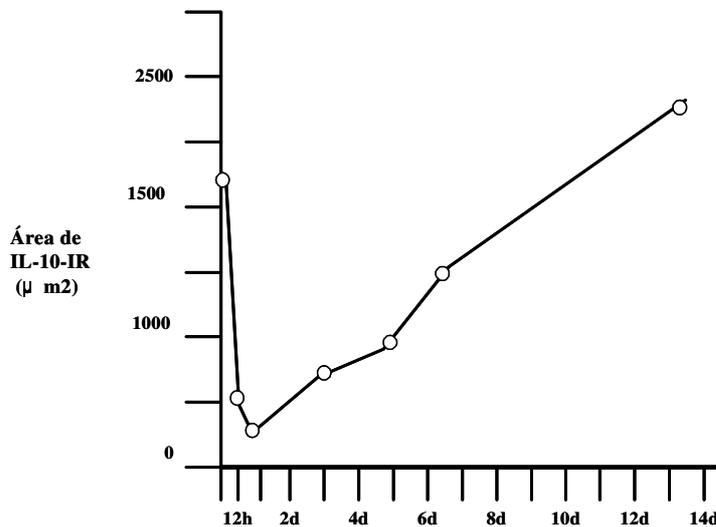
**Figura 13: Níveis de proteínas de IL-1  $\beta$  ao longo da DW.** Imunoreatividade para proteínas de IL-1 $\beta$  determinada por Densitometria quantitativa em seções de nervo Ciático de ratos (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica

Fonte: George *et al.* (2000)

#### 1.4.2.3. Degeneração Walleriana e Interleucina-10 (IL-10)

George *et al.* (2000) utilizando ELISA e RT-PCR demonstraram que os níveis de proteína de IL-10 declinam abruptamente logo após injúria neural em ratos em torno do 3º dia pós-lesão independentemente dos níveis de RNAm que ainda permanecem elevados. E sugeriu que a depleção de IL-10 logo no início da DW seria um dos fatores que aceleram o processo de degeneração. O gráfico abaixo é de outro estudo do mesmo autor (em 2000) com

morfometria, quantificando-se a área imunoreativa para IL-10, o qual demonstra níveis muito baixos de IL-10 com 12 horas e 1º dia, e um aumento gradativo até o 14º dia após lesão em nervo ciático de rato. Ver figura 14.



**Figura 14 – Depleção de IL-10 no início da DW:** Imunoreatividade para proteínas de IL-10 em seções de nervo ciático determinada por Densitometria quantitativa em animais (n=5) sacrificados ao longo do tempo (12horas, 1, 3, 5, 7, e 14 dias) após constrição crônica

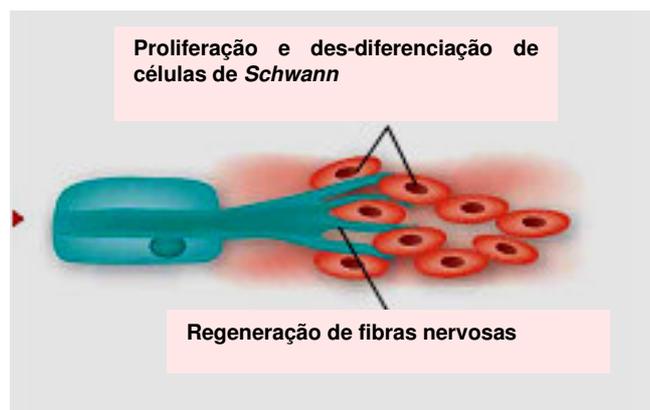
Fonte: George *et al.* (2000).

Wagner *et al.* (1998), demonstraram que os animais tratados com IL-10 (250ng) no local da lesão provocada por constrição crônica do nervo ciático apresentaram hiperalgesia significativamente reduzida (no 3º, 5º e 9º dia), número diminuído de macrófagos recrutados (imunoreativos para ED-1) no 2º e 5º dia pós-injúria no local da lesão, e diminuição de células imunoreativas para a citocina TNF- $\alpha$  no dia 2 pós-injúria (mas não no dia 5). Os autores propõem que a inicial produção de TNF- $\alpha$  no sítio da lesão no nervo periférico influencia o comportamento em longo prazo resultante da injúria neural, e a terapia com IL-10 pode diminuir a resposta inflamatória do nervo à injúria diminuindo os níveis de TNF e recrutamento de macrófagos logo no início do processo de DW.

Após a injúria neural o início da produção de IL-10 pelos fibroblastos é rápido (BE'ERI *et al.*, 1998), mas os níveis de produção são baixos e insignificantes porque os fibroblastos são pobres produtores de IL-10. A curva de altos níveis da produção de IL-10, após o 4º dia é determinada pelos picos de recrutamento de macrófagos, os quais produzem grandes quantidades de IL-10. A partir daí IL-10 inibe a produção das citocinas inflamatórias e de si própria (BE'ERI *et al.*, 1998; DE WAAL MALEFYT, 2001), desta forma inibindo a DW (SHAMASH *et al.*, 2002).

### 1.5. Regeneração neural

No início da DW, como já mencionado, o axônio lesado sinaliza para as células de *Schwann* induzindo sua ativação. Numa fase posterior, agora na direção inversa, as células de *Schwann* liberam sinais químicos que promovem crescimento axonal e remielinização (ESPER; LOEB, 2004) (ver figura 15). Estes sinais incluem o NGF e o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), o qual é retrogradamente transportado para o corpo celular de neurônios sensitivos primários onde eles atuam como potentes reguladores da expressão gênica. NGF e GDNF também ativam e sensibilizam diretamente os nociceptores (MALIN *et al.*, 2006) contribuindo para a iniciação da dor em resposta à injúria neural. Entre o 3º e 14º dia após lesão ocorre um aumento de cinco a sete vezes na expressão de RNAm para NGF no nervo ciático (HEUMANN *et al.*, 1987). Macrófagos, células de *Schwann*, e fibroblastos no segmento distal do nervo expressam uma grande variedade de moléculas neurotróficas incluindo NGF (fator de crescimento do nervo), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), CNTF (fator neurotrófico ciliar), LIF (fator inibitório para leucemia), IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina – I), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e osteonectina (glicoprotéina ligante a cálcio), desta forma gerando um ambiente de suporte para a regeneração do axônio (VARGAS & BARRES, 2007).



**Figura 15 - Participação das células de *Schwann* no alongamento de axônios liberando fatores de crescimento (NGF e GDNF) e formação das *bands of Büngner*.**

Fonte: Scholz & Woolf (2007), *Nature neuroscience*, v. 10, p. 1361 – 1368, 2007

As células *Schwann* também promovem regeneração gerando orientação estrutural e substratos promotores de crescimento para os axônios em crescimento. Ver figura 15. Durante a DW, após lesão no nervo periférico, as células de *Schwann* devem proliferar formando uma linha de células chamadas de bandas de *Büngner*, as quais suportam o crescimento axonal (KOEPPEN, 2004). Laminina, um componente da matriz extracelular da lamina basal dos tubos produzido pelas células de *Schwann*, é uma molécula de adesão que promove crescimento dos axônios (SANES, 1982; CORNBROOKS *et al.*, 1983).

O tempo para atingir a regeneração completa depende do tipo de trauma no nervo. O alongamento dos axônios pode iniciar a partir da primeira semana após a injúria. Após transsecção do nervo ciático de rato, as funções motoras começaram a surgir na terceira semana e melhoraram em torno de 50% na sexta semana (TEMPORIN *et al.*, 2008b).

Na fase inicial depois da lesão neural, os axônios necessitam se estenderem sob ambiente não favorável, onde permanecem os resíduos de mielina. O recrutamento de macrófagos conduz a uma limpeza (*clearance*) rápida dos fragmentos de mielina. Estes fragmentos contêm inibidores dos fatores de crescimento dos axônios, uma glicoproteína associada à mielina (*Myelin-Associated Glycoprotein-MAG*). A fagocitose dos fragmentos de mielina por células de *Schwann* e macrófagos remove também os inibidores (MAG) criando condições favoráveis para o alongamento dos axônios (TEMPORIN *et al.*, 2008a; QIU *et al.*, 2000; STOLL; JANDER, 1999; STOLL; MULLER, 1999; HIRATA *et al.*, 1999). A proteína RhoA (*Ras Homolog gene family member A*, uma família de proteínas envolvidas na regulação e coordenação temporal da divisão celular), a qual inibe o alongamento dos neuritos, é ativada por este inibidor (MAG) e está ativado em motoneurônios 24 horas após a injúria do nervo ciático (HIRAGA *et al.*, 2006).

A rápida proliferação das células de *Schwann* (3 a 4 dias após à lesão) é um evento decisivo para promover a regeneração do axônio (HALL, 1978). Foi demonstrado *in vitro* que as células de *Schwann* degradam mielina e proliferam na ausência de macrófagos (FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995), processos considerados como pré-requisitos para a remielinização que ocorre a seguir (BAICHWAL; DE VRIES, 1989).

### 1.5.1 Remielinização

As células de *Schwann* diminuem sua síntese de mielina dentro de 12 horas após injúria neural. “E interrompem a síntese de proteínas da mielina dentro de 48 horas” (VARGAS; BARRES, 2007, p. 160)

Como comentado acima, logo após a injúria neural, as células de *Schwann* são ativadas, entram em estado de des-diferenciação, ou seja, entram em ciclo celular (PELLEGRINO *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 1995, MURINSON *et al.*, 2005), interrompem sua síntese de mielina, proliferam e realizam a remoção da mielina (VARGAS; BARRES, 2007). No entanto, o processo de remielinização a partir destas mesmas células ocorre depois, quando entram em estado re-diferenciado, o qual é direcionado pela via de sinalização intracelular Ras/Raf/ERK (HARRISINGH *et al.*, 2004). O processo de rediferenciação das células de *Schwann* e remielinização ocorre no sentido proximal para o distal em relação ao local de injúria. Haja vista que estas células necessitam de sinais a partir dos axônios em crescimento para entrar neste estágio (GUPTA *et al.*, 1993).

### 1.5.2 Proteína Básica da Mielina - PBM

Como visto acima, as células de *Schwann* do SNP são responsáveis pela síntese da camada de mielina que envolve os axônios (FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995). As principais proteínas que modelam a estrutura da bainha de mielina são: Proteína Básica de Mielina (PBM) e proteína proteolipídica (PLP). Estas duas proteínas compõem no mínimo 85% da proteína total na bainha de mielina que envolve o axônio (ASIPU; BLAIR, 1994).

A própria presença da proteína básica de mielina (PBM) e seus peptídeos (fragmentos) são desencadeantes para a ativação vigorosa das células de *Schwann* (TZENG *et al.*, 1995; TZENG *et al.*, 1999).

A família **P1** de proteínas básicas de mielina é composta por polipeptídeos de 21.5-kDa, 18.5- kDa, 17- kDa e 14- kDa produzidos por trocas alternativas de genes individuais, os quais variam em relativas quantidades com, porém, altas seqüências homólogas de espécies cruzadas. As PBMs são proteínas hidrofílicas localizadas no lado citoplasmático de membranas mielínicas e pensa-se que elas contribuem para a estabilização da mielina por complexos formados com lipídios carregados negativamente (GARBAY *et al.*, 2000).

Outra família de PBM, a **P2**, está presente em valores bem mais baixos do que as isoformas de 18.5-kDa e 21.5-kDa da família P1. Esta proteína complementa a PBM/P1 em

interagir com lipídios ácidos durante a principal consolidação da linha densa e é expressa somente em uma seleta população de fibras mielínicas (GARBAY *et al.*, 2000).

Como visto anteriormente, logo após a injúria neural predominam os processos de remoção da mielina. Os macrófagos e células de *Schwann* produzem altos níveis de metaloproteases (WEE YOUNG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996) que degradam a mielina e desta forma promovem especificamente a digestão da PBM (MATYSZAK; PERRY, 1996; CHANDLER *et al.*, 1997; PROOST *et al.*, 1993). O processo de gênese de mielina nas células de *Schwann* ocorre mais tardiamente requerendo sinais provindos a partir do alongamento dos axônios (GUPTA *et al.*, 1993). Ou seja, a expressão da PBM pode ser um parâmetro do grau da velocidade da degeneração ou da regeneração do nervo dependendo do tempo pós-injúria em que é avaliada.

## 1.6. JUSTIFICATIVA

De acordo com o que foi descrito, a dor crônica se prolonga por mais de seis meses e seus mecanismos não estão bem esclarecidos, o que dificulta uma terapêutica adequada e eficiente (KUPERS, 1994).

A dor neuropática é um problema comum na clínica neurológica. Faz parte de várias síndromes neurológicas e representa cerca de 25% dos sintomas observados em pacientes tratados em grandes clínicas. Segundo Bennett (1988) estima-se que ela afete 1,5 % da população. A dor neuropática é uma freqüente complicação de traumas acidentais, cirurgias ou de doenças que afetam o sistema nervoso central ou periférico.

Apesar de passados 15 anos de um abrangente uso clínico nos distúrbios de dor crônica e em alguns tipos de convulsões, os mecanismos de ação da gabapentina como analgésico na dor neuropática ainda não estão muito claros. Por outro lado, praticamente não ocorrem na literatura relatos sobre seus efeitos e mecanismos na inflamação e efeitos com relação à expressão de citocinas anti ou pró-inflamatórias, que estão relacionadas com a regeneração neural. Visto que as neuropatias inicialmente são também processos inflamatórios os quais produzem dor nociceptiva ou crônica. Em fim, se torna necessário esclarecer a repercussão dos tratamentos crônicos de dor neuropática com gabapentina na regeneração do nervo periférico, processo importante no restabelecimento das funções sensitivas e motoras dos pacientes.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. Objetivo Geral

Investigar o papel da gabapentina na neuropatia experimental induzida pela constrição crônica do nervo ciático, utilizando o modelo descrito por Bennett e Xie (1988).

### 1.7.2. Objetivos Específicos

1. Reproduzir o modelo de constrição crônica do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988) verificando-se os sinais de dor crônica e correlacionando-se com os controles cirúrgicos falsos (*sham*);
2. Investigar os possíveis efeitos antinociceptivos do tratamento crônico com a GP em animais com CCNC, em fase precoce da neuropatia, através de comportamentos de dor espontâneos e auto-dirigidos (coçar-se, morder-se, etc.) e induzidos por estímulos mecânicos (alodínia mecânica) e térmicos (hiperalgesia e alodínia);
3. Investigar os efeitos crônicos da gabapentina nos comportamentos espontâneos dos animais, como por exemplo, possíveis efeitos sedativos e alterações na atividade motora.
4. Investigar os efeitos crônicos da gabapentina nos processos inflamatórios induzidos em modelos de edema de pata e migração de células para cavidade abdominal induzidos por carragenina e dosagem de mieloperoxidase em pele da pata de rato e no nervo ciático;
5. Investigar os efeitos crônicos da gabapentina na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias no nervo ciático no 5º dia após indução da neuropatia;
6. Investigar os efeitos da gabapentina nas alterações morfológicas do nervo ciático no 5º dia após indução da neuropatia através da expressão de células imunomarcadas. Como também através da análise da expressão da proteína básica de mielina (PBM), com indicativo de desmielinização ou re-mielinização neural.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **2.1. Local de realização do presente trabalho:**

O presente projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Neurologia Experimental e Neurofisiologia em colaboração com o Laboratório de Bioquímica – IBIMED e com o Laboratório de Farmacologia e Inflamação do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa e co-orientação do Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá e colaboração das professoras Mariana Lima Vale e Gerlyane de Castro Brito, também do Dpto de Fisiologia e Farmacologia-UFC.

### **2.2. Animais**

Procurou-se, durante todo o experimento, seguir as normas estabelecidas em 1983 pela *International Association for the study of Pain*, (IASP) que estabelece que deva se utilizar o menor número possível de animais, que o modelo desenvolvido não leve a incapacitação definitiva, que não interfira nas suas atividades rotineiras e que se dêem condições a esses animais para que possam aliviar a dor (IASP, 1983).

Foram utilizados 160 ratos *Wistar* machos pesando entre 250 e 300 g provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais tinham livre acesso à água e comida e eram condicionados em número de 3 ou 4 por caixa de polipropileno (própria para ratos, desenvolvida para biotérios). Essas tinham uma cama de serragem de madeira com cerca de 2 cm de espessura. Os animais eram mantidos em nosso biotério localizado no próprio laboratório de Neurologia Experimental em ambiente bem ventilado, temperatura de 26 a 28°C e ciclo Claro/escuro de 12/12 horas.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a resolução do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 2.3. SOLUÇÕES, DROGAS E CORANTES UTILIZADOS.

- Gabapentina (Neurotin®, Pfizer ,)
- Solução Salina (Solução de Cloreto de Sódio a 9%)
- Carragenina (BDH Chemicals Ltda, Sigma)
- Tribromoetileno (anestésico, Sigma)
- Rimfamicina (EMS)
- Heparina sódica (5000 ui / ml; Cristalia)
- Azul de Tripán (Sigma)
- Cloreto de Sódio (Vetec)
- Álcool 70% (Alcoollux)
- Tintura de Iodo 2%
- PBS-tween 20, 0,1% (v/v)
- Solução de *Palley* (Glutaraldeído 2,5% e formol 10%)
- Formamida (Reagen)

#### Solução de Turk (diluidor de glóbulos brancos) :

- Acido acético Glacial P. A (Merck)..... 20 ml
- Violeta Genciana..... 2,0 ml
- Água destilada..... 1000 ml

#### Solução para Pletismografo:

- Cloreto de Sódio (Vetec )..... 45,0 mg
- Solução Padrão..... 0,3 ml
- Água destilada..... 100 ml

#### Solução para o ensaio de Mieloperoxidase.

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):
- HTAB (Sigma) ----- 5 g;
- Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.
- Peróxido de hidrogênio 0,1%:
- Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) -----1 mL;
- Água destilada -----29 mL.
- Solução de o-dianisidina (DDI):
- O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg;
- Tampão fosfato de potássio -----10,0 mL;

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -----50,0 µL;
- Água destilada -----90,0 mL.

#### 2.4. APARELHOS E EQUIPAMENTOS LABORATORIAIS

- Agitador para tubos de ensaio (Marconi, modelo TE089).
- Agulhas.
- Balanças analíticas (Marte, modelo AL200 e Ohaus , modelo AS260D).
- Balança para pesagem de animais (Filizola, modelo ID 1500).
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm<sup>2</sup>)
- Câmara de fluxo laminar (Veco)
- Centrifuga excelsa Baby (FANEM , modelo 248 )
- Contador diferencial de células de 8 teclas (Clay Adams)
- Contador de células totais (Veeder Root)
- Espátulas
- Estufa (Olidef, modelo A42)
- Freezer
- Geladeira
- Laminas e lamínulas para microscopia
- Luvas cirúrgicas
- Material cirúrgico (pinças , bisturi e tesouras)
- Micropipetas (Gilson)
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME)
- Papel de filtro
- Pipetas Pasteur de plástico (Sigma )
- Plestimografo (UGO - BASILE )
- Ponteiras (Sigma)
- Provetas (Simax)
- Seringas 1; 5 e 10 ml (BD PLASTIPÁK) e agulhas 29 G e 25 G (Benson- Dickson)
- Tubos de polipropileno para centrifuga de 1,5 ml (Falcon)
- Tubos de ensaio de vidro e plástico (Gibco)

## 2.5. Tratamento dos animais

As cápsulas de Neurotin® eram abertas e o seu conteúdo granulado era pesado em balança de precisão. A quantidade de massa em miligramas para cada animal era calculada de acordo com a dose e o peso do animal, sendo descontada a proporção dos excipientes que acompanha o medicamento. Depois o pó era diluído em solução salina 0,9% em quantidade suficiente para completar 1/2 mililitro (0,5ml) e em seguida aplicado via gavagem em cada animal (volume aplicado de 0,5 ml/ 250g ou 2ml/kg).

## 2.6. Modelo de indução de neuropatia - Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCNC):

No presente estudo foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCNC) de Bennett & Xie (1988) modificado por Sommer and Myers (1995), onde no lugar de quatro ligaduras frouxas, descrito pelo primeiro modelo, foram utilizadas somente três ligaduras, descrito por este último modelo.

Utilizando-se animais anestesiados com o tribromoetileno 2,5%, 1ml/100g de peso vivo. Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico e local de acesso, com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, ao nível do trocater/fêmur, no membro posterior direito. O nervo ciático foi acessado e exposto através da dissecação dos músculos grande glúteo e bíceps femural. Foram feitas três ligaduras com fio *Cat-gut* 4-0 no nervo ciático desta pata direita, distanciando de cerca de 1mm entre as ligaduras e proximal à trifurcação Ciática. A tensão gerada nas ligaduras era de intensidade leve, suficiente para causar uma leve isquemia sem interromper o fluxo sanguíneo total. Na pata esquerda o nervo era exposto, mas sem indução de lesão alguma, usada como *sham*. As incisões da pele foram suturadas em seguida com fio mononylon 5-0. Sobre a sutura era aplicado rinfamicina para prevenir infecções e os animais eram recolocados em caixas limpas para recuperação da cirurgia.

Os animais falso-operados (do grupo sham) tinham os nervos esquerdo e direito apenas expostos sem lesão alguma seguido de sutura da pele. Estes eram controles para os animais com CCNC tratados com salina, ou seja, um parâmetro para avaliar a presença de neuropatia nos animais com CCNC e também validação do modelo de CCNC.

## 2.7. Modelos para observação dos comportamentos.

Ver tabela 2.

**Tabela 2: Modelos e grupos experimentais utilizados para observação dos comportamentos**

	<b>Modelos</b>	<b>O que avalia</b>	<b>Grupos</b>	<b>N</b>
<b>Modelos de Comportamentos Espontâneos</b>	Modelo Comporta®	Dor crônica,	Gr. salina	23
		motricidade,	30 mg/kg	10
		exploração, sedação,	60 mg/kg	14
		ansiedade,	120 mg/kg	13
		comportamentos sexuais, etc.	240 mg/kg	5
			Grupo <i>Sham</i>	20
<b>Modelos de Comportamentos de dor Induzida</b>	<i>Von Frey</i> Eletrônico (Analgésímetro de pressão)	Alodínia mecânica (sintoma de dor neuropática)	Gr. salina,	10
			30mg/kg	10
			60 mg/kg	9
			120mg/kg	13
			240mg/kg	5
			<i>G. Sham</i>	14
	Teste Térmico (46° C) (Sensibilidade ao calor nocivo)	Hiperalgisia térmica (sintoma de dor neuropática)	Gr. salina,	15
			30mg/kg	10
			60 mg/kg	9
			120mg/kg	14
240mg/kg			5	
		<i>G. Sham</i>	18	
Teste da Acetona (Sensibilidade ao frio não nocivo, 10° C)	Alodínia térmica ao frio. (sintoma de Dor Neuropática)	Gr. salina,	20	
		30mg/kg	10	
		60 mg/kg	9	
		120mg/kg	13	
		240mg/kg	5	
		<i>G. Sham</i>	20	

### **2.7.1. Observação de comportamentos espontâneos de dor e outros comportamentos em geral.**

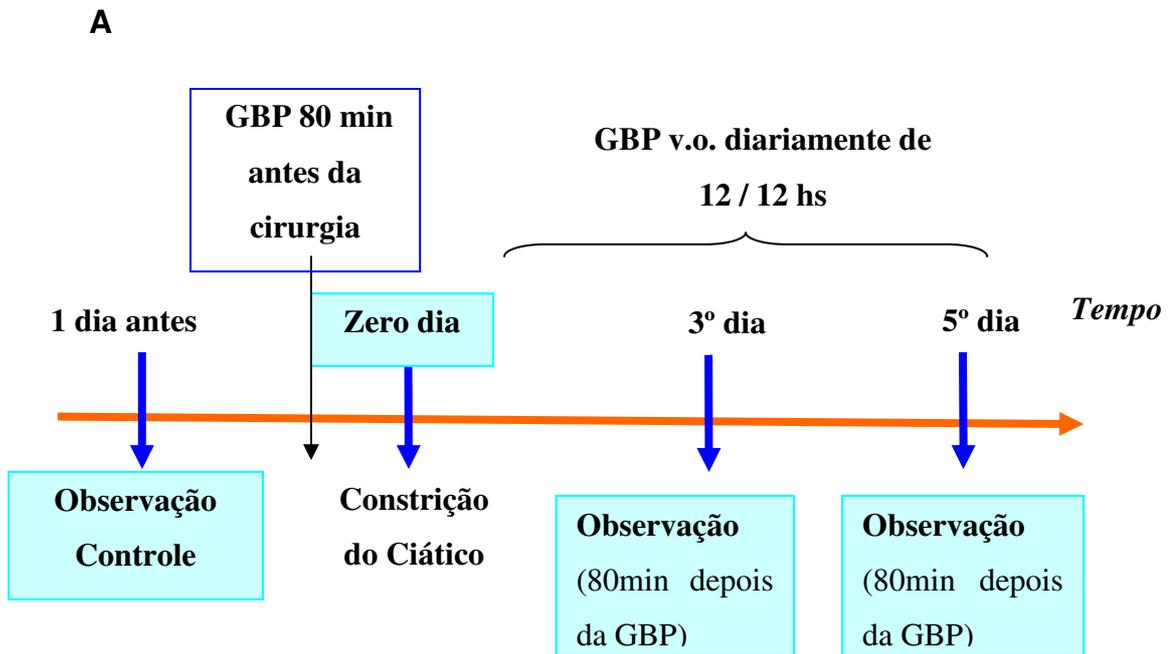
Neste modelo se torna possível à observação de comportamentos considerados como manifestação de dor, da mobilidade ou expressão fisiológica e sexual. Para realizar as observações comportamentais os ratos eram colocados em um observatório de madeira (100cm x 50cm x 50cm) com frente de vidro e no fundo uma cama de serragem de madeira de 2 cm de espessura, em sala silenciosa e iluminação suave. Após um período de adaptação de cinco minutos, as observações tinham início. Durante vinte minutos, os comportamentos de cada rato eram registrados e quantificados através de um programa de computador - Programa COMPORTA® de quantificação de comportamentos, desenvolvido em nosso laboratório (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1981)

Os comportamentos observados foram: coçar-se (*scratching*), morder-se (*biting*), lambe-se (*liking*), empinar-se (*rearing*), escalar (*climbing*), andar (*walking*), limpar-se (*grooming*), cheirar (*sniffing*), dormir/descansar (*rest-sleeping*), comendo ou roendo (*eating-gnawing*) e congelar-se (*freezing*). Os comportamentos andar, empinar-se e escalar são considerados de exploração e de motricidade elevada. O comportamento de coçar-se (*Scratching*) foi observado à direita e à esquerda, o mesmo aconteceu para o morder-se (*Biting*), tendo em vista a unilateralidade da lesão cirúrgica. Ver tabela 2.

#### **Protocolo e grupos experimentais:**

Para este experimento utilizamos 80 ratos *Wistar* em quatro grupos: Um grupo neuropático (n = 20) tratado com o diluente (salina), um grupo pseudo-operado (*sham*, n = 20) e quatro grupos (n = 10) tratados com a gabapentina 30, 60, 120 e 240 mg (n = 10 para cada grupo). Cada animal era observado isoladamente durante 20 minutos, com 5 minutos iniciais de adaptação. Os animais foram observados antes da intervenção cirúrgica e quando estavam com 3 e 5 dias de evolução da neuropatia. Ver figura 16.

As observações eram realizadas depois de 80 minutos de aplicada a GBP via gavagem, tendo em vista que vários trabalhos demonstraram efeitos analgésicos máximos da GBP após os 60min de aplicação da mesma, se estendendo até 3 horas depois (KAYSER and CHRISTENSEN, 2000). Ver figura 16.

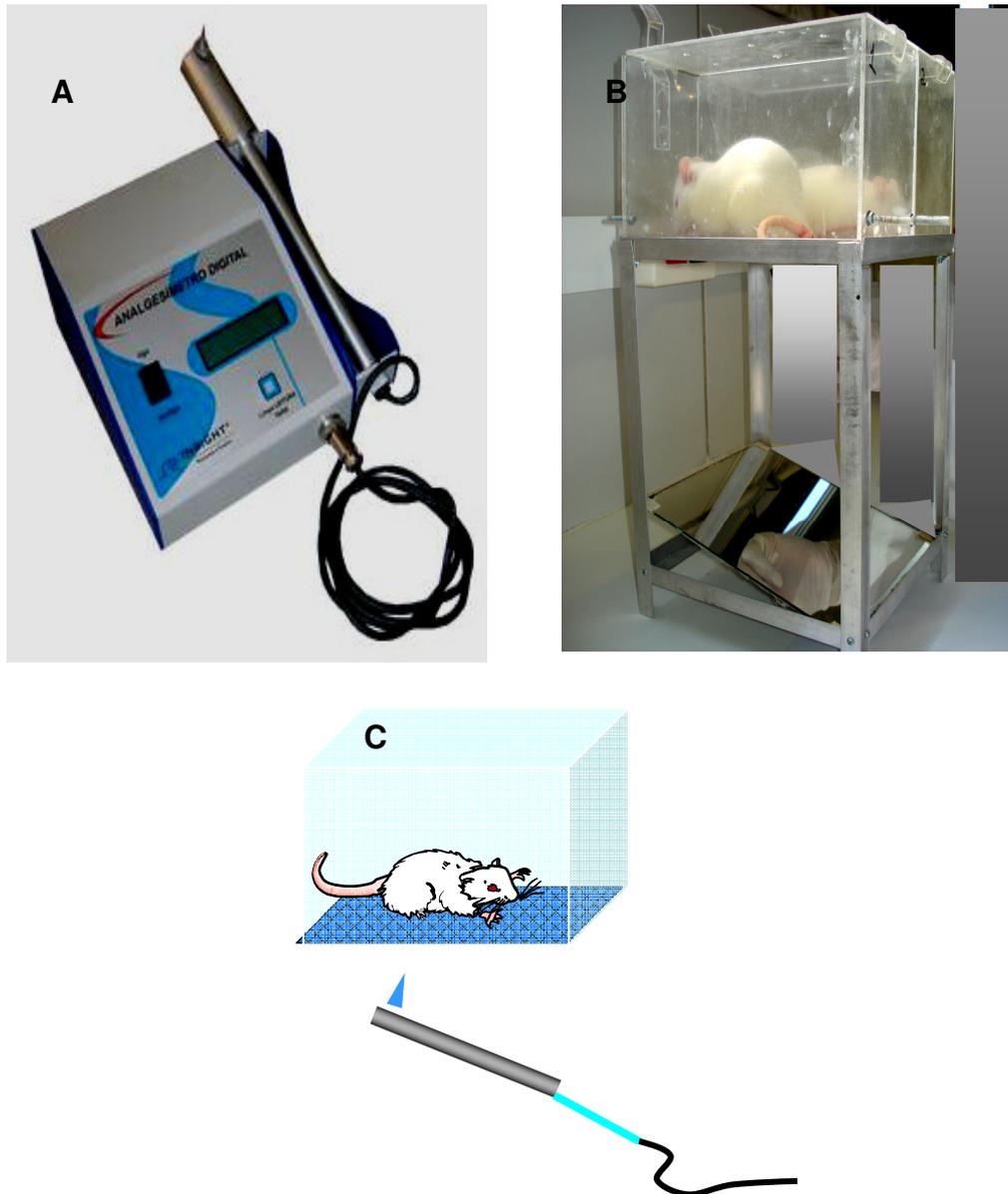


**Figura 16: Painel A:** Protocolo das observações de comportamentos espontâneos.  
**Painel B:** Caixa de observação dos comportamentos espontâneos.

## **2.7.2. Estudo comportamental de dor induzida em ratos neuropáticos**

### **2.7.2.1. Teste de alodínia mecânica (*Von Frey* eletrônico)**

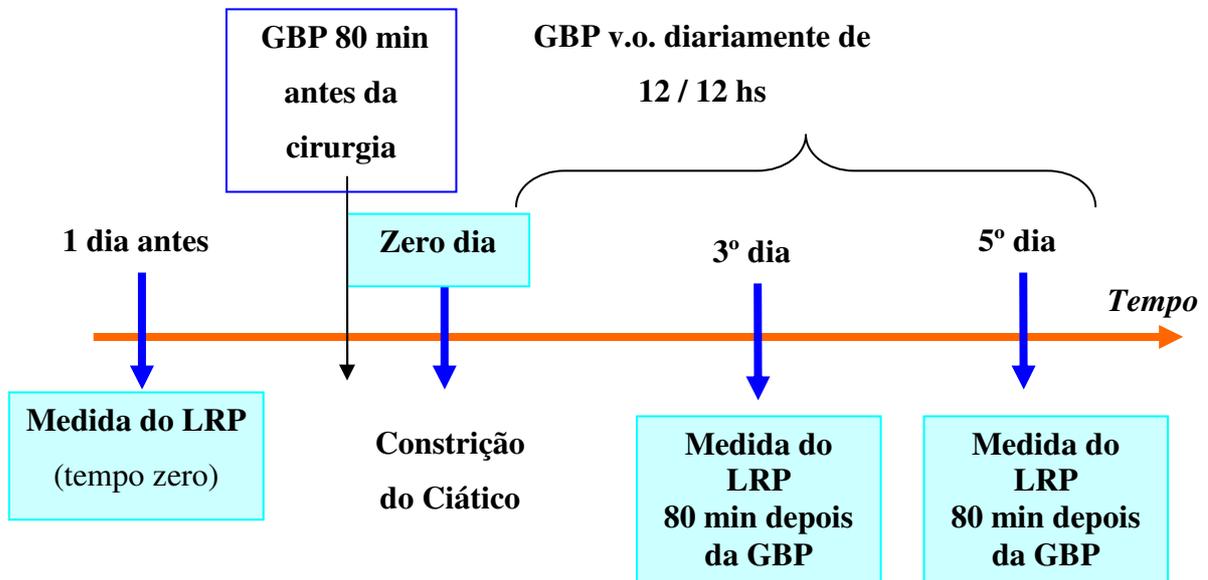
Os possíveis efeitos antinociceptivos centrais ou locais da gabapentina em animais neuropáticos foram determinados através de medição do limiar de retirada da pata, em gramas, induzido por pressão gradativa na superfície plantar da pata ipsilateral (direita) e pata contra-lateral controle (esquerda). Foi utilizado um analgesímetro digital (Insight®) (ver figura 16). O operador sustentando o braço do transdutor (analgesímetro) produz um aumento de força gradativo e linear aplicado por um pino sensor de 1,0 mm sobre a superfície plantar da pata. Quando o animal não suporta mais a pressão, retirando a pata, o transdutor registra a pressão neste momento, ou seja, registra o limiar de retirada da pata (LRP) em gramas. Logo após a retirada da pata pelo animal ocorre manifestação de dor através da expressão conhecida como *Flick* (movimento vacilante da pata). Para cada pata foram feitas duas medidas e obtida uma média. Durante o experimento os animais são contidos em gaiolinhhas com fundo de tela de arame através da qual se introduz o pino sensor na superfície plantar medial da pata. Os animais eram observados em sala silenciosa e pouco iluminada, na sala de estudo da dor (LAFICA- UFC). E com um período prévio para aclimação dos animais neste novo ambiente por 10 minutos. Ver figura 17.



**Figura 17: (A) Equipamento e (B) gaiola de contenção para teste de sensibilidade mecânica (*Von Frey*). (C) Esquema simplificado da aplicação do teste.**

**Protocolo e grupos experimentais:** Para este experimento utilizamos 60 ratos “*Wistar*” em quatro grupos: Um grupo neuropático ( $n = 10$ ) tratado com o diluente (Salina), um grupo pseudo-operado (*Sham*,  $n=14$ ) e quatro grupos tratados com a Gabapentina 30, 60, 120 e 240 mg ( $n = 10, 9, 13, 5$  respectivamente). Para cada animal, as medições foram repetidas duas vezes em cada pata e obtida uma média. Os animais foram testados quando estavam com 5 dias de evolução da neuropatia. As medidas do Limiar de Retirada da Pata

(LRP) em gramas eram obtidas depois de 80 minutos de aplicada a GBP via gavagem. Ver figura 18.



**Figura 18:** Protocolo para teste de sensibilidade mecânica (*Von Frey*). O Limiar de retirada da pata (LRP) foi obtido antes, no 3º e 5º dia após a CCNC.

#### 2.7.2.2. Teste de sensibilidade térmica ao frio (10°C, teste da acetona)

Para verificação de alodinia térmica ao frio, sinal clínico característico na dor neuropática, utilizamos o modelo descrito por FLATTERS & BENNETT (pag. 151, 2004), um teste no qual se utiliza a propriedade volátil da acetona para induzir a sensação de frio (10°C). No modelo, os animais foram colocados em gaiolas suspensas com um piso fenestrado composto por malha metálica, que podia ser visto de um espelho colocado em inclinação de 45° com a superfície, abaixo da gaiola. Após um período de aclimação de 5 min., uma alíquota de 0,05mL de acetona era recolhida de um estoque com uma seringa de 1mL e então era lançada sob a superfície ventral da pata do animal através do piso fenestrado, por meio de propulsão no êmbolo da seringa. Se a pata do animal estivesse corretamente molhada pela acetona, iniciava-se um período de observação inicial de 20s, no qual o animal poderia ou não apresentar comportamentos relacionados à dor (descritos adiante). Se não, a

observação da pata se encerrava no fim desse tempo inicial e o observador seguia para a outra pata ou para outro animal; se sim, o observador adicionava mais 20s ao tempo de observação para observar mais algum comportamento do animal. Os comportamentos foram avaliados de acordo com a classificação da referência desse método, em uma escala de 4 pontos assim apresentada: escore “0” para a ausência de qualquer comportamento doloroso; escore “1” para uma retirada rápida da pata e/ou com tremor ou batimento desta no chão (o tremor característico, ou *flicking*, era importante para determinar se a retirada da pata se deu por dor ou por espanto do animal); escore “2” para um retirada com sustentação prolongada da pata com ou sem repetido *flicking* desta, e escore “3” para a situação onde o animal lambe a face ventral da pata após *flicking* repetido da pata. Ver figura 19.



**Figura 19:** Execução do teste de alodínia ao frio 10°C (Teste da Acetona)

**Protocolo e grupos experimentais:** Para este experimento utilizamos 60 ratos “Wistar” em quatro grupos: Um grupo neuropático (n = 10) tratado com o diluente (Salina) e quatro grupos tratados com a gabapentina 30, 60, 120 e 240 mg (n = 10 para cada grupo). O teste era conduzido em seqüência entre os vários animais do grupo, de modo que os períodos de descanso das patas fossem de no mínimo 5 minutos. Eram realizadas três medidas em cada

pata por teste (com a soma dos escores de cada pata ao final totalizando no máximo 9 pontos). Os animais foram experimentados antes da cirurgia e no 3º e 5º dia de evolução da neuropatia. As medidas eram obtidas depois de 80 minutos de aplicada a GBP via gavagem. Protocolo semelhante ao teste da alodínia mecânica, visto acima na figura 18.

### 2.7.2.3. Teste de sensibilidade térmica ao calor de 46° (Hiperalgisia Térmica)

Para o estudo da hiperalgisia utilizamos a temperatura de 46°. Em nosso método de avaliação da sensação térmica quente, os animais eram colocados em uma rede de contenção e ficavam estabilizando durante 2 minutos (correção: 20 min.). Com um pequeno recipiente (50ml) se coletava água a partir de um banho isolado termicamente e com temperatura controlada (46°C). A pata posterior do animal era submergida na água do pequeno recipiente até o calcâneo (tornozelo) e se aguardava alguma resposta do animal até no máximo 15 segundos (tempo de *Cut Off*) quando era retirado o recipiente. As imersões da pata na água a 46°C eram feitas com intervalos de 5 minutos, com duas repetições, a partir das quais era calculado uma média. A duração de tempo de permanência da pata na água até a retirada da mesma pelo animal era registrada em cronômetro e denominada como o Tempo de Latência de Retirada da pata (TLR), medida em segundos. Ver figura 20.



**Figura 20:** Execução do teste de hiperalgisia térmica ao calor (46°)

**Protocolo e grupos experimentais:** Para este experimento utilizamos 60 ratos “Wistar” em quatro grupos: Um grupo neuropático (N = 15) tratado com o diluente (Salina) um grupo *Sham* (pseudo-operado, N = 18) e quatro grupos tratados com a Gabapentina 30, 60, 120 e 240 mg/kg.p.v.(N = 10, 9, 14, 5 respectivamente). Para cada pata as medições foram repetidas duas vezes e obtida uma média. Os animais foram testados, quanto à pata esquerda e direita, antes da cirurgia e no 3º e 5º dia de evolução da neuropatia. As medidas eram obtidas depois de 80 minutos de aplicada a GBP via gavagem.

## 2.8. Estudo inflamatório

### 2.8.1. Edema de Pata Induzido Por Carragenina

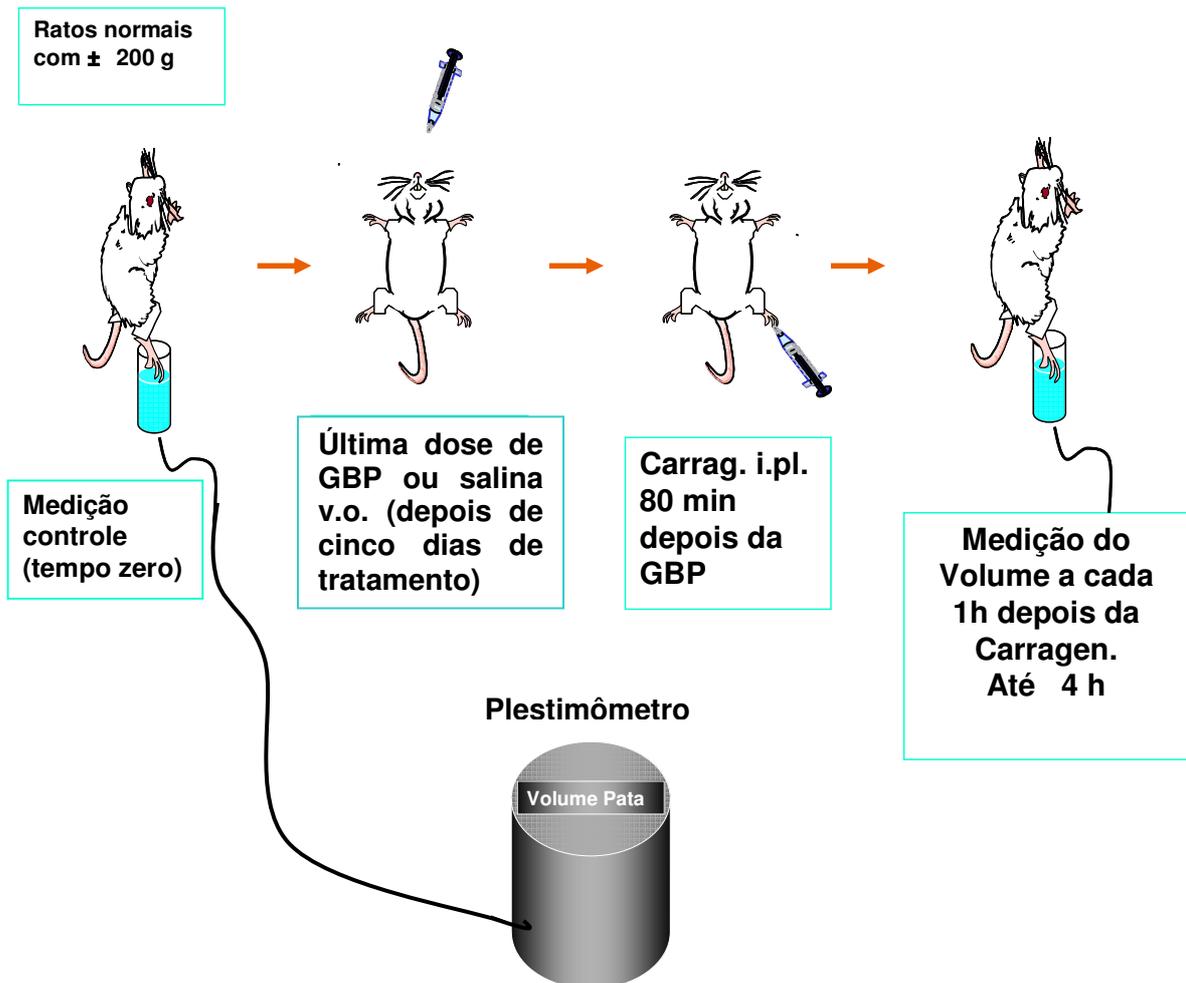
Para indução do edema a carragenina (100µg/pata, em volume de 10µL) foi administrada intraplantarmente (ipl.) na pata direita. Os edemas de pata foram mensurados usando-se um pletismômetro (Ugo Basili) que mede eletronicamente o volume de água deslocado após a introdução da pata do animal em recipiente próprio. Ver figura 21 .

**Delineamento:** Os animais foram tratados de 12 em 12 horas ao longo de cinco dias, cada grupo com sua respectiva dose de GBP (3, 10 ou 60mg/kg via oral). No quinto dia, o volume da pata ipsilateral (direita) de cada rato foi medido antes da última aplicação de GBP (tempo zero). 80 minutos após esta última aplicação de GBP foi aplicado o estímulo inflamatório (carragenina). Os volumes das patas foram avaliados na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª horas após a injeção da carragenina, utilizando-se o pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição tendo em vista que o pico do edema induzido por carragenina ocorre em torno da 3ª hora após a injeção desse estímulo. O edema foi calculado como variação de volume ( $\Delta$ ), isto é, a diferença entre o volume em uma determinada hora após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (no tempo zero). Logo após o término deste experimento (em torno da 5ª hora após a carragenina) os animais foram anestesiados e sacrificados e as peles das patas foram dessecadas, coletadas e congeladas a -70°C até o dia do ensaio para dosagem de mieloperoxidase (MPO) (método descrito a seguir). Ver figura 21.

Em outro experimento, utilizando a carragenina de outro lote, seguindo o mesmo protocolo acima, foram testadas as doses de GBP 1, 60 ou 120mg/kg.

### Grupos experimentais:

Neste experimento utilizamos 42 ratos *Wistar* em seis grupos: Um grupo controle (salina) (n=6): Neste grupo, 80 minutos antes da carragenina se aplicou somente o diluente salina via oral. Seis grupos tratados: cada grupo (n = 6) recebeu a GBP em doses crescentes (1, 3, 10, 30, 60 ou 120mg/kg).



**Figura 21:** Delineamento do edema de pata induzido por carragenina, e abaixo o equipamento utilizado para medir o volume de edema (pletismômetro).

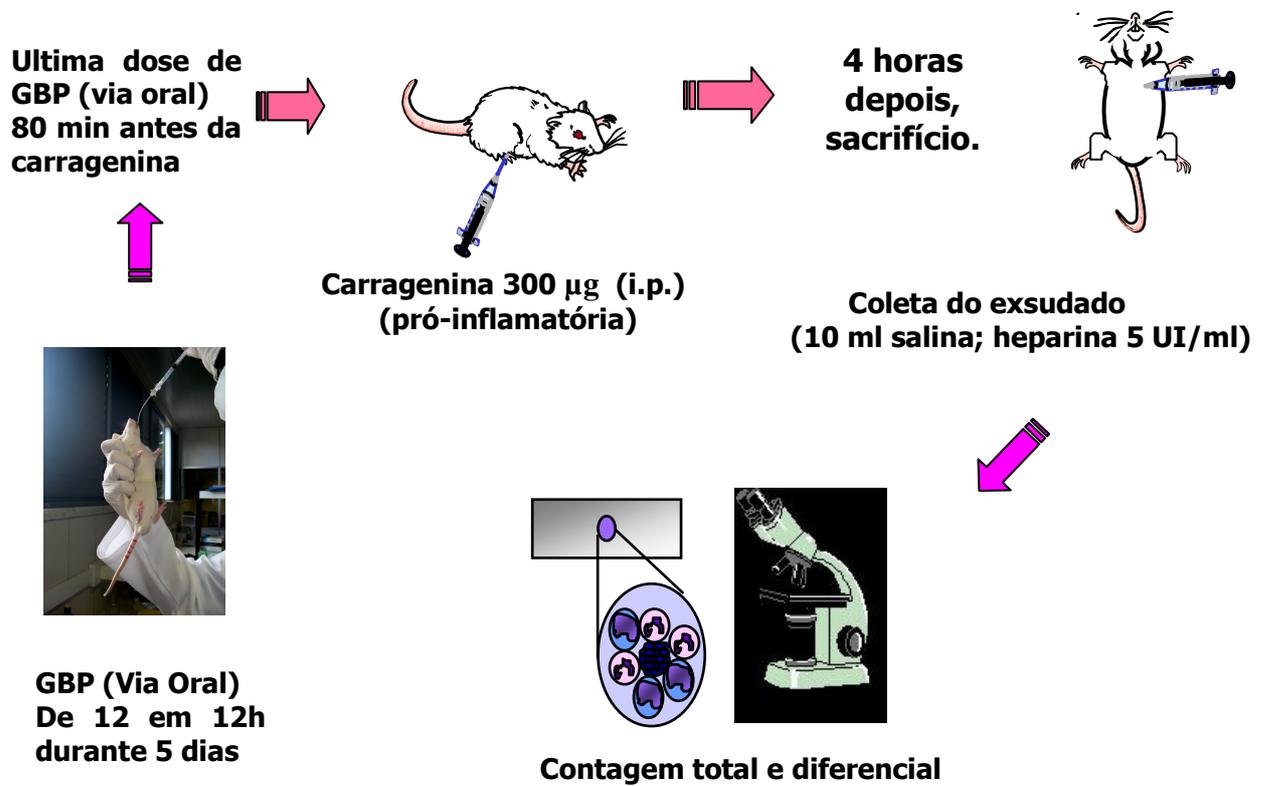
### 2.8.2. Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.

Com o objetivo de se avaliar a migração de neutrófilos para cavidade abdominal, a GBP diluída em salina (1ml) ou somente a salina (1ml) era aplicada via gavagem 80 minutos antes da aplicação intraperitoneal de carragenina (300 µg via intraperitoneal). Dezoito ratos *Wistar* (6 por grupo) foram divididos em três grupos: Salina + carragenina, GBP60mg + carragenina e GBP120mg + carragenina. Esse experimento foi realizado em animais que estavam no 5º dia de tratamento com a GBP via gavagem (de 12 em 12 h).

Foram injetados intraperitonealmente, por cavidade de cada animal, 300 µg de carragenina diluídos em 1 mL de salina estéril. Após quatro horas, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e seccionada com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens total e diferencial foram feitas de acordo com o método descrito por SOUZA & FERREIRA (1985). Ver figura 22.

Para a contagem total de células migradas, foram diluídos 20µL de líquido colhido em 380 µL de líquido de *Turk* (diluição de 1:20) e utilizados para contagem total de células em câmara de *Neubauer*. Dessa solução foram pipetados aproximadamente 20µl na câmara de *Neubauer* e realizado a contagem total. Foi feita essa contagem nos quatros quadrantes da câmara de *Neubauer* e o número de células contadas foi multiplicado por 50 (20 da diluição e 2,5 do fator de correção da câmara). Para contagem diferencial de células, 30 µL do exsudato foram colocados em citocentrífuga (10 min a 2800 rpm). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA3. A leitura foi realizada no microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x). Foram contadas 100 células em cada orifício (200 células por lâmina). O número total de macrófagos e monócitos e neutrófilos foram estimados multiplicando-se a porcentagem destas células vezes o total de células encontrado na câmara de *Neubauer*. Ver figura 22.

## Protocolo: Migração de Células

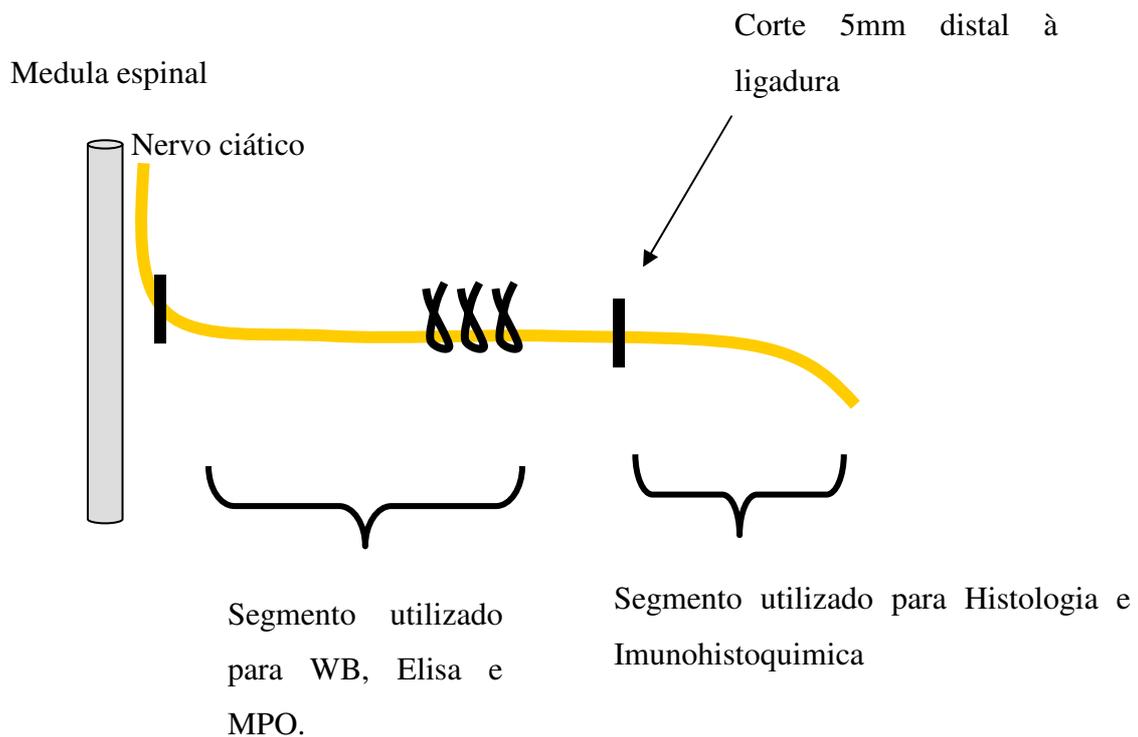


**Figura 22.** Delineamento da migração de células para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.

## 2. 9. Estudo molecular:

No 5º dia de tratamento com GBP via oral (12h/12h), após as observações de comportamento, cerca de 80 min depois da última dose de GBP, cada rato era anestesiado, sacrificado e coletado o nervo ciático, de acordo com o diagrama abaixo (figura 23), e congelado em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o dia do ensaio.

Foi escolhido o segmento proximal para as avaliações dos níveis de citocinas, dosagem de mieloperoxidase e PBM com o intuito de se avaliar a repercussão das alterações inflamatórias deste segmento proximal em relação ao segmento distal onde ocorre a degeneração Walleriana. E em segundo lugar para otimizar o número de animais utilizados, visto que os segmentos distais do mesmo animal eram utilizados para estudo histológico. Segundo Setton-Avruj *et al.* (2002), no segmento proximal também ocorre degeneração, embora de forma mais lenta.



**Figura 23:** Esquema da coleta do nervo ciático para posteriores estudos de Elisa, *Western Blot* (WB), imunohistoquímica e mieloperoxidase (MPO).

### 2.9.1. Ensaio de dosagem da mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, monócitos e macrófagos, é utilizada como marcador da presença de células inflamatórias no tecido inflamado, cuja presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. Um segmento de nervo de 3 cm (veja acima esquema de utilização do nervo) foi coletado e homogeneizado em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e centrifugado (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um *eppendorf* e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O) foram adicionados e lidos a 460nm ( $t_0=0$  min e  $t_1=1$  min). A leitura (em absorbância) foi realizada no tempo zero (logo após a aplicação da solução de leitura) e um minuto depois. A variação da absorbância (Delta = Absorb. do tempo Zero – Abs. do tempo 1 min.) foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa como nº células/mg de tecido (atividade de MPO).

### 2.9.2. Dosagem de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 por Elisa (Enzyme-Linked Immuno Assay)

Animais neuropáticos tratados cronicamente com GBP (60 e 120mg) ou salina foram sacrificados ao 5º dia e um segmento de nervo de 3 cm proximal à ligadura foi coletado e estocados em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e centrifugado (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um *eppendorf* e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. 7µL do sobrenadante foi utilizado para cada poço. Em seguida foram realizados os seguintes procedimentos:

- Placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 16 a 24h a 4°C com 2µg/mL de anticorpo de Captura diluído em tampão bicarbonato (pH 8.2) - 100µl/poço. Em seguida foram realizadas três lavagens das placas com PBS – Tween 20, 0,1% v/v.
- Bloqueio com Albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100µl/poço por 2h à temperatura ambiente. Em seguida, três lavagens das placas.

- Incubação com a curva padrão das citocinas diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100µl/poço por 16-24 à 4°C). Mais três lavagens foram realizadas.
- Incubação com anticorpo biotilado diluído a 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1h à temperatura ambiente. E três lavagens das placas.
- Incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100µl/poço por 15 min à temperatura ambiente. Três lavagens das placas.
- Incubação com O-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100µl/poço. A placa é coberta e deixada no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente.
- A reação é parada com 150 µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm. E os resultados são expressos em pg/mL/mg proteína. Ver aparelho para leitura das placas na figura 24.



**Figura 24:** Leitor de placa

### 2.9.3. Western Blotting – Expressão de Proteína Básica de Mielina (PBM) no Nervo Ciático.

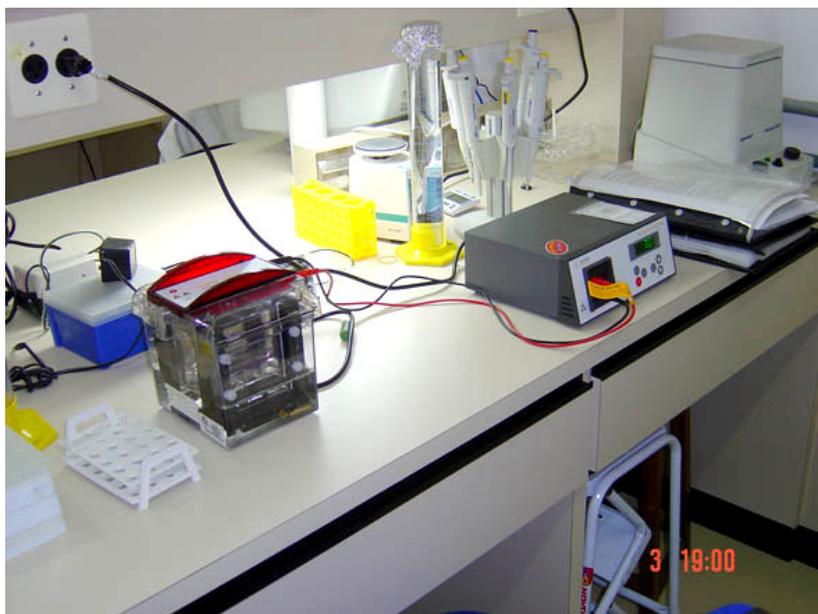
#### Eletroforese em gel e *Western Blotting*

O extrato protéico de nervo ciático de rato foi preparado homogeneizando o tecido em 200 microlitros de tampão de lise (1% Triton X-100 5mL, 0,2% Nonidet P40 substitute Fluka (#78385) 1mL, EDTA 2mM 200µL, dH<sub>2</sub>O 50 mL, pH 7,5). Extratos foram purificados através de centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. Para o controle de quantidade de proteína (µg) das amostras, foi utilizado o ensaio BCA de proteína (Pierce, cat. n° 23223) usando o ensaio BCA e sulfato de cobre II a 4%; as leituras de absorvância foram feitas com espectrofotômetro no comprimento de onda de 522nm. Logo em seguida foi feita a curva padrão de regressão linear (Software GraphPad Prism) a partir das leituras (absorvâncias) obtidas de cada amostra.

As amostras foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra (Tris HCl, pH 6,8, 0,5M, 2,5mL; SDS 10%, 4mL; glicerol, 2mL; b-mercaptoetanol, 1mL, dH<sub>2</sub>O suficiente para totalizar 10ml de amostra) e bromofenol azul, sendo em seguida colocadas em poços (formados por um *stacking* gel: solução bis-acrilamida 5%, 1670µL; tampão de separação, 2500µL; dH<sub>2</sub>O, 5790µL; SDS 10%, 100 µL; TEMED, 15µL; APS 10%, 30µL) em um gel de eletroforese (solução bis-acrilamida 12,5% à 4°C, 4170 µL; tampão de separação, 2500µL; dH<sub>2</sub>O, 3290µL; SDS 10%, 100µL; TEMED, 15µL; APS 10%, 30µL) imerso em um tampão de corrida (Tris Base, Sigma #T-1503, 0,25M; Glicina, Fischer #BP381-1, 1,92M; SDS 0,1% e 1L de dH<sub>2</sub>O) e corridas a 120V por 30min, e subseqüentemente por mais 1h e 30min com 180V. **Ver figura 25.** Foi usado 5µL de *Ladder* de proteína (Invitrogen, cat. n° 10748-010). Os *blots* foram transferidos para membranas de celulose pela técnica do “sanduíche” (esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, esponja) e em seguida submetidas a corrente de 35V por 1h, imersos em tampão de transferência (Tris Base, Sigma #T-1503, 0,25M; Glicina, 1,92M; Metanol, 200mL, dH<sub>2</sub>O suficiente para totalizar 1000 mL). Em seguida, as membranas foram bloqueadas *overnight* em 25ml de solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) em tampão de lavagem (0,8% NaCl, 0,242% Tris Base (Sigma #T-1503), *Tween* 20, 1mL) à 4°C. Depois se incubou a membrana com anticorpo anti - *Myelin Basic Protein* (PBM) tipo *goat*, Laboratório Santa Cruz, diluição: 1:500, ou anti-actina, tipo *goat*, Lab. Santa Cruz, diluição:1:1000, em solução contendo 5% de leite em pó desnatado em tampão de lavagem por 1h na plataforma de agitação a temperatura ambiente (26°C), com 3 lavagens com tampão de lavagem (3 x 10min/operação), para em seguida ser incubada com anticorpo secundário anti-*goat* (IgG Horseradish Peroxidase, Amersham

Pharmacia BioTech UK Limited Na934V, lot 198465) diluição de 1:1000 em solução de 5% de leite em pó desnatado em tampão de lavagem por 1h na plataforma de agitação, com lavagens subseqüentes semelhante à da incubação anterior. Depois disso, os *blots* foram submetidos à ECL (Tris, 10mL; 22 $\mu$ L de ácido p-cumárico; 50 $\mu$ L de luminol, 3 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para exposição ao filme fotográfico. Este depois foi revelado, fixado e posteriormente digitalizado em foto tipo “Jpeg”.

A análise densitométrica foi realizada nas fotos digitalizadas a partir dos filmes fotográficos contendo as referidas bandas de acordo com o peso molecular da PBM (que se encontravam entre a 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> banda do *Ladder*) e quantificada com o software de análise de imagem: *image J* (NIH. Bethesda. MA.USA). A intensidade de preto era avaliada para cada banda de cada amostra. Em seguida foi obtida uma razão entre estes valores da densitometria da incubação com o anti-PBM (para cada amostra) e os valores da densitometria obtidos da incubação com o anticorpo anti-actina (utilizado como controle de proteína total aplicada em cada poço do gel). Depois as médias das razões de cada grupo foram confrontadas estatisticamente.



**Figura 25.** Aparelhos para eletroforese

#### 2.9.4. Imunohistoquímica:

Os animais sob anestesia profunda foram exsanguinados e em seguida os nevos ciáticos foram expostos e seccionados 5mm distal às ligaduras. Os segmentos distais foram imersos em formol 10% e após 24 horas imersos em solução álcool /água 70%. Alguns dias após, os segmentos foram desidratados e incluídos em parafina para formação dos blocos. Estes foram cortados em micrótomo com cinco micrômetros de espessura para cada fatia. As fatias eram colocadas em água morna e “pescadas” com lâminas “Probe-on Plus” (Fisher) próprias para imunohistoquímica, as quais não precisavam de albumina para fixação na lâmina.

As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Em seguida as peças foram imersas em tampão citrato 0,1M (pH 6.0) e aquecidas a 100°C durante 15 min. O resfriamento ocorreu em temperatura ambiente durante 20min. Lavagem das peças em PBS durante 5min. Para bloqueio da peroxidase endógena as peças foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 min e em seguida lavadas com PBS (Salina Tamponada).

As peças foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-TNF ou anti-IL-1 ou anti- IL-10 ou anti- PBM diluídos em PBS – BSA 5% (albumina de soro bovino). Depois da incubação foi feita uma lavagem com PBS.

A incubação das peças com o anticorpo secundário (anti-goat IgG H+L – Vector, BA5000) ocorreu durante 30 min. Para tal procedimento, o anticorpo foi diluído em PBS-BSA5%. Depois da incubação foi feita uma lavagem em PBS.

Foi feito o preparo do complexo ABC (vide reagentes e soluções) e incubação com o mesmo. Após a incubação foi realizada nova lavagem em PBS.

Em seguida foi realizada uma incubação com DAB/peróxido durante 2 minutos e posterior lavagem com água destilada. As peças foram contra-coradas com hematoxilina de Harry's para melhor visualização do citoplasma e núcleos das células. E finalmente as lâminas foram desidratadas progressivamente e montadas.

## 2.10. Estatística

Para análise estatística dos dados utilizaram-se os programas de computador Excel e Prisma onde foram executados os testes estatísticos.

Os valores encontrados nos resultados abaixo estão expressos na forma de média  $\pm$  EPM (Erro padrão da Média). Inicialmente, para se saber se os dados de um grupo possuíam distribuição normal utilizou-se o teste de *Kolmogorov – Smirnov*. Para comparar entre médias de vários grupos com distribuição Normal se utilizou o teste de análise de variância – ANOVA seguido de um pós-teste de *Turkey*, para se verificar a diferença significativa entre médias de dois grupos. Para grupos com distribuição não normal (dados não paramétricos) utilizou-se o teste de *Kruskal – Wallis* para análise de vários grupos, e para confrontar dois grupos se utilizou o teste de *Mann-Whitney*. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi inferior a 5% ( $p < 0,05$ ). As médias que foram significativamente ( $p < 0,05$ ) diferentes do controle salina (grupo neuropático tratado com o veículo salina) estão indicadas com um asterisco (\*). O símbolo jogo da velha (#) utilizou-se para indicar quando a média do grupo salina era significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) da média do grupo pseudo-operado (*sham*).

## **RESULTADOS**

### 3. RESULTADOS:

#### 3.1. Efeito da GBP nos comportamentos espontâneos em ratos neuropáticos tratados cronicamente ao longo de 5 dias:

Coçar-se (*scratching*), morder-se (*biting*), lambar-se (*liking*), empinar-se (*rearing*), escalar (*climbing*), andar (*walking*), limpar-se (*grooming*), cheirar (*sniffing*), dormir/descansar (*rest-sleeping*), imobilidade (*sniffing + rest-sleeping*) congelar-se (*freezing*), comendo ou roendo (*eating-gnawing*).

Obs. Estes resultados se encontram em gráficos demonstrados a seguir e também em tabela única nos anexos.

##### 3.1.1. Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP no comportamento *scratching* (coçar-se) pata direita e esquerda em ratos neuropáticos tratados cronicamente ao longo de 5 dias:

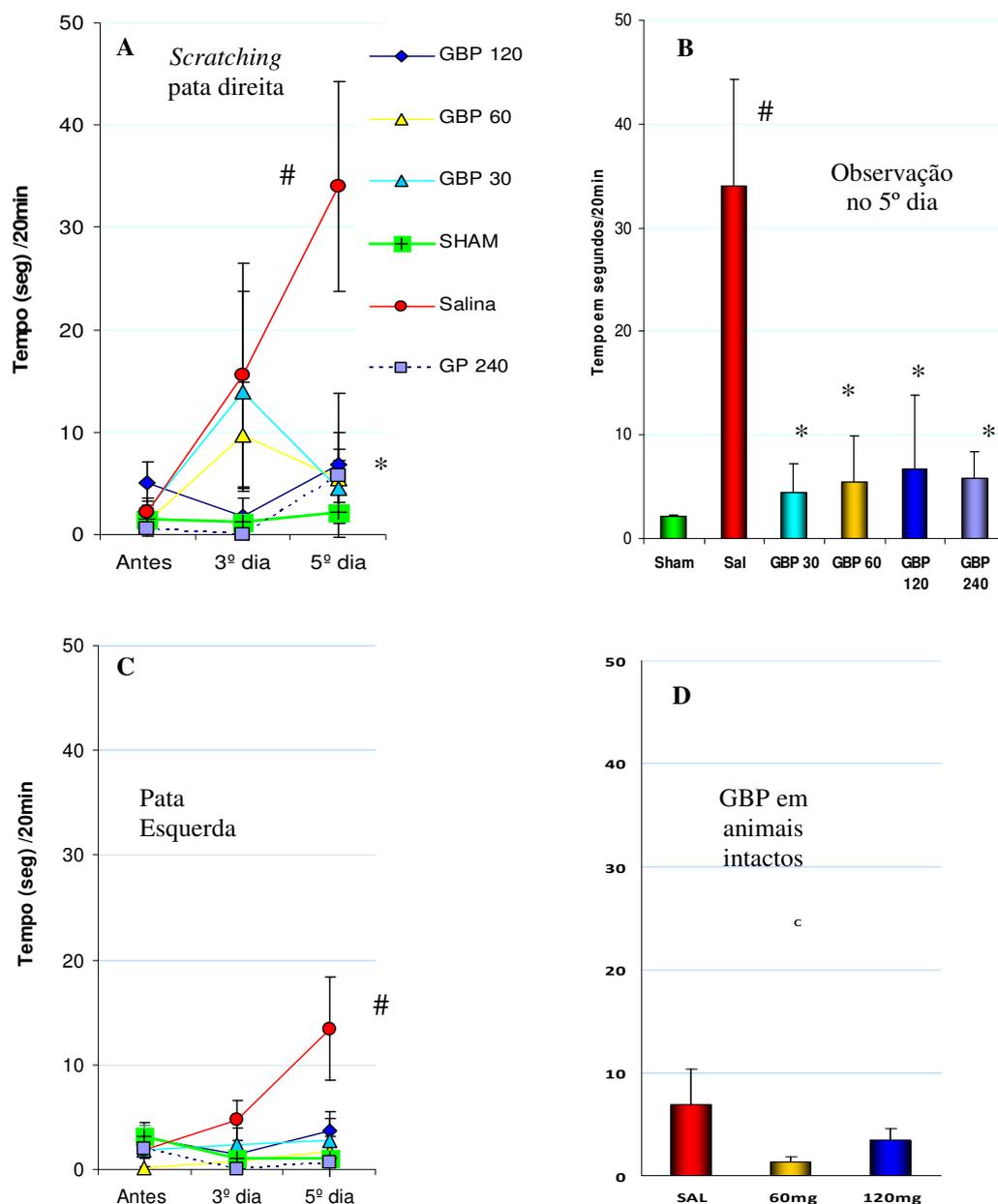
No quinto dia de tratamento, o tempo de *scratching* na pata operada (direita) do grupo salina ( $34,0 \pm 10,29$  segundos) foi significativamente ( $p < 0,001$ ) superior aos animais do grupo *sham* ( $2,13 \pm 0,17$  s.). Demonstrando que os animais com a CCNC aumentaram bastante a expressão deste comportamento espontâneo sugestivo de dor crônica na pata ipsilateral em relação aos animais do grupo *sham* (falso-operados), indicando assim a presença de neuropatia nos animais com a CCNC (grupo salina).

Ainda no final do tratamento (no 5º dia) as doses de GBP 30, 60, 120, e 240mg ( $4,5 \pm 2,74$ ;  $5,5 \pm 4,44$ ;  $6,77 \pm 7,08$ ;  $5,8 \pm 2,59$  s. respectivamente) provocaram redução (86,76%; 83,82%; 80,09%; 82,94%) significativa ( $p < 0,01$ ) no comportamento *scratching* pata direita em relação ao grupo neuropático salina ( $34,0 \pm 10,29$  s.), no entanto sem diferença significativa entre as mesmas doses. Não havendo um efeito dose-dependente. Veja figura 26A, 26C e na tabela 3 encontrada nos anexos.

No terceiro dia de tratamento, ainda considerando a pata direita, as doses de GBP (grupos das doses de 30 a 240mg) inclusive o grupo salina, não apresentaram diferenças significativas entre si em virtude dos grandes desvios. Embora não estatisticamente significativo, o grupo salina apresentou um grande aumento em relação ao grupo *sham* e o grupo GBP 120 reduziu bastante (88,51%) este comportamento em relação ao grupo salina (de  $15,55 \pm 10,91$  para  $1,77 \pm 1,79$ ). Praticamente todas as observações realizadas no 3º dia não expressaram médias com diferenças significativas entre os grupos, talvez em virtude dos animais ainda estiverem se recuperando do trauma cirúrgico. Ver figura 26A.

No quinto dia, considerando a pata esquerda, houve pequena manifestação de dor (*scratching*) nos animais neuropáticos tratados com salina ( $13,40 \pm 4,92$  s) significativamente diferente do grupo *sham* ( $1,04 \pm 0,39$ s.,  $p = 0,018$ ) e das doses de GBP 60 ( $1,64 \pm 0,89$ s) e de 120mg/kg ( $0,60 \pm 0,7$ s). Ver figura 26B.

Com intuito de se avaliar o efeito da GBP *per si* (independente da neuropatia), animais intactos ou normais (sem CCNC e sem falsa cirurgia) foram também tratados com GBP (00, 60 e 120mg) e observados quanto ao comp. *scratching* (coçar-se) mas não ocorreram diferenças significativas entre os grupos e as médias foram muito baixas. Indicando que este comportamento não é comum nos animais normais, como também a GBP por si só não induz ou inibe este comportamento na ausência de neuropatia. Veja figura 26D.



**Figura 26: Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg, via oral) no tempo (segundos) do comportamento *scratching*.** N =10, 14, 13, 5, respectivamente e grupo salina (N=23) e grupo *sham* (N=20). *Cut Off* = 20 min. **Painel A:** Na pata direita. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. **Painel B:** Expressão dos mesmos dados somente no 5º dia. **Painel C:** Na pata esquerda. (mesmo protocolo). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg, via oral) ou salina no comportamento *scratching* na pata direita em ratos intactos (N=12). Médias expressas do 5º dia.

Obs.: Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey. As barras representam as médias + EPM (Erro Padrão da Média) das patas direitas. \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e #p < 0,05 em relação ao grupo *sham*.

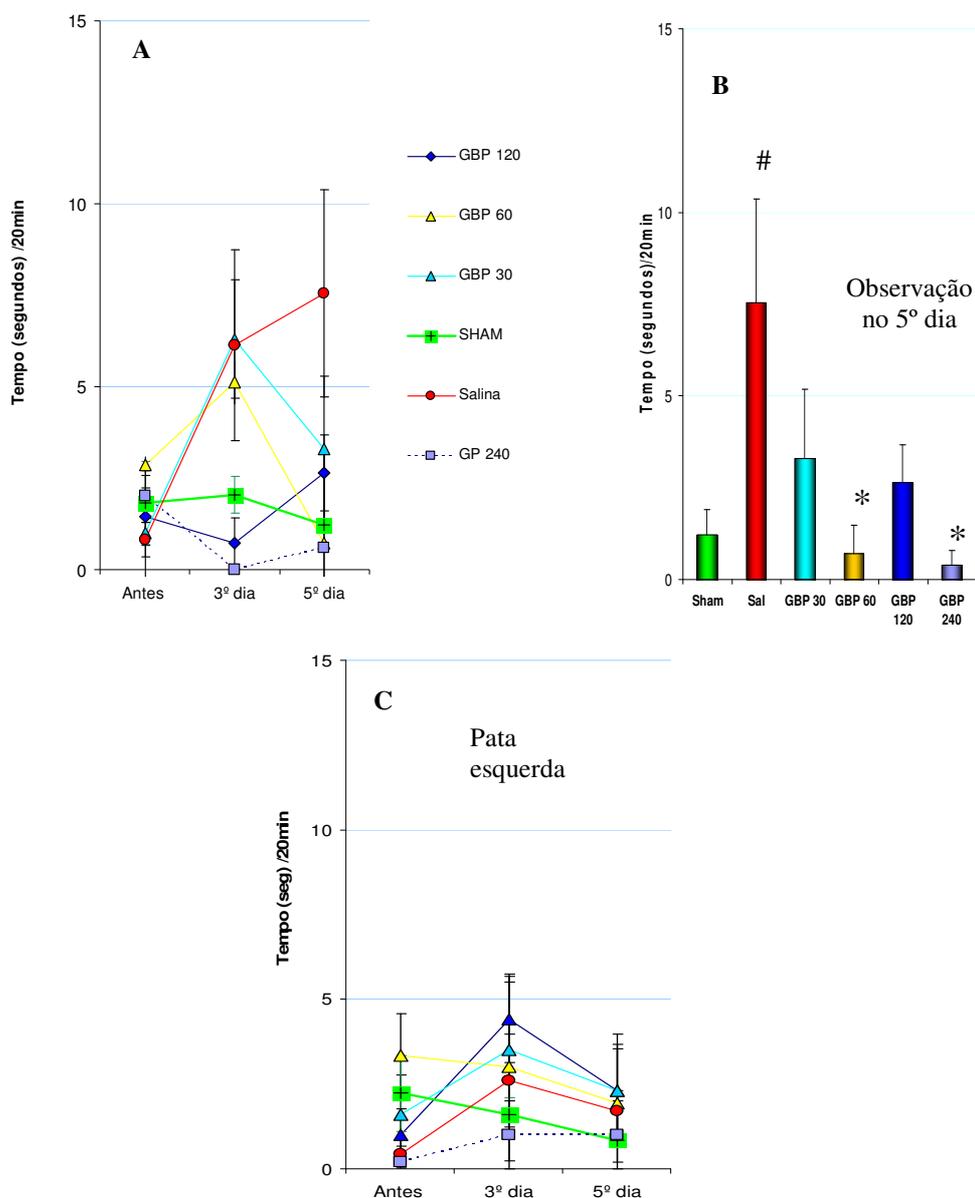
### 3.1.2 Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP no comportamento *biting* (morder-se) para o lado direito e esquerdo:

A neuropatia também foi constatada no comportamento *biting* direito (morder-se para o lado direito) no 5º dia, haja vista que os animais com CCNC tratados com salina ( $7,55 \pm 2,82$  seg.) apresentaram um aumento relevante em relação aos animais do grupo *sham* ( $1,22 \pm 0,69$  seg.). Ver figura 27A e 27B.

Considerando o comportamento *biting* lado direito no 5º dia, as doses de 60mg ( $0,71 \pm 0,77$  seg.) e 240mg ( $0,40 \pm 0,41$  seg.) provocaram uma inibição significativa de 90,53% e 94,7% respectivamente no tempo deste comportamento em relação ao grupo salina ( $7,55 \pm 2,82$  seg.) ( $p < 0,01$ ). A dose de 120mg provocou uma forte tendência à redução ( $p=0,068$ ) em relação ao grupo salina. Ver figura 27A e 27B

No comportamento *biting* lado esquerdo não ocorreram alterações significativas entre os grupos. Ver figura 27C.

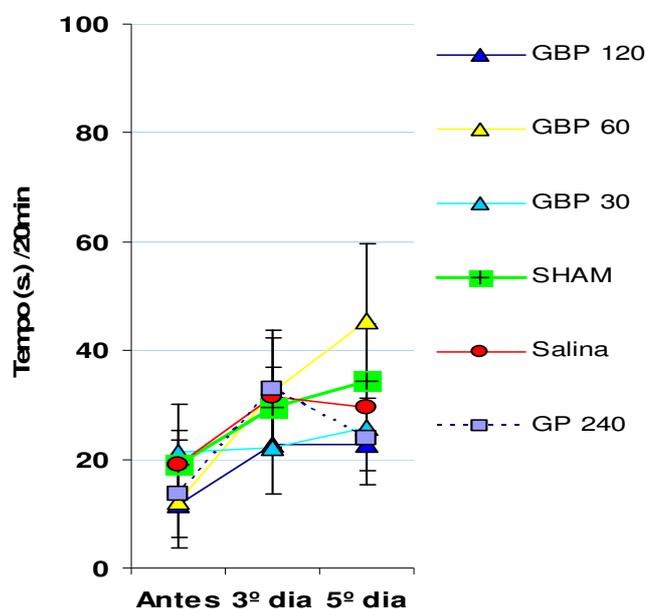
Com intuito de se avaliar o efeito da GBP *per se* (independente da neuropatia), animais não neuropáticos (intactos) foram também tratados com GBP 60, 120mg ou salina e observados quanto ao comportamento *biting*. Todos os grupos (salina, 60mg e 120mg/kg) obtiveram o tempo de *biting* igual à zero (dados não explícitos).



**Figura 27. Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg.) no comportamento *biting* (morder).** N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=23 e grupo sham N=20. *Cut Off* = 20 min. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. **Painel A.** Comportamento morder para o lado direito. Resultado das observações no tempo zero (antes da CNC) no 3º e 5º dia. **Painel B.** Observações do comportamento morder para o lado direito somente do 5º dia. **Painel C:** Observações do comp. morder para o lado esquerdo (mesmo protocolo). **Obs:** O efeito da GBP (60, 120mg/kg., via oral) em ratos *intactos* (N = 12) no tempo do comportamento *biting* foi praticamente zero (dados não explícitos). As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo Sham. Testes estatísticos: Kolmogorov – Smirnov, Anova e pós-teste de Turkey

### 3.1.3. Efeito da GBP no comportamento *liking* (lamber-se):

Os grupos salina, *sham* e GBP 30, 60, 120 e 240mg/kg.p.v. não apresentaram valores de comportamento diferentes entre si em nenhum dos tempos (antes da CCNC, 3º e 5º dia após a CNC) para este comportamento *Liking* (lamber-se). Ver figura 28.



**Figura 28. Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg.p.v., via oral.), no tempo (s.) do comportamento *Liking* (Lamber-se).** Resultado das observações no tempo zero (antes da CCNC) no 3º e 5º dia. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. Tempo máximo de observação (*Cut Off*): 20 min. Cada dose consta de um grupo de N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=23 e grupo *sham* N=20.

Obs.: As linhas representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

### 3.1.4. Efeito da GBP no comportamento *rearing* (empinar-se):

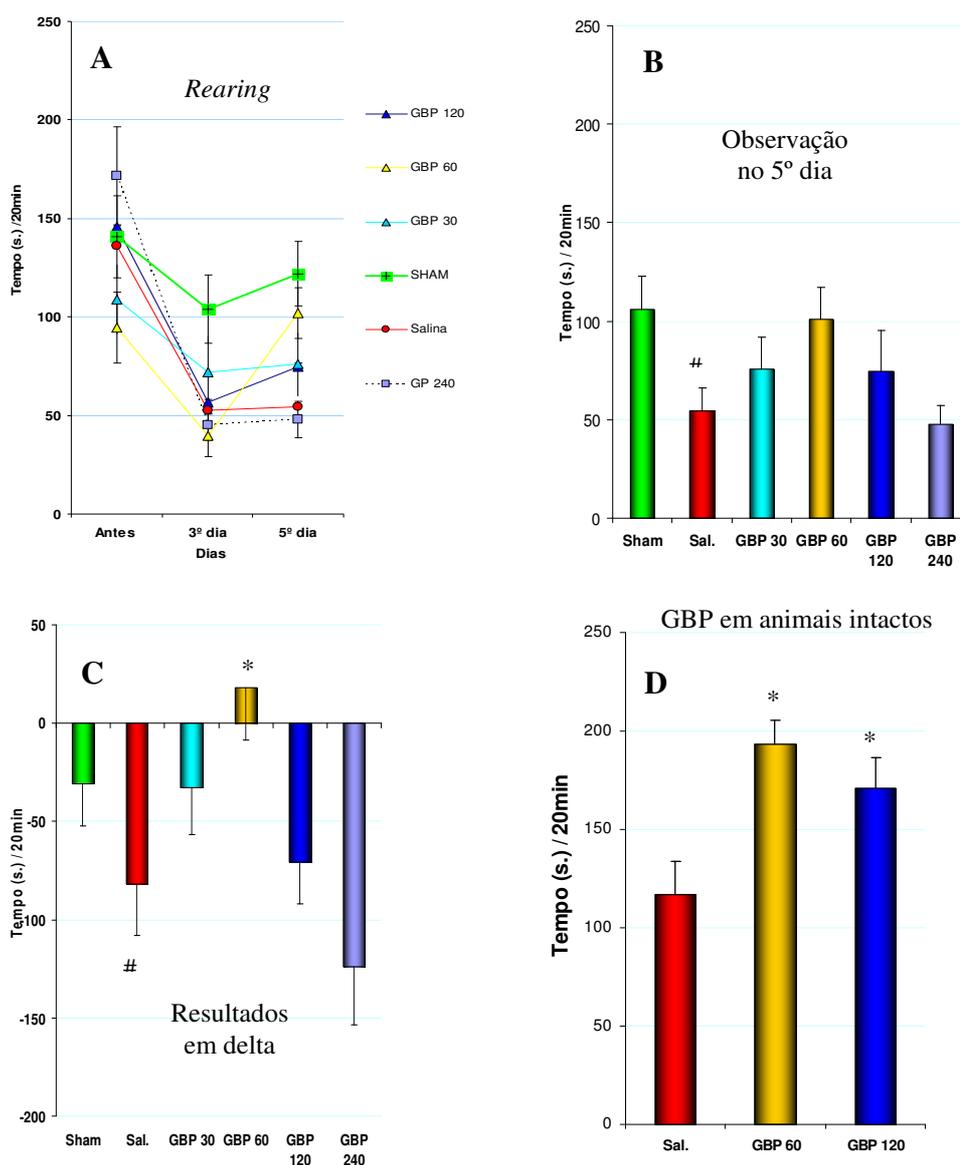
No 5º dia de neuropatia, o grupo salina ( $54,4 \pm 11,74$ seg.) reduziu significativamente em 48,56% o comportamento *rearing* em relação ao grupo *sham* ( $107,77 \pm 16,97$ seg.). Ver figura 29A e 29B.

A dose de 60mg ( $101,00 \pm 16,35$  seg.) provocou um aumento de 85,66% em relação ao grupo salina ( $54,40 \pm 11,74$  seg.). Este aumento não foi significativamente diferente. No entanto, considerando que os grupos no tempo zero (antes da CCNC) apresentaram médias de tempos muito desiguais, para confrontar os grupos de forma mais competitiva e honesta calculou-se os resultados em forma de ganho (diferença entre os tempos do 5º dia e os tempos antes da CCNC) e observou-se um aumento (ganho de 121,99%) significativo do grupo GBP60mg ( $18,00 \pm 26,72$ s.) em relação ao grupo salina ( $-81,87 \pm 26,31$ s.). Ver figura 29B e C.

Considerando os resultados ainda em “ganho”, a dose de 30mg ( $-33,00 \pm 23,70$ seg) também provocou uma melhora neste comportamento em relação ao grupo salina ( $-81,87 \pm 26,31$ seg), mas não significativa ( $p > 0,05$ ). Ver Fig. 4B.

A dose de GBP 240mg ( $-123,80 \pm 29,53$ seg) provocou uma redução no tempo deste comportamento em relação ao grupo salina ( $-81,87 \pm 26,31$  s.), mas não significativa. No entanto, entre as doses de 60, 120 e 240mg houve diferença significativa na redução do tempo deste comportamento, ou seja, uma redução dose dependente. Ver Fig. 4B

Com intuito de se avaliar o efeito da GBP *per si* (independente da neuropatia), animais **intactos** (normais) passaram pelo mesmo protocolo acima e foram também tratados com GBP (00, 60 e 120mg) e observados quanto ao comportamento *rearing* (empinar-se). As doses de 60mg ( $193,5 \pm 13,65$ seg) e 120mg ( $170,83 \pm 14,78$ seg) apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo salina ( $117 \pm 15,62$ ) ( $p = 0,0017$  e  $0,0070$ ). Sugerindo que estas doses, independente da neuropatia, aumentam a capacidade dos animais se apoiarem sobre os membros posteriores ou causam efeito excitante, aumentando curiosidade ou ainda bem estar. Logo, sugerindo-se não causar efeito sedativo. Ver Figura 29D.



**Figura 29.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg, via oral) no tempo (segundos) do comportamento *Rearing*. N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=23 e grupo *Sham* N=20. *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. Cada dose consta de um grupo de. **Painel A.** Resultados expressos ao longo dos cinco dias. **Painel B.** Resultados expressos somente no 5º dia. **Painel C.** Mesmo protocolo sendo os resultados expressos em delta (5º dia – antes). **Painel D:** Efeito da GBP (60 e 120mg/kg, via oral) ou salina em **ratos intactos** (N = 12) no tempo (s.) do comportamento *rearing*. Médias expressas no 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

### 3.1.5. Efeito da GBP no comportamento *climbing* (escalar):

Considerando o comportamento *climbing* no 5º dia de neuropatia, o grupo salina ( $95,28 \pm 17,17$  s.) não foi diferente significativamente em relação ao grupo *sham* ( $89,44 \pm 9,70$  s.). Demonstrando que os animais neuropáticos não expressaram capacidade de subir degraus diferentemente dos animais falso-operados. Ver figura 30.

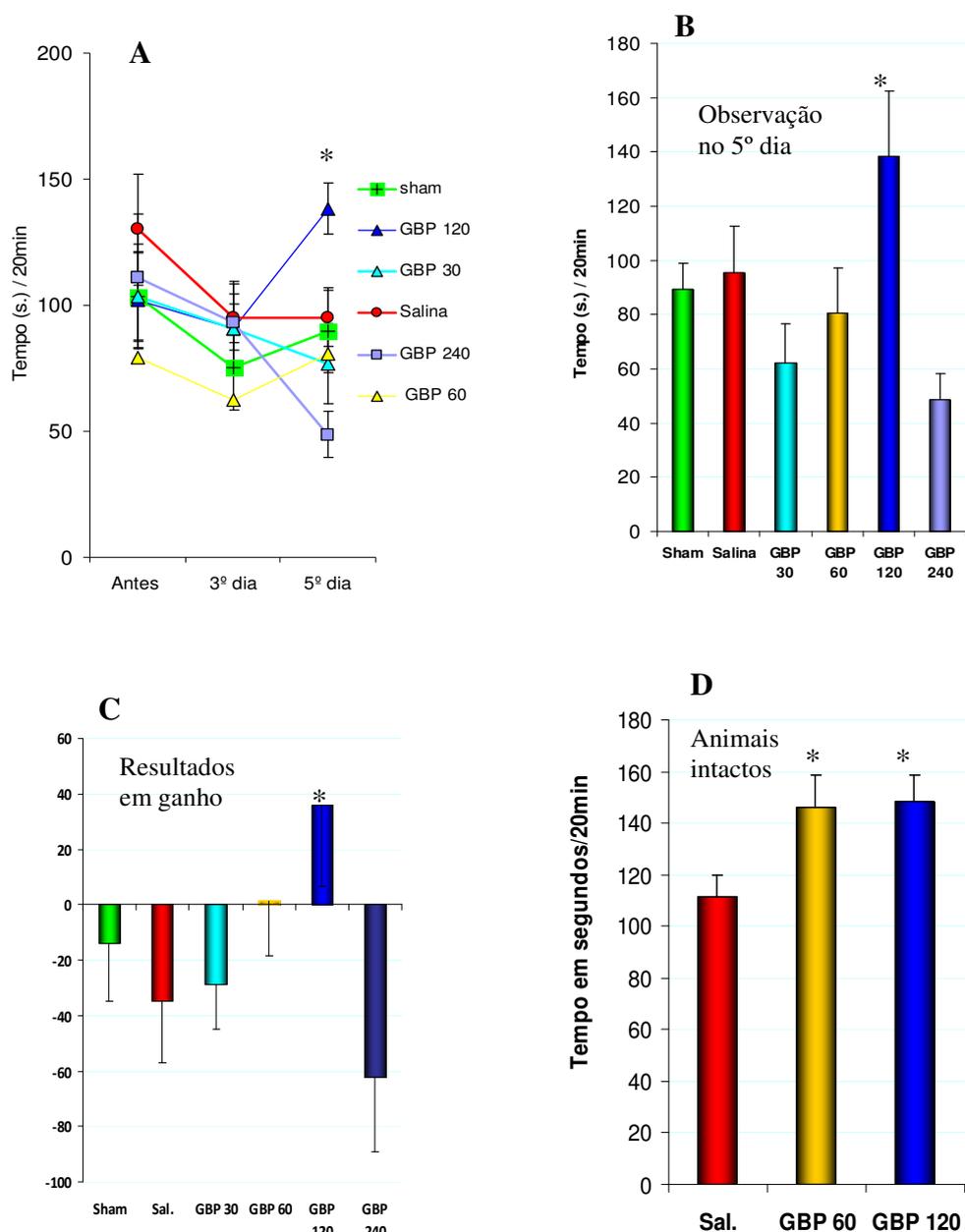
A dose de GBP 30mg ( $62,30 \pm 16,63$  s.) não provocou alteração significativa neste comportamento em relação ao grupo salina ( $95,28 \pm 17,17$ ). ( $p > 0,05$ ). Ver figura 30A.

Na forma de ganho, a dose de GBP 60mg ( $1,44 \pm 19,75$ ) provocou uma tendência de aumento ( $p=0,093$ ) de 104,10% em relação ao grupo salina ( $-35,05 \pm 22,02$ ). Ver figura 30C.

Na observação do 5º dia, a dose de 120mg ( $138,20 \pm 24,12$ s.) provocou aumento significativo de 145,04% no tempo deste comportamento em relação ao grupo salina ( $95,28 \pm 17,17$ s.). Ver figura 30A e 30B. Como também na forma de ganho (5º dia – antes da CNC) esta mesma dose de 120mg ( $36,00 \pm 29,43$ s.) provocou um aumento significativo de 202,71% em relação ao grupo salina ( $-35,05 \pm 22,02$ s.). Sugerindo que esta dose melhora a condição dos animais em subirem degraus. Ver figura 30C.

A dose de 240mg ( $48,60 \pm 9,83$  s.) provocou uma redução no tempo deste comportamento em relação ao grupo salina ( $-95,28 \pm 17,17$ s.), não significativa ( $p = 0,067$ ). Sugerindo-se que esta dose pode causar efeito sedativo. Ver figura 30B.

Com intuito de se avaliar o efeito da GBP *per si* (independente da neuropatia), animais **intactos** passaram pelo mesmo protocolo acima e foram também tratados com GBP (00, 60 e 120mg) e observados quanto ao comp. *climbing* (escalar). As doses de GBP 60mg ( $146,16 \pm 12,39$  s.) e 120mg ( $148,50 \pm 9,91$  s.) apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo salina ( $111,63 \pm 8,31$ ) ( $p= 0,037$  e  $0,025$ ). Sugerindo que estas doses, independente da neuropatia, aumentam a capacidade dos animais de subirem degraus. Ver figura 30D.



**Figura 30.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg, via oral) no tempo (segundos) do comportamento *climbing*. N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=23 e grupo *Sham* N=20. *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia.

**Painel A:** Observações ao longo dos cinco dias. **Painel B:** Observações do 5º dia. **Painel C:** Resultados expressos em delta (médias no 5º dia - antes da CCNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60 e 120mg/kg., v.o.) ou salina em **ratos intactos** no tempo (s.) do comportamento *climbing*. Médias expressas no 5º dia. Cada grupo possui N = 12.

As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

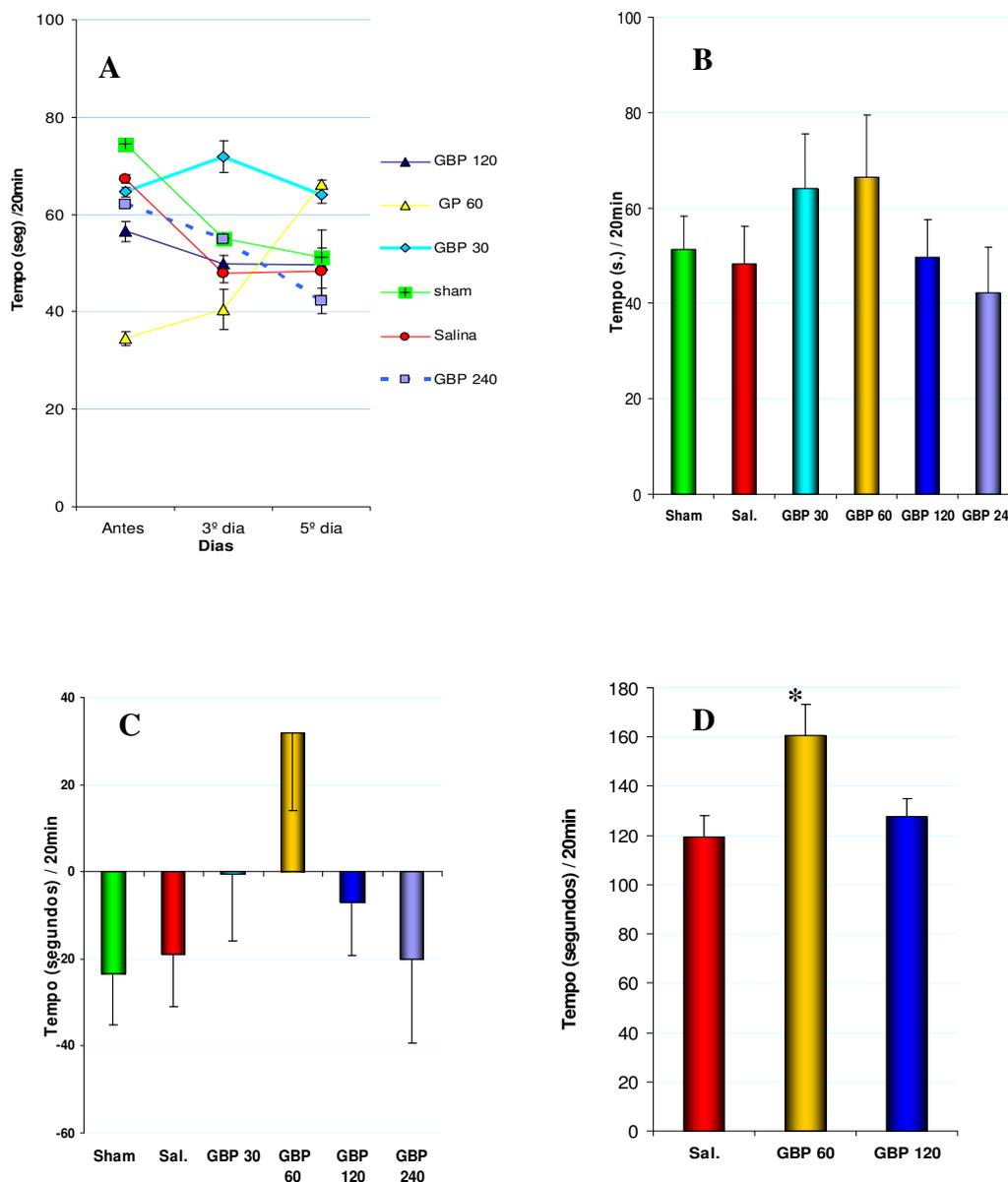
### 3.1.6. Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP no comportamento *walking* (andando):

Considerando o comportamento *walking* no 5º dia de neuropatia, o grupo salina ( $48,33 \pm 7,82$  s.) não foi diferente significativamente em relação ao grupo *sham* ( $51,26 \pm 7,10$  s.). Sugerindo que os animais neuropáticos não expressaram capacidade de andar diferentemente dos animais falso-operados. Ver figura 31A e 31B

Ainda no 5º dia de neuropatia, as doses de 30mg ( $62,30 \pm 16,63$  seg.), 60mg ( $66,33 \pm 13,26$ ), 120mg ( $49,69 \pm 7,89$ ), 240mg ( $42,20 \pm 9,59$ ) não provocaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) entre elas ou em relação ao grupo salina ( $48,33 \pm 7,82$  s.) neste comportamento. Embora tenha ocorrido uma tendência de aumento nas doses de 30 e 60mg/kg. Ver figura 31A.

Nos resultados expressos na forma de ganho, a dose de 60mg ( $31,77 \pm 17,69$ ) provocou um aumento acentuado de 267,82% em relação ao grupo salina ( $-18,93 \pm 12,02$ ), no entanto, devido aos desvios, a diferença destas médias não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Ver figura 31C.

No estudo dos efeitos da GBP (60 e 120mg) em animais **intactos**, a dose de 60mg ( $160,66 \pm 12,47$  s.) apresentou um aumento (34,63%) significativo em relação ao grupo salina ( $119,33 \pm 8,58$ ) ( $p = 0,027$ ). Sugerindo que esta dose, independente da neuropatia, aumenta a capacidade dos animais andarem e assim não causa efeito sedativo neste modelo. A dose de 120mg ( $127,75 \pm 7,23$  s.) não foi significativamente diferente do grupo salina. Ver figura 31D.



**Figura 31.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na duração de tempo (s.) do comportamento *walking* (andando) em ratos com CCNC. N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo *Sham* N=20. *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

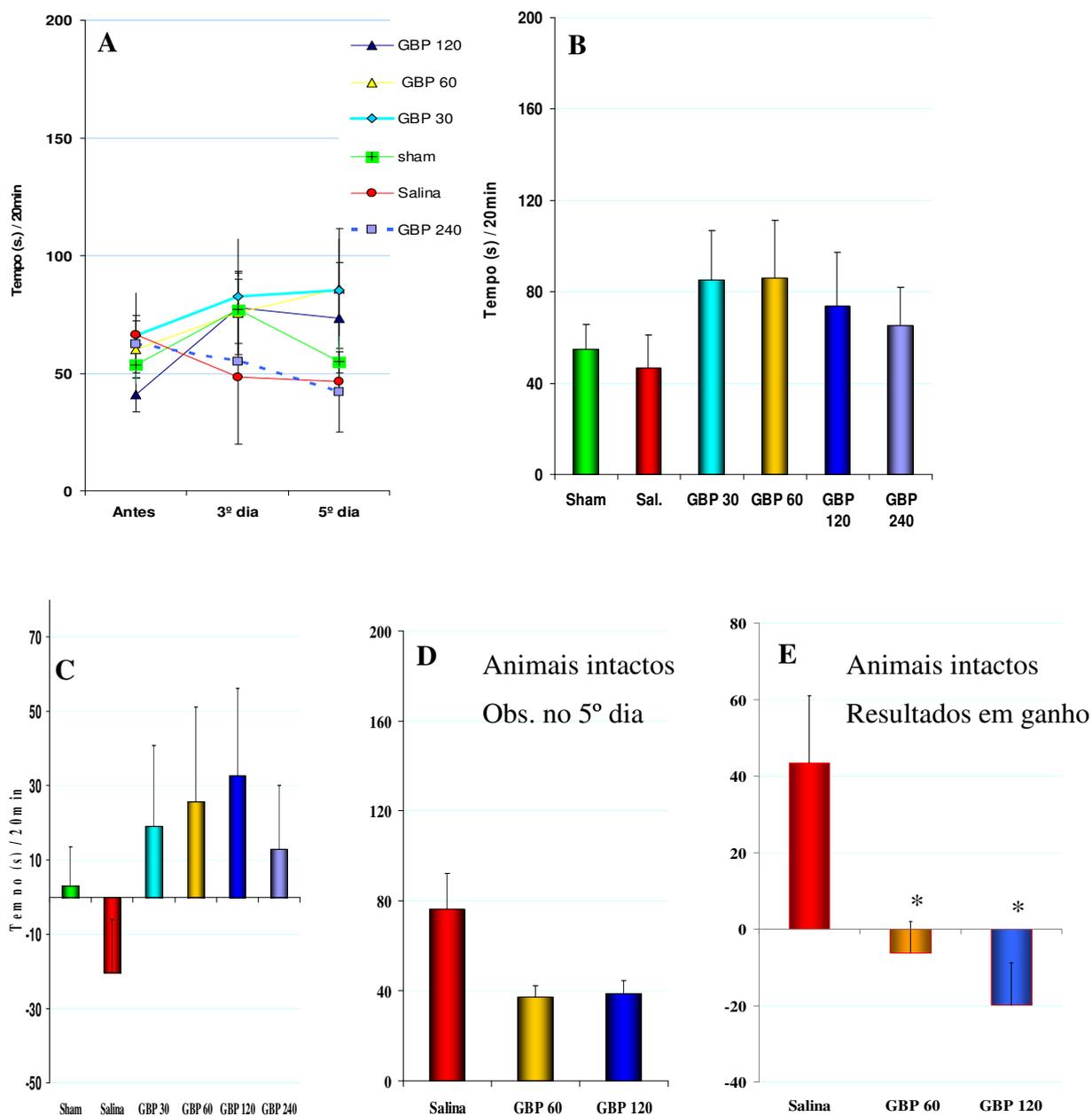
**Painel A:** Resultados das observações antes da CC, no 3º dia e no 5º dia após a CC. **Painel B:** Mesmo estudo, no entanto, os valores se apresentam em ganho (diferença entre as médias no 5º dia e antes da CC). **Painel C:** Observações expressas somente do 5º dia. **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg. Via oral) em ratos **intactos** (N=12) no tempo do comportamento *walking* (andando). Médias expressas no 5º dia.

### 3.1.7. Efeito da GBP no comportamento *grooming* (escovar-se):

No final do tratamento (no 5º dia), o grupo salina ( $46,6 \pm 16,86$  seg.) não foi significativamente ( $p > 0,5$ ) diferente em relação ao grupo *sham* ( $54,91 \pm 10,68$  s.). Como também na forma de ganho não houve diferenças significativas, embora o grupo salina pareceu reduzir este comportamento. Ver figura 32A e 32B.

Ainda analisando as observações do 5º dia, as doses de 30mg ( $85,1 \pm 21,74$  s.), 60mg ( $85,85 \pm 25,45$ s), 120mg ( $73,59 \pm 23,57$  s.) e 240mg ( $65,00 \pm 16,98$  s.) não provocaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo salina ( $54,91 \pm 10,68$  s.). Ver figura 32B. No entanto, na forma de ganho, a dose de 120mg ( $32,76 \pm 22,89$ s.) provocou uma forte tendência de aumento ( $p= 0,054$ ) em relação ao grupo salina ( $-20,24 \pm 21,61$ s.). Ver figura 32C.

No estudo dos efeitos da GBP no comportamento *grooming* (escovar-se) de animais **intactos** as doses de 60mg ( $37,33 \pm 4,97$  s.) e de 120mg ( $38,75 \pm 5,89$ ) apresentaram uma tendência de redução (51,09% e 49,23%) em relação ao grupo salina ( $76,33 \pm 15,96$ ) ( $p= 0,055$  e  $0,068$ ). Ver figura 32D. Na forma de ganho as doses de 60mg ( $-6,29 \pm 8,31$  s.) e de 120mg ( $-19,79 \pm 11,02$ s.) apresentaram uma redução (-114,49% e -145,62%) significativa em relação ao grupo salina ( $43,38 \pm 17,57$ s.) ( $p=0,037$  e  $p=0,015$ ). Sugerindo que estas doses, independente da neuropatia, reduzem este comportamento. Ver figura 32E.



**Figura 32.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na duração de tempo (segundos) do comportamento *grooming* (escovar-se) em ratos com CCNC. (N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo Sham N=20). *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Resultados das observações antes da CCNC, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC. **Painel B:** observações do 5º dia. **Painel C:** Resultados em ganho (médias do 5º dia - antes da CNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg.) em ratos **intactos** (N=12) no tempo do comportamento *Grooming*. Médias expressas em único tempo (no 5º dia). **Painel E:** mesmo estudo com os resultados expressos na forma de ganho.

### 3.1.8. Efeito da GBP no comportamento *sniffing* (cheirar):

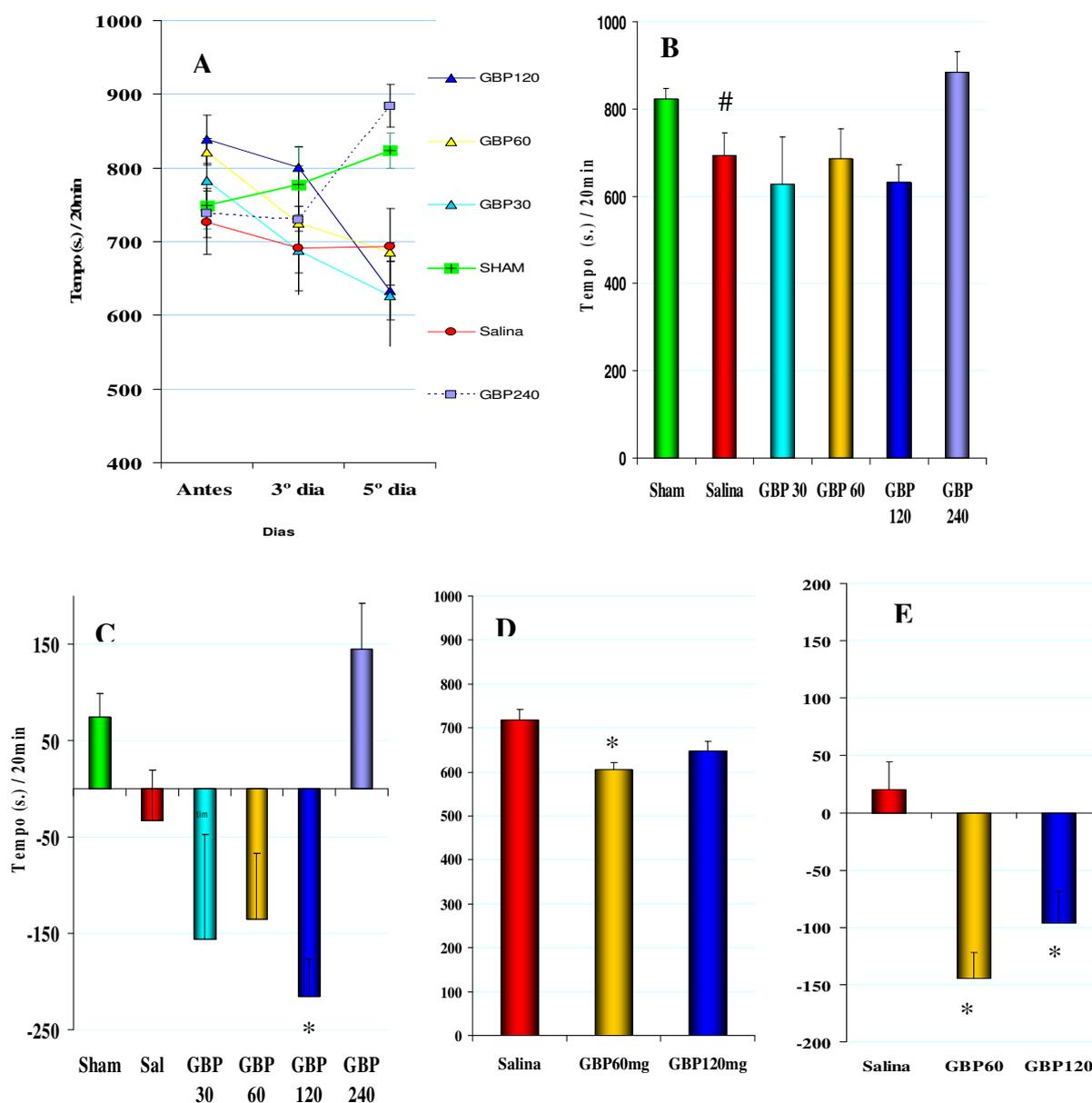
Neste comportamento era contabilizado o tempo em que o animal cheirava e estava simultaneamente com os membros imóveis, com movimentos apenas do focinho e cabeça. Logo, pode ser considerado um comportamento de imobilidade parcial ou de baixa motricidade.

O grupo salina ( $692,95 \pm 51,99$  s.) foi significativamente inferior em relação ao grupo *sham* ( $823 \pm 23,84$  s.). Ou seja, os animais neuropáticos tratados com salina se demoraram menos executando este comportamento do que os animais falso-operados tanto nas observações isoladas do 5º dia como também na forma de ganho. ( $p = 0,011$  e  $0,046$  respectivamente). Ver figura 33B e 33C.

Avaliando as observações do 5º dia de neuropatia, a dose de 240mg ( $884,20 \pm 47,14$  seg.) provocou um aumento (27,59%) significativo ( $p = 0,0109$ ) em relação ao grupo salina ( $692,95 \pm 51,99$  s.). As doses de 30mg ( $626,8 \pm 108,55$  s.), 60mg ( $686,1 \pm 69,24$ ), e 120mg ( $632,92 \pm 39,26$  s.) não provocaram alterações significativas entre elas ou em relação ao grupo salina neste comportamento ( $p > 0,05$ ). Ver figura 33A e 33B.

No entanto, considerando os valores em ganho, o grupo GBP 120mg ( $-215,54 \pm 53,27$  s.) provocou uma redução relevante em relação ao grupo salina ( $-33 \pm 56,23$  seg.). E as doses de 30 e 60mg demonstraram uma forte tendência à redução. Ver figura 33C.

Avaliando-se os efeitos da GBP em animais **intactos** a dose de 60mg ( $604,66 \pm 16,93$  seg.) apresentou uma redução (15,87%) significativa em relação ao grupo salina ( $718,75 \pm 23,15$ ;  $p = 0,0023$ ). E a dose de 120mg ( $646,58 \pm 23,23$  s.) provocou uma forte tendência à redução ( $p = 0,069$ ) em relação ao grupo salina. Ver figura 33D. Na forma de ganho os efeitos foram muito mais relevantes e significativos. As doses de 60mg ( $-144,20 \pm 22,52$  s.) e 120mg ( $-96,38 \pm 28,13$ ) provocaram redução de 702,04% e 469,23% respectivamente em relação ao grupo salina ( $20,54 \pm 23,78$  s.). Sugerindo que estas doses, independente da neuropatia, reduzem este comportamento. Ver figura 33E.



**Figura 33.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento *sniffing* (cheirando) em ratos com CCNC tratados ao longo de 5 dias. (N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo Sham N=20). Cut off = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo sham. Testes estatísticos: Kolmogorov – Smirnov, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Resultados expressos das observações antes da CCNC, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC. **Painel B:** Resultados expressos somente do 5º dia. **Painel C:** Resultados expressos em ganho (médias das observações do 5º dia - antes da CCNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg.) em ratos intactos (N=12) no tempo do comportamento *sniffing*. Médias expressas no 5º dia. **Painel E:** mesmo estudo com os resultados expressos na forma de ganho.

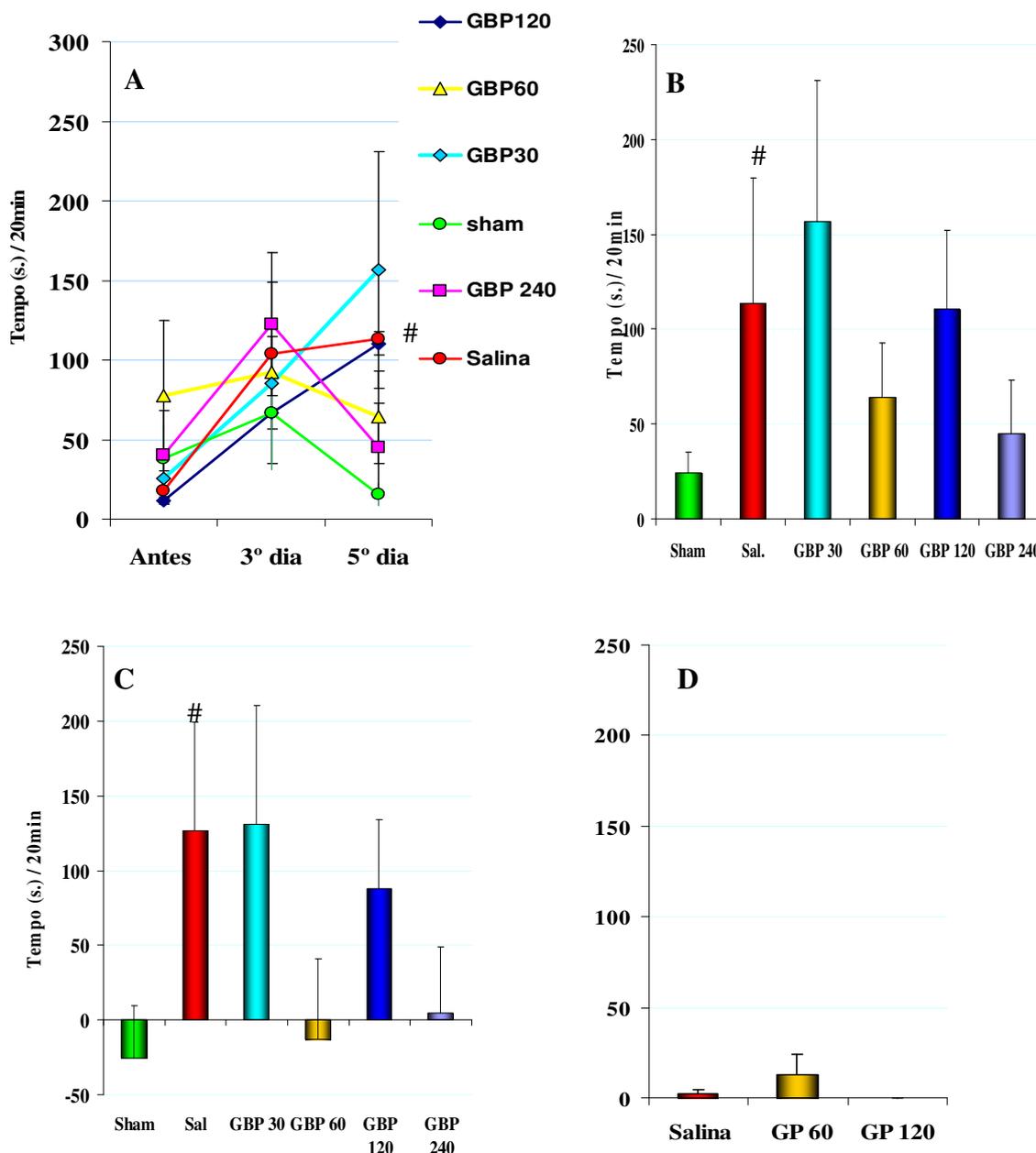
### 3.1.9. Efeito da GBP no comportamento *rest-sleeping* (descansar ou dormir):

Neste comportamento ocorre uma imobilidade total do animal. Pois ele não movimenta nenhuma parte do corpo. Ele apenas descansa ou dorme, sendo este último mais raro ao longo destes cinco dias, considerando-se que são animais jovens com alto nível de curiosidade.

No final do tratamento (no 5º dia), o grupo salina ( $137,9 \pm 66,4$  s.) foi significativamente ( $p < 0,5$ ) diferente em relação ao grupo *sham* ( $23,9 \pm 11,1$  s.), como também na forma de ganho, entre o grupo salina ( $126,81 \pm 72,24$  s.) e o grupo *sham* ( $-25,74 \pm 35,10$  s.) ocorreu grande diferença. Sugerindo que a condição da neuropatia provoca inércia nos animais. Ver figura 34A, 34B e 34C

Ainda analisando isoladamente as observações do 5º dia, as doses de 30mg ( $156,6 \pm 74,3$  s.), 60mg ( $64,0 \pm 28,8$ ), 120mg ( $110,4 \pm 41,7$  s.) e 240mg ( $49,9 \pm 24,4$  s.) não provocaram alterações significantes ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo salina ( $137,9 \pm 66,4$  s.). Ver figura 34B. Como também na forma de ganho, essas doses de 30mg ( $131,27 \pm 79,47$  s.), 60mg ( $-13,36 \pm 53,88$ ), 120mg ( $88,0 \pm 46,43$  s.) e 240mg ( $6,5 \pm 30,45$  s.) não provocaram alterações significativas neste comportamento em relação ao grupo salina ( $126,81 \pm 72,24$  s.). Embora a dose de 60mg, como visto acima, demonstrou forte tendência em reduzir este comportamento. Ver figura 34C.

No estudo com os animais intactos que passaram pelo mesmo protocolo acima, com exceção da cirurgia, e foram tratados com GBP (60 e 120mg) e observados quanto ao comportamento *resting-sleeping*, pode-se observar que as doses de 60mg ( $13,08 \pm 11,33$  s.) e de 120mg ( $0,00 \pm 0,00$  s.) não apresentaram alteração significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo salina ( $2,50 \pm 2,17$  s.). Ver figura 34D. Da mesma forma nos resultados expressos em ganho (dados não explícitos). Indicando que este comportamento de descansar ou dormir é muito raro em animais normais, ou que a GBP por si só não induz este comportamento.



**Figura 34.** Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento *rest-sleeping* (descansando ou dormindo) em ratos com CCNC tratados ao longo de 5 dias. (N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo *Sham* N=20). *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Resultados expressos das observações antes da CCNC, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC. **Painel B:** Observações do 5º dia. **Painel C:** Resultados expressos em ganho (médias das observações do 5º dia - antes da CCNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg.) em ratos *intactos* (N=12) no tempo do comportamento *rest-sleeping*. Observações do 5º dia.

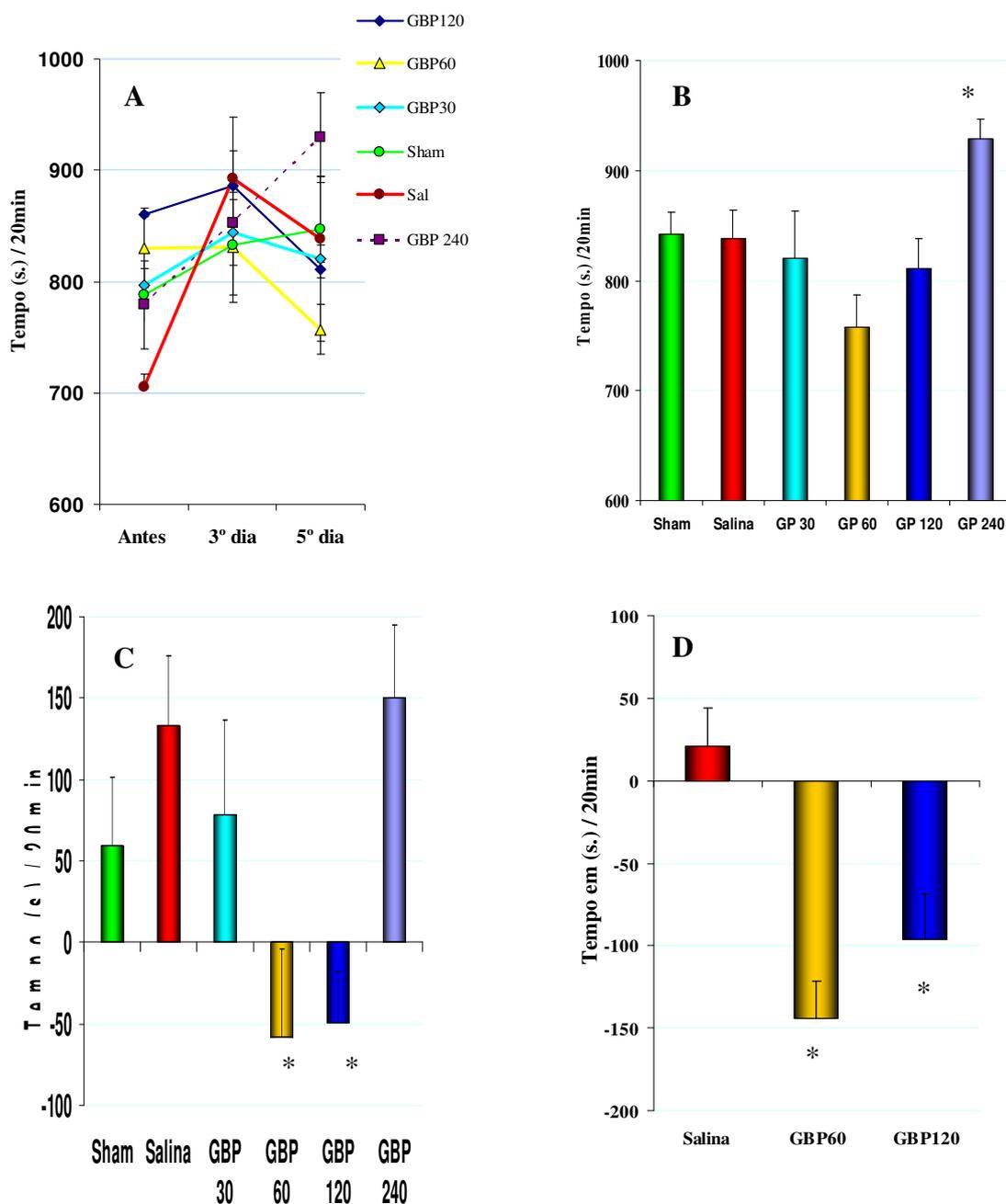
### 3.1.10. Efeito da GBP no comportamento imobilidade (*sniffing + rest-sleeping*):

No final do tratamento (no 5º dia), o grupo salina ( $838,0 \pm 25,9$  s.) não foi significativamente ( $p > 0,5$ ) diferente do grupo *sham* ( $842,0 \pm 20,0$  s.). Na forma de ganho o grupo salina ( $132,87 \pm 43,32$  s.) foi superior ao grupo *sham* ( $59,05 \pm 42,48$ ), embora não significativo. Ver figura 35B e C.

Ainda analisando as observações do 5º dia, a dose de 60mg ( $757,2 \pm 29,4$ ) provocou uma tendência à redução (9,64%) ( $p = 0,064$ ) e a dose de 240 ( $929,4 \pm 17,0$ ) provocou um aumento significativo ( $p=0,0090$ ) em relação ao grupo salina ( $838,0 \pm 25,9$  s.). A partir da dose de 120mg tivemos um aumento dose-dependente do comportamento imobilidade, como se pode ver na figura 35B e C.

Considerando os resultados na forma de ganho, as doses de 60mg ( $-72,95 \pm 43,91$  s.) e 120mg ( $-49,53 \pm 31,93$  seg.) provocaram reduções (154,90% e 137,27%) significativas ( $p = 0,0027$  e  $p= 0,0044$ ) neste comportamento em relação ao grupo salina ( $132,87 \pm 43,32$  seg.). As doses de 30mg e 240mg não provocaram alterações significativas ( $p>0,05$ ) na forma de ganho, embora a dose de 240mg ( $150,00 \pm 44,83$ seg.) pareceu produzir um aumento em relação ao grupo salina. Ver figura 35C.

Avaliando-se os efeitos da GBP (60 e 120mg) em animais **intactos** e na forma de ganho, os efeitos foram relevantes e significativos. As doses de 60mg ( $-142,03 \pm 22,52$  s.) e 120mg ( $-100,79 \pm 28,13$ ) provocaram redução muito significativa em relação ao grupo salina ( $6,38 \pm 23,78$  s.). Sugerindo que estas doses, independente da neuropatia, reduzem este comportamento. Ver figura 35D.



**Figura 35.** Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento de imobilidade em ratos com CCNC tratados ao longo de 5 dias. (N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo Sham N=20). *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo sham. Testes estatísticos: Kolmogorov – Smirnov, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Resultados das observações antes, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC. **Painel B:** Observações do 5º dia. **Painel C:** Os resultados se apresentam em delta (diferença entre as médias das observações do 5º dia e antes da CCNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg.) em ratos *intactos* (N=12) no tempo do comportamento imobilidade. Resultados expressos na forma de ganho.

### 3.1.11. Efeito da GBP no comportamento comendo ou roendo (*eating-gnawing*):

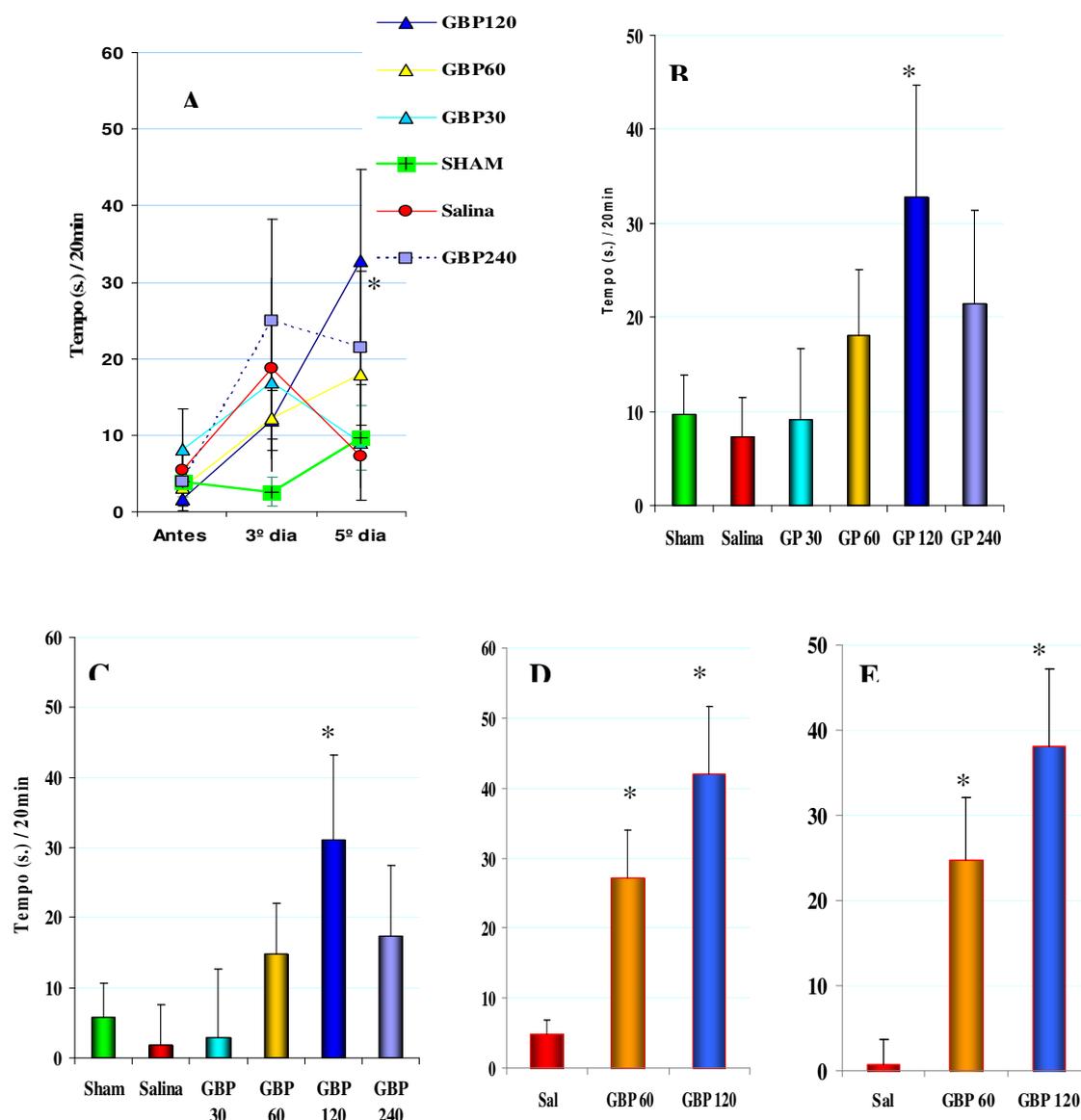
Neste comportamento os animais se encontram comendo ração (que era colocada sobre a cama) ou roendo as raspas, o que, às vezes, era difícil de discernir a raspa da ração.

No final do tratamento (no 5º dia), o grupo salina ( $7,27 \pm 4,15$  s.) não foi significativamente ( $p > 0,5$ ) diferente em relação ao grupo *sham* ( $9,65 \pm 4,21$ s.). Como também na forma de ganho, o grupo salina ( $1,85 \pm 5,77$ ) não foi estatisticamente diferente do grupo *sham* ( $5,70 \pm 4,97$ ) apesar da pequena e aparente redução provocada pelo grupo neuropático salina. Sugerindo que a condição da neuropatia não provoca alterações neste comportamento. Ver figura 36 A e B.

Ainda analisando as observações do 5º dia de neuropatia, a dose de 120mg ( $32,82 \pm 11,85$  seg.) provocou um aumento (351,44%) significativo ( $p = 0,046$ ) em relação ao grupo salina ( $7,27 \pm 4,15$  seg.). No entanto, as doses de 30mg ( $9,13 \pm 7,57$  seg.), 60mg ( $18,00 \pm 7,05$ ), e 240mg ( $21,40 \pm 10,5$  seg.) não provocaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo salina ( $7,27 \pm 4,15$  seg.). Ver figura 36B.

Na forma de ganho, também a dose de 120mg ( $31,12 \pm 12,07$  seg.) provocou um aumento (1582,16%) significativo ( $p = 0,030$ ) em relação ao grupo salina ( $1,85 \pm 5,77$  seg.). No entanto as doses de 30mg ( $2,88 \pm 9,78$  seg.), 60mg ( $14,77 \pm 7,25$ ), e 240mg ( $17,40 \pm 10,2$  seg.) não provocaram alterações significativas neste comportamento em relação ao grupo salina, apesar dos aparentes aumentos provocados pelas doses de 60 e 240mg. Veja figura 36C.

No estudo com os animais **intactos**, as observações no último dia de tratamento (5º dia) demonstraram que as doses de 60mg ( $27,08 \pm 6,98$  s.) e de 120mg ( $42,00 \pm 9,67$  s.) apresentaram aumentos significativos ( $p = 0,014$  e  $p = 0,0035$ ) em relação ao grupo salina ( $4,83 \pm 1,96$ ). Ver figura 36D. E os resultados destas doses na forma de ganho foram muito semelhantes, com diferenças mais significativas, confirmando os efeitos. Ver figura 36E.



**Figura 36.** Efeito da GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no tempo (s.) do comportamento *Eating-Gnawing*. (comendo ou roendo) em ratos com CCNC. (N = 10, 14, 13, 5, respectivamente, grupo salina N=21 e grupo *Sham* N=20). *Cut off* = 20min. Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As observações ocorreram antes da CCNC (e antes da 1ª aplicação de GBP) e 80 min após a última aplicação da GBP no 3º dia e 5º dia. As linhas ou barras representam as médias dos tempos de duração do comportamento + EPM (Erro Padrão da Média). \* p < 0,05 em relação ao grupo salina e # p < 0,05 em relação ao grupo *sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Resultados das observações antes, no 3º dia e no 5º dia após a CCNC. **Painel B:** Observações do 5º dia. **Painel C:** Os resultados se apresentam em delta (diferença entre as médias das observações do 5º dia e antes da CCNC). **Painel D:** Efeito da GBP (60, 120mg/kg.) em ratos *intactos* (N=12) no tempo do comportamento *Eating-Gnawing*. Resultados do 5º dia. **Painel E** Resultados na forma de ganho.

### **3.1.13. Efeito da GBP no comportamento *Freezing* (congelar-se):**

Neste comportamento, todos os grupos ao longo dos cinco dias expressaram valores semelhantes a zero, sem alterações significativas entre os grupos dignas de menção (dados não explícitos). Sugerindo que nem a droga, nem a condição da neuropatia causaram aumento de irritabilidade, excitabilidade do sistema nervoso ou medo. Este comportamento não foi incluído na imobilidade (somente o *sniffing* + *rest-sleeping*) visto que os tempos eram semelhantes a zero e não iriam alterar ou interferir nestes resultados.

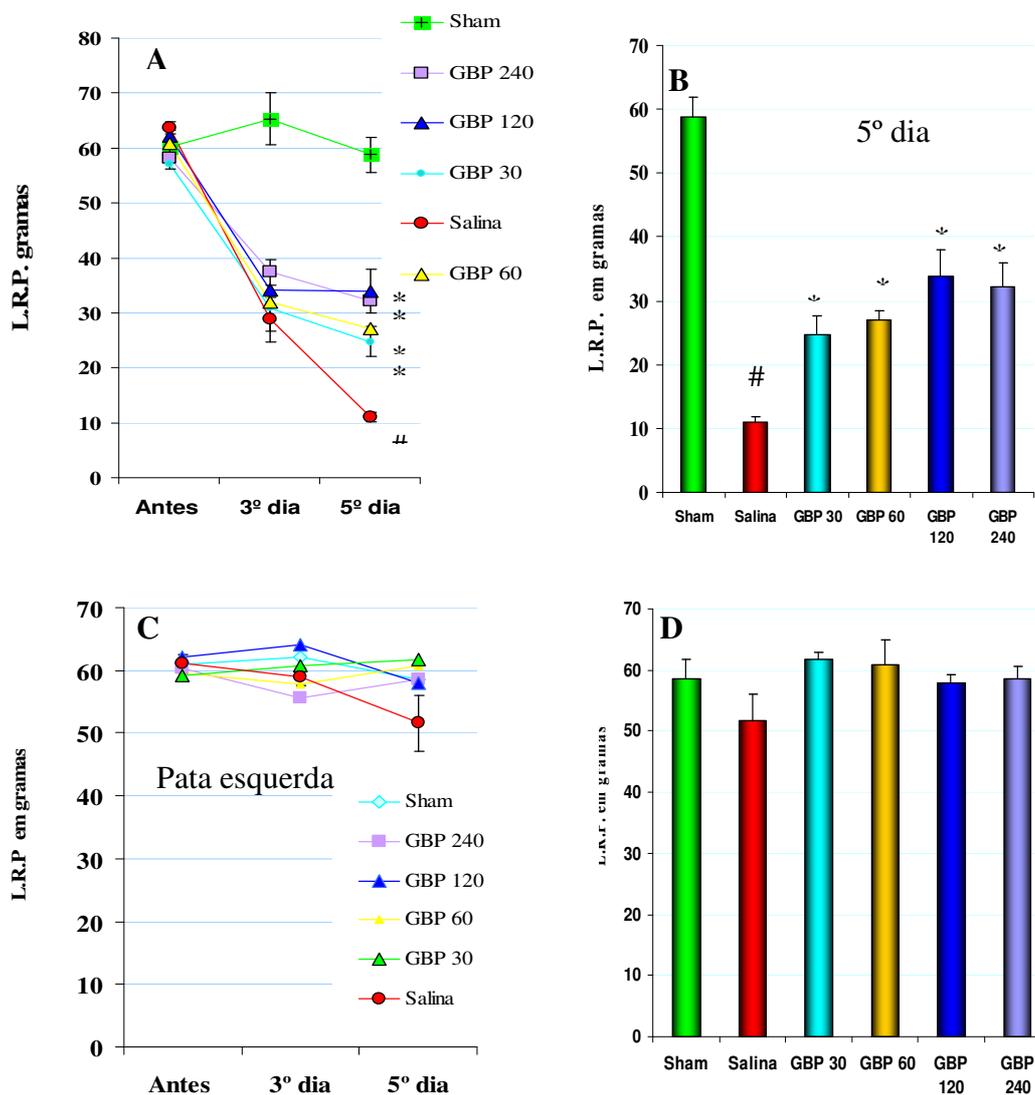
## 3.2. Efeitos da GBP nos comportamentos de dor induzida:

### 3.2.1. Efeitos da GBP na sensibilidade mecânica (*von Frey*):

O limiar de retirada da pata (LRP) (em gramas) do grupo salina ( $10,97 \pm 0,87$ g) induzido por pressão exercida sobre a região plantar da pata direita (operada) foi significativamente inferior ao grupo *Sham* ( $58,74 \pm 3,12$  g). Isto caracteriza a presença de alodínia mecânica nos animais com CCNC tratados com salina e desta forma sugerindo-se a presença de neuropatia nestes animais. Ver figura 37 A e B

No quinto dia de tratamento, todas as doses de GBP provocaram aumentos significantes no LR da pata direita em relação ao grupo salina. As doses de 30, 60, 120 e 240mg/kg provocaram efeitos de valores semelhantes, de forma não dose-dependente, sendo que, no quinto dia, o efeito máximo de  $33,93 \pm 4,01$ g foi obtido pela dose de 120mg/kg, a qual provocou uma recuperação do LRP de 57,76% em relação ao grupo *sham* ( $58,74 \pm 3,12$  g.) e significativamente ( $p = 4,36 \times 10^{-9}$ ) diferente em relação ao grupo salina ( $10,98 \pm 0,88$  g.). A dose de 60mg/kg teve o LRP em torno de  $27,0 \pm 1,45$ g e provocou recuperação de 45,96% do LRP em relação ao grupo *sham* e significativamente ( $p = 1,8 \times 10^{-7}$ ) diferente quando comparada ao grupo com CCNC tratado com salina. Apresentando uma analgesia significativa em relação a este grupo. Ver figura 37A e B.

Os efeitos da GBP na pata esquerda não foram significativamente diferentes entre os grupos. E todos os grupos (doses) tiveram valores próximos ao grupo *sham*. Indicando que a neuropatia não se manifestou sistemicamente e que a GBP não teve efeito na pata contralateral, o que seria um efeito na atividade motora, ou seja, não ocorreu efeito sedativo da GBP. No entanto o grupo salina ( $51,59 \pm 4,41$ g) apresentou um LRP um pouco menor em relação ao *sham* ( $58,60 \pm 3,16$ g) o que poderia indicar uma manifestação de dor na pata contralateral (fenômeno da “dor em espelho”), mas não se pode afirmar isto já que esta diferença não foi significativa estatisticamente. Ver figura 37 C e D.



**Figura 37.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na sensibilidade mecânica (*von Frey*). (N= 10, 9, 13, 5, respectivamente e grupo *Sham* N=14 e grupo salina N=10). Tratamento com a GBP de 12 em 12h. As patas dos animais sofriam uma pressão direcionada na superfície plantar com o aparelho (*von Frey*) que registrava a pressão no momento da retirada da pata com uma manifestação de dor (*flick*). As medições do LRP em grammas foram realizadas antes da CCNC (e antes do início do tratamento), no 3º dia e 5º dia 80 min após aplicação da GBP. As linhas representam as médias (grammas) de cada grupo + EPM (Erro Padrão da Média). Significativo quando \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo *Sham*. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Limiar de retirada da pata (LRP) **direita** no tempo zero, no 3º e 5º dia. **Painel B:** Resultados isolados do 5º dia, pata direita. **Painel C:** LRP **esquerda** no tempo zero, no 3º e 5º dia. **Painel D:** Somente resultados do 5º dia, pata esquerda.

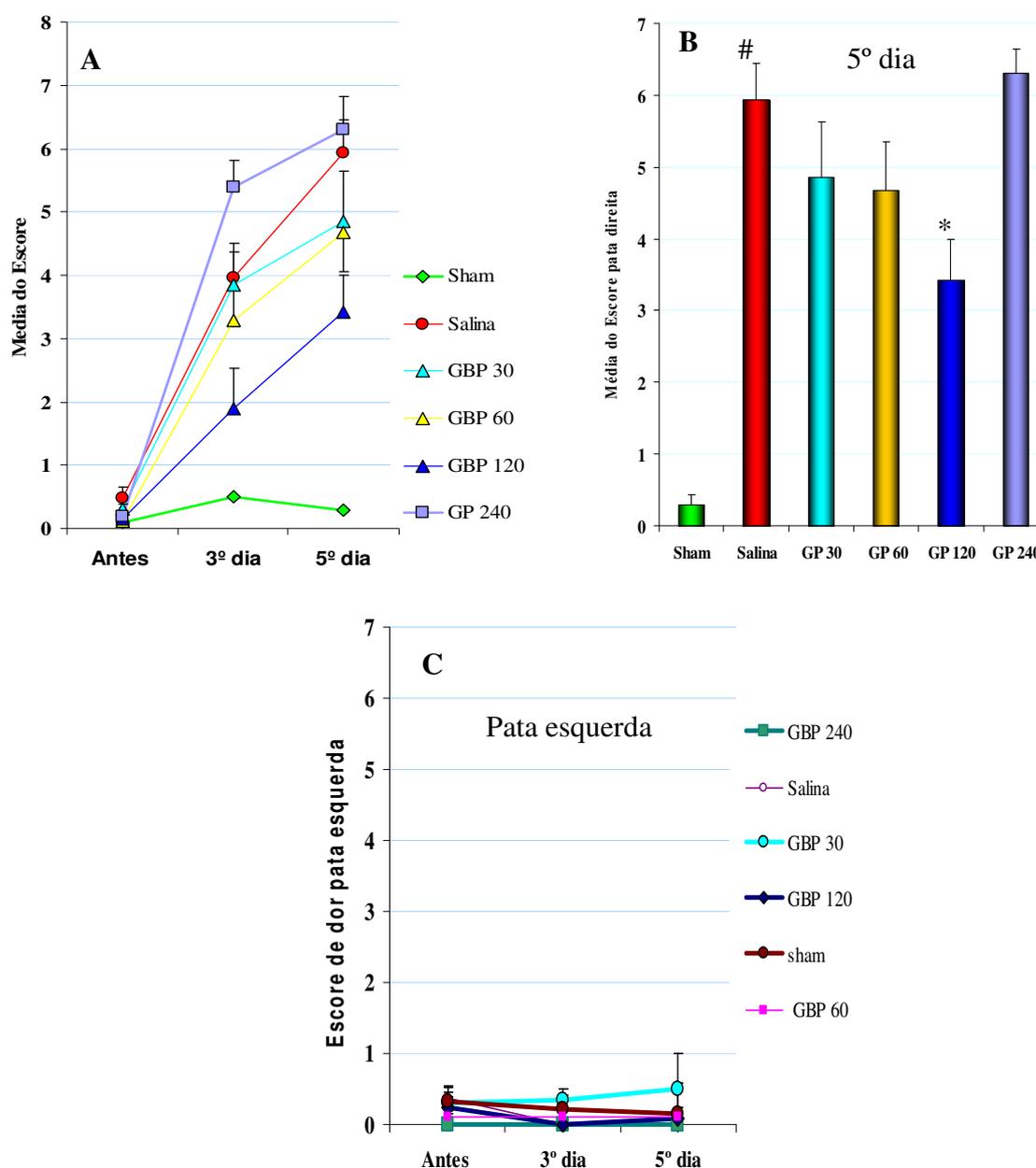
### 3.2.2. Efeitos da GBP na sensibilidade ao frio (10°C) (“*Teste da acetona*”):

O escore de dor do grupo salina ( $5,92 \pm 0,52$ ) foi significativamente maior ao do grupo *sham* ( $0,29 \pm 0,14$ ). Isto caracteriza a presença de alodínia térmica ao frio nos animais com CCNC tratados com salina e desta forma sugerindo-se a presença de neuropatia nestes animais. Ver figura 38A e B.

A dose de GBP 120mg, considerando o 5º dia, provocou redução da dor em  $42,26 \pm 9,65\%$  (escore =  $3,42 \pm 0,57$ ) em relação ao grupo neuropático tratado com salina (escore =  $5,92 \pm 0,52$ ), sendo significativamente diferente deste grupo ( $p = 0,0038$ ). As doses (grupos) de 30 e 60 apresentaram diminuição nos escores de dor, (escore =  $4,85 \pm 0,78$  e  $4,66 \pm 0,68$  respectivamente) mas não foi significativo ( $p > 0,05$ ). Veja figura 38A e B.

No terceiro e quinto dia de tratamento pós-CCNC a dose de 240mg provocou um aumento aparente ( $p=0,14$  e  $p=0,55$ ) no escore de dor ( $5,4 \pm 0,87$  e  $6,3 \pm 0,34$  resp.) em comparação ao grupo neuropático salina ( $3,95 \pm 0,41$  e  $5,92 \pm 0,52$  resp.). De maneira oposta às outras doses, esta dose elevada não causou nenhum efeito analgésico e ainda pareceu ter aumentado a sensibilidade dos animais ao frio. Ver figura 38A e B.

Na pata esquerda não ocorreu diferenças significativas entre as doses. Todos os grupos apresentaram escore próximo à zero. Ver figura 38C.



**Figura 38.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) no teste de sensibilidade ao frio, 10°C (“teste da acetona”): (N= 10, 9, 13, 5, respectivamente e grupo sham N=14 e grupo salina N=10). Tratamento com a GBP de 12 em 12h. A quantificação do comportamento foi feita através de *escore*: 0: Nenhum comportamento, 1: Retirada rápida da pata ou *flick*, 2: *flick* demorado, 3: *Flick + Licking*. *Cut Off*: 20 seg + 20 seg. Os testes foram realizados antes da CCNC (e antes do início do tratamento), no 3º dia e no 5º dia 80 min após aplicação da GBP. As linhas ou barras representam as médias dos escores + EPM (Erro Padrão da Média). Significativo quando \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham. Testes estatísticos: Kolmogorov – Smirnov, Anova e pós-teste de Turkey.

**Painel A:** Escores da pata **direita** no tempo zero, no 3º e 5º dia. **Painel B:** Resultados isolados do 5º dia. **Painel C:** Escores da pata **esquerda** no tempo zero, no 3º e 5º dia.

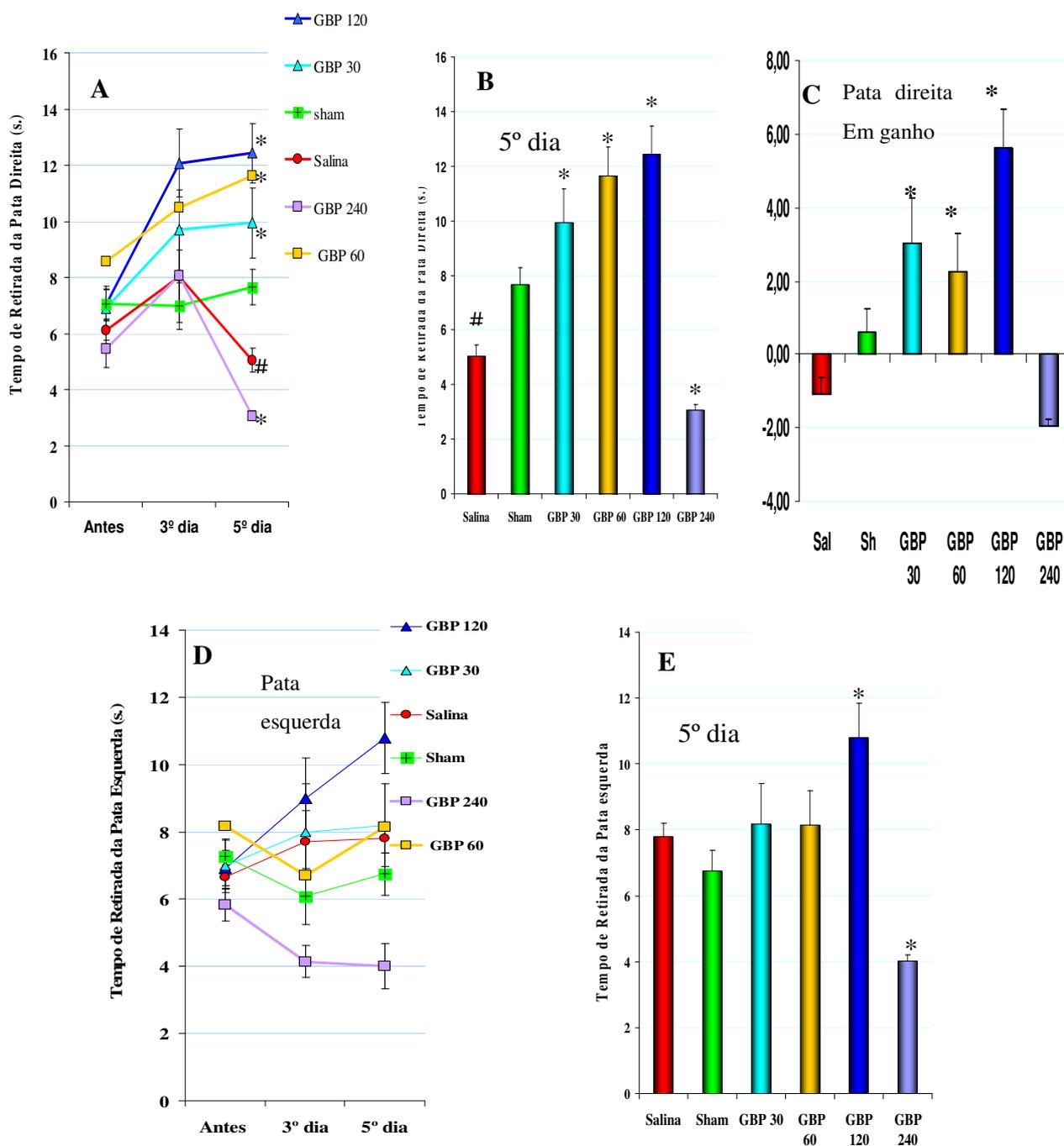
### 3.2.3. Efeito da GBP na sensibilidade ao calor (46°C) (hiperalgesia térmica).

O tempo (ou latência) de retirada da pata (TRP) direita observado no 5º dia do grupo salina ( $5,05 \pm 0,14$  segundos) foi significativamente ( $p= 0,005$ ) inferior ao do grupo *sham* ( $7,66 \pm 0,63$  s.), mais uma vez comprovando a existência de neuropatia neste modelo de CCNC. Ver figura 39A e B.

No TRP direita no 5º dia de tratamento com GBP, a dose de 120mg/kg provocou maior aumento com 146,08% ( $12,42 \pm 1,04$  s.) em relação ao grupo neuropático tratado com salina ( $5,05 \pm 0,14$  s.) sendo significativamente diferente deste grupo ( $p = 5,48 \times 10^{-7}$ ). As doses de 30 e 60mg também aumentaram significativamente o TRP ( $9,94 \pm 1,22$  s. e  $11,64 \pm 1,06$  s. respect.) em relação ao grupo salina. O TRP das doses de GBP 60 e 120mg foram também superiores ao TRP do grupo *sham* ( $7,66 \pm 0,63$  s.), o que significa que estas doses podem ter diminuído a sensibilidade ao calor provocando uma sensibilidade inferior à observada nos animais normais, talvez próximo a um efeito anestésico. Ver figura 39A e B. Na forma de ganho os resultados foram semelhantes (ver figura 39C).

Por outro lado, surpreendentemente, a dose de 240mg provocou em relação ao grupo salina uma redução (aumento de sensibilidade) no TRP de 39,10% ( $3,06 \pm 0,18$  s.) em relação ao grupo salina ( $5,05 \pm 0,14$  s.) ( $p=0,0054$ ). Na pata esquerda esta dose de 240mg provocou uma redução de 48,62% ( $4,01 \pm 0,68$ ) em relação ao grupo salina ( $7,8 \pm 0,72$  s.) no TRP ( $p=0,0054$ ). Ver figura 39 D e E.

Na pata esquerda (pseudo-operada) a dose de 120mg/kg provocou aumento de 38,34% ( $10,79 \pm 1,71$ s.) em relação ao grupo salina ( $7,8 \pm 0,72$  s.) no TRP ( $p=0,052$ ). Ver figura 39. Sugerindo-nos, neste teste de hiperalgesia ao calor, mais uma vez, um efeito anestésico desta dose. Contudo, nas doses de 30mg e 60mg os valores do TRP ( $8,19 \pm 1,26$  s. e  $8,14 \pm 1,04$  s. respect.) estão semelhantes ao do grupo salina ( $7,8 \pm 0,72$  s.) nesta mesma pata. Ver figura 39D e E.



**Figura 39.** Efeito do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP (30, 60, 120, 240mg/kg., via oral) na hiperalgesia térmica (sensibilidade ao calor, 46°C) (N=10, 10, 9, 14, 5, respectivamente e grupo sham com N=18 e grupo salina com N=10): Foi medido o tempo de permanência da pata mergulhada na água (46°C) até sua retirada (Latência ou tempo de retirada da pata - TRP). *Cut off*: 15 seg. As medições do TRP em segundos foram realizadas antes da CCNC (e antes do início do tratamento), e no 3º dia e 5º dia após a CCNC ocorreram 80 min após a aplicação da GBP. As linhas ou barras representam as médias dos tempos (TRP em segundos) + EPM (Erro Padrão da Média). Significativo quando \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina, e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo sham. Testes estatísticos: *Kolmogorov – Smirnov*, Anova e pós-teste de Turkey.

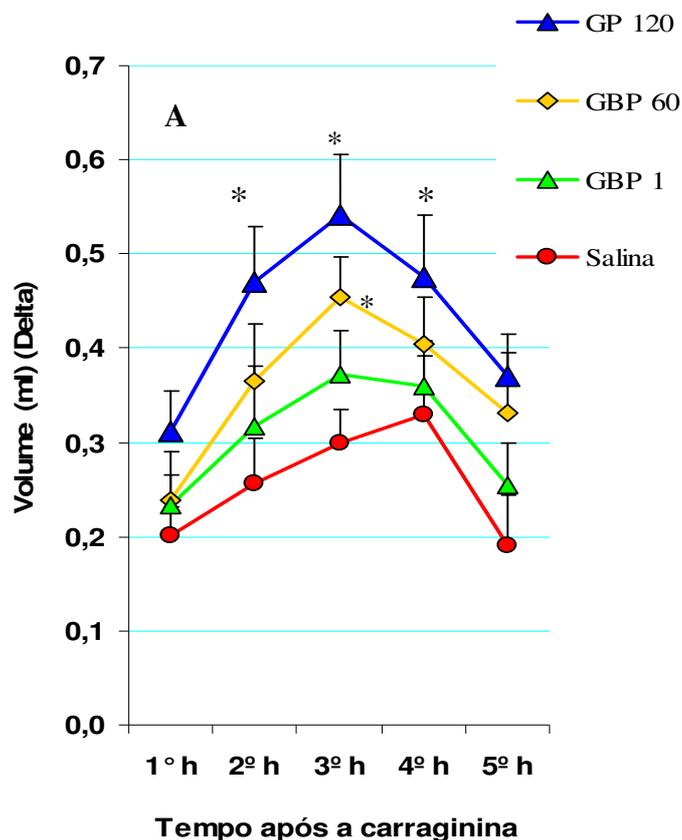
**Painel A:** Tempo de retirada da pata (TRP) direita no tempo zero, no 3º e 5º dia. **Painel B:** Resultados isolados do 5º dia, pata direita. **Painel C:** Resultados em delta (5º dia – antes da CCNC) **Painel D:** TRP esquerda no tempo zero, no 3º e 5º dia. **Painel E:** Resultados isolados do 5º dia, pata esquerda.

### **3.3. Estudo Inflamatório:**

#### **3.3.1. Efeitos do tratamento ao longo de cinco dias com a GBP no edema de pata induzido por carragenina:**

Para verificar os efeitos da GBP (1, 60 e 120mg) na inflamação, animais normais foram tratados via oral de 12 em 12 horas durante 5 dias e no 5º dia foi realizada a indução do edema de pata aplicando-se carragenina (100 µg, intraplantar).

As doses de 60 e 120mg provocaram aumentos (53% e 87%) dose-dependentes significativos no edema na 3ª hora ( $0,46 \pm 0,04$  ml;  $0,56 \pm 0,06$  ml) em relação ao grupo salina ( $0,30 \pm 0,03$  ml). A dose de 120 também provocou aumentos significativos na 2ª e 4ª hora. Ver figura 40A



**Figura 40. Efeito do tratamento crônico da GBP (1, 60, 120mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina em ratos sem CCNC (Normais).** Os animais foram tratados com GBP de 12 em 12 horas durante 5 dias. No último dia (5º dia) a aplicação da carragenina (100 µg, intraplantar) ocorreu 80 min após a última aplicação da GBP. Os volumes das patas ipsolaterais foram obtidos na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª hora após a aplicação da carragenina. As Linhas representam as médias do delta (volume em ml da pata no tempo da 1ª, 2ª, 3ª, 4ª ou 5ª hora – volume da pata no tempo zero) + EPM (Erro Padrão da Média). \* Significativo quando  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina. Testes estatísticos: Anova e pós-teste de Turkey.

### **3.3.2. Efeito da GBP na migração de células para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg, 300µg i.p.)**

Neste estudo a injeção de Cg (300µg, i.p.) foi realizada no 5º dia de tratamento com GBP (de 12 em 12 horas), 80 minutos após a última aplicação v.o. de GBP. E a coleta do fluido peritoneal, onde as células foram contadas, ocorreu 4 horas após a aplicação de carragenina (ver metodologia).

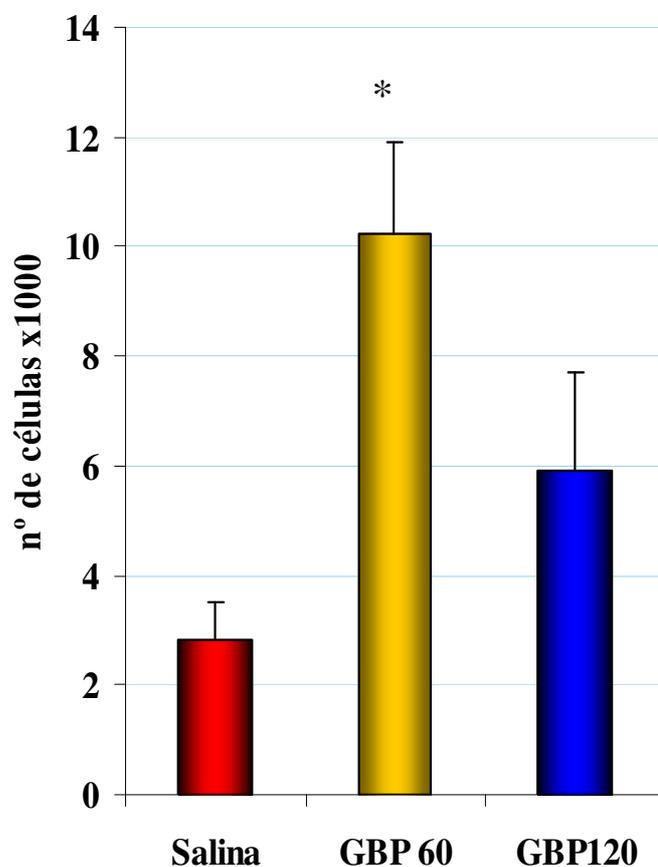
A dose de 60mg ( $10,25 \pm 1,63 \times 10^{-3}$  cels) provocou um aumento de 262,19% na migração de células em relação ao grupo salina ( $2,83 \pm 0,68 \times 10^{-3}$  cels) . Enquanto que a dose de 120 ( $5,93 \pm 1,7 \times 10^{-3}$  cel.) provocou um aumento não significativo de 109,54% em relação ao grupo salina. Ver figura 42.

### **3.3.3. Contagem diferencial no experimento de migração de células para cavidade peritoneal induzida por carragenina (300µg):**

Em cada lâmina (de cada animal) foram identificadas cem (100) células. De acordo esta contagem, a média da porcentagem de neutrófilos em relação aos outros tipos de células foi de 90,40% no grupo salina (total de  $6.931 \pm 3.016,12$  neutrófilos), 91,17% no grupo GBP60 ( $8.313,00 \pm 1.946,30$  neutrófilos) e 86,17% no grupo GBP 120 ( $5336,46 \pm 1684,13$  neutrófilos). Ver figura 42. Como se pode verificar, em termos de porcentagem de neutrófilos, não houve diferenças significativas entre os grupos, sendo esta proporção em torno de 86 a 91%.

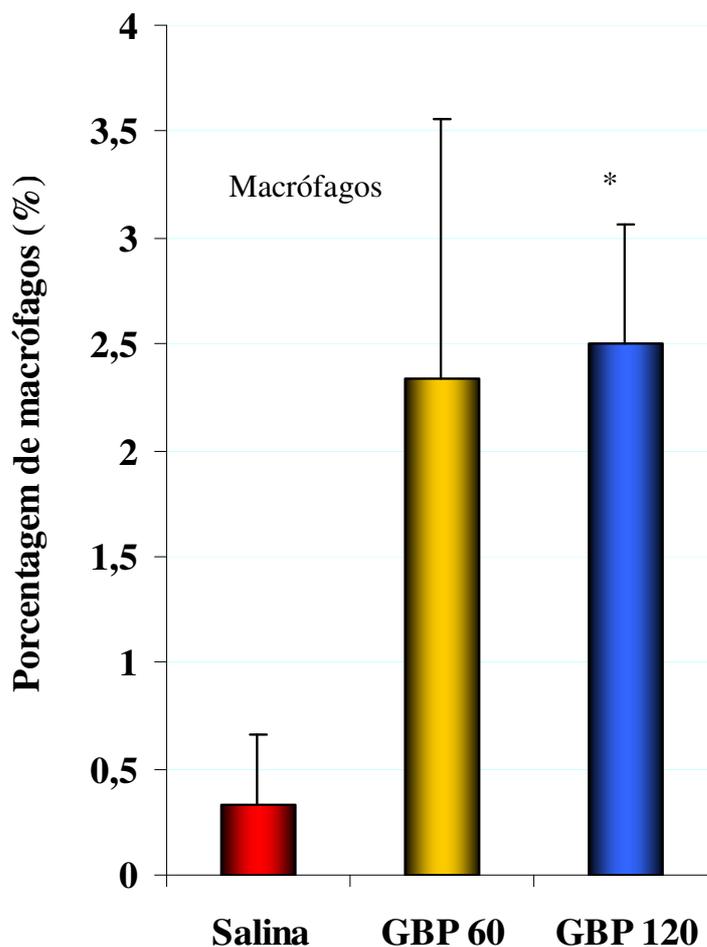
Com relação à porcentagem de monócitos, as doses de 60 e 120mg tiveram valores de  $1,84 \pm 0,83\%$  ( $107,08 \pm 56,86$  monócitos) e  $5,0 \pm 1,46\%$  ( $188,08 \pm 35,96$  monócitos) respectivamente, sendo que a porcentagem desta última dose foi aparentemente superior a porcentagem do grupo salina ( $2 \pm 1,38\%$ , total de 56,6 monócitos). Ver figura 42 B.

Com relação à porcentagem de macrófagos, as doses de 60 e 120mg tiveram valores de  $2,33 \pm 1,22\%$  (238,82 macrófagos) e  $2,5 \pm 0,56 \%$  (148,25 macrófagos) respectivamente. Ambas as doses apresentaram porcentagem superior a do grupo salina ( $0,33 \pm 0,33\%$ , total de 9,34 macrófagos). Sendo que a dose de 120 foi significativamente diferente ( $p = 0,01$ ) do grupo salina, pois apresentou menor desvio que a dose de 60mg. Ver figura 42 C. Com relação aos demais tipos de células não ocorreram diferenças significativas no percentual entre os grupos.



**Figura 41. Efeito da GBP na migração de células para cavidade peritoneal induzida por carragenina (300 $\mu$ g. i.p.) .**

Os animais normais foram tratados com a GBP ou Salina (NaCl 9%) durante 5 dias, de 12 em 12 horas. No 5º dia, 80 minutos após a última aplicação via gavagem de GBP (60 e 120mg/kg.p.v) foi aplicada a Cg (300 $\mu$ g, i.p.) e quatro horas após a Cg foi coletado o fluido peritoneal para contagem de células na câmara de *Neubauer*. As barras representam a média do número de Células x1000  $\pm$  EPM. \* significativo quando  $p < 0,05$  (Teste de ANOVA e Turkey).



**Figura 42. Efeito da GBP na contagem diferencial da migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg) .**

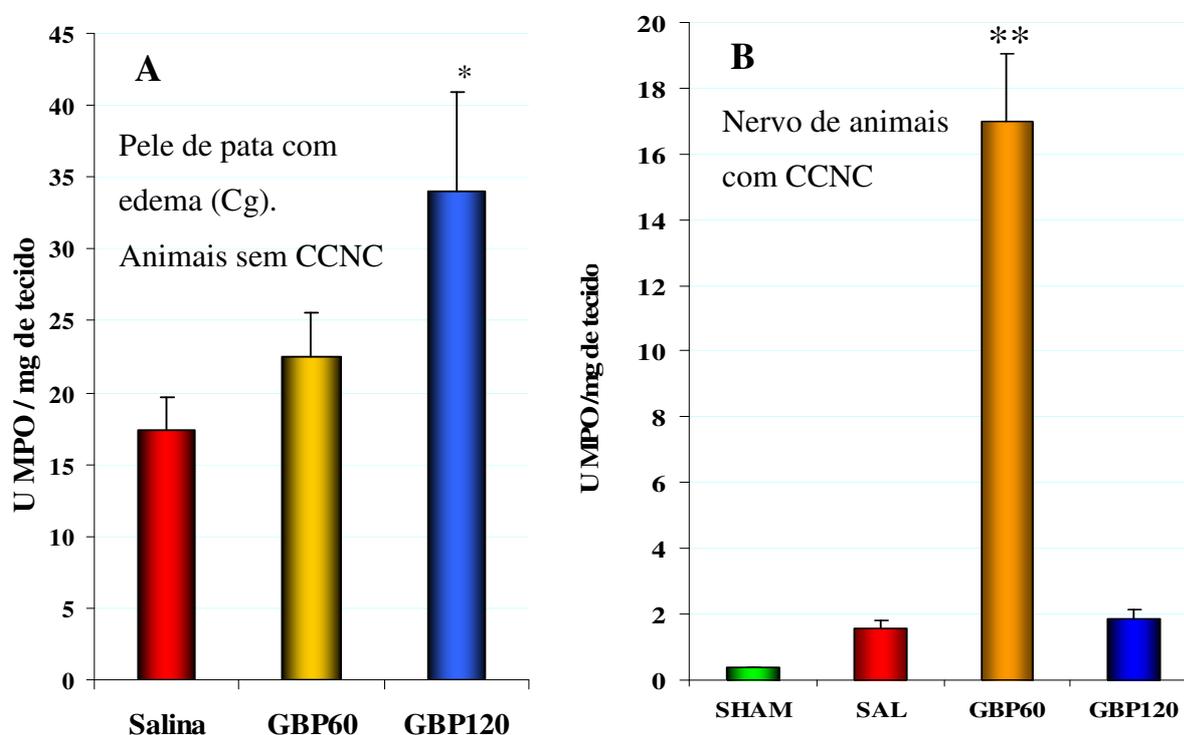
Os animais normais foram tratados com a GBP ou Salina (NaCl 9%) durante 5 dias, de 12 em 12 horas. No 5º dia, 80 minutos após a última aplicação via gavagem de GBP (60 e 120mg/kg.p.v) foi aplicada a Cg (300µg, i.p.) e quatro horas após a Cg foi coletado o fluido peritoneal e colocado em microcentrifuga para confecção de laminais onde eram identificadas 100 células através de microscopia óptica. As barras representam a média da porcentagem de macrófago  $\pm$  EPM. Significativo quando \*  $p < 0,05$  (Teste de ANOVA e Turkey).

#### **3.4.4. Atividade da mieloperoxidase (MPO) em pele de pata com edema induzido por carragenina intraplantar e pré-tratados com GBP durante cinco dias. Em ratos sem CCNC.**

Após o experimento de edema de pata induzido por Cg, no quinto dia de tratamento com a GBP, as peles das patas foram coletadas e a atividade da MPO foi quantificada através de Elisa. As doses de 60 e 120mg ( $22,54 \pm 2,96$  e  $33,98 \pm 6,94$  unidade de MPO/mg de tecido) provocaram aumentos na atividade da MPO em relação ao grupo salina ( $17,33 \pm 2,34$  UMPO/mg de tecido) mas em virtude dos altos desvios estes aumentos não foram significativos (Anova-Turkey). No entanto verificando as diferenças das média no “*test t*”, o grupo GBP120 foi significativamente ( $p= 0,0489$ ) maior que o grupo salina. Ver figura 43 A.

#### **3.4.5. Atividade da MPO em nervo ciático de ratos com CCNC pré-tratados durante 5 dias com GBP**

A dose de 60mg ( $16,99 \pm 2,03$  UMPO/mg de tecido) provocou um aumento relevante e significativo ( $p<0,001$ ) de 982,16% na atividade da MPO em relação ao grupo salina ( $1,57 \pm 0,26$  UMPO/mg de tecido). A dose de 120mg ( $1,88 \pm 0,27$  neut/mg) e o grupo salina ( $1,577 \pm 0,26$  UMPO/mg de tecido) tiveram atividades semelhantes. Ver figura 43 B.

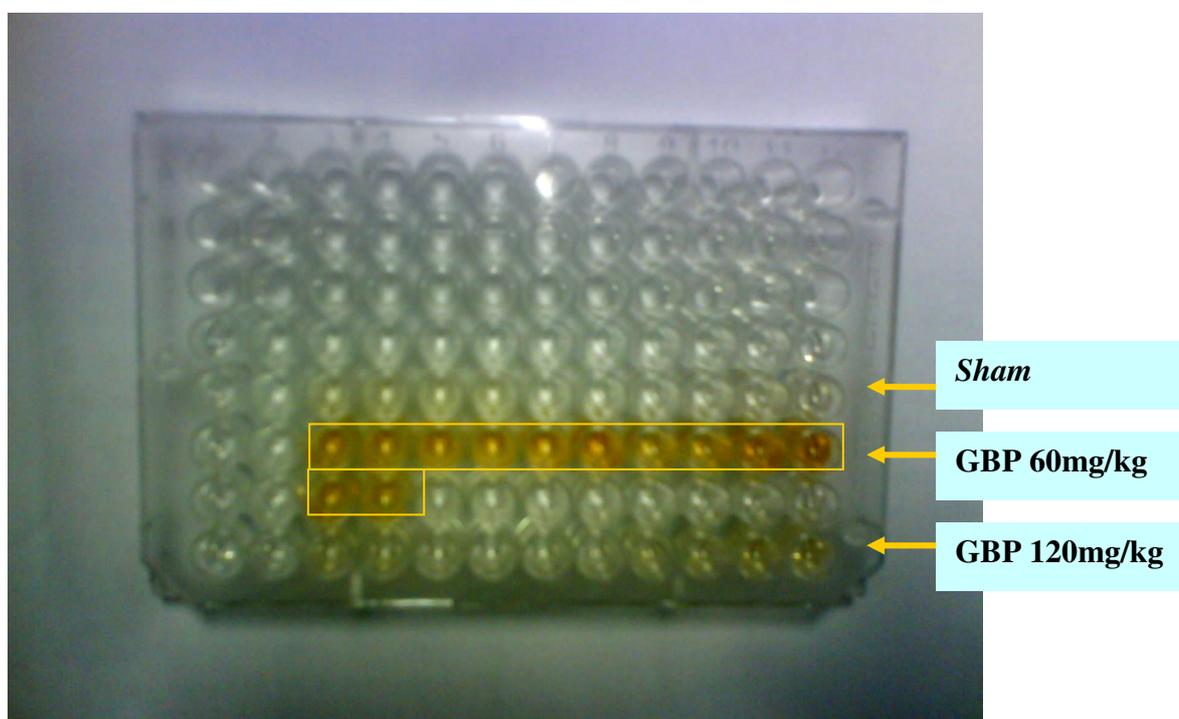


**Figura 43: Efeito do tratamento com a GBP (60 e 120mg/kg., via oral) na atividade da MPO.**

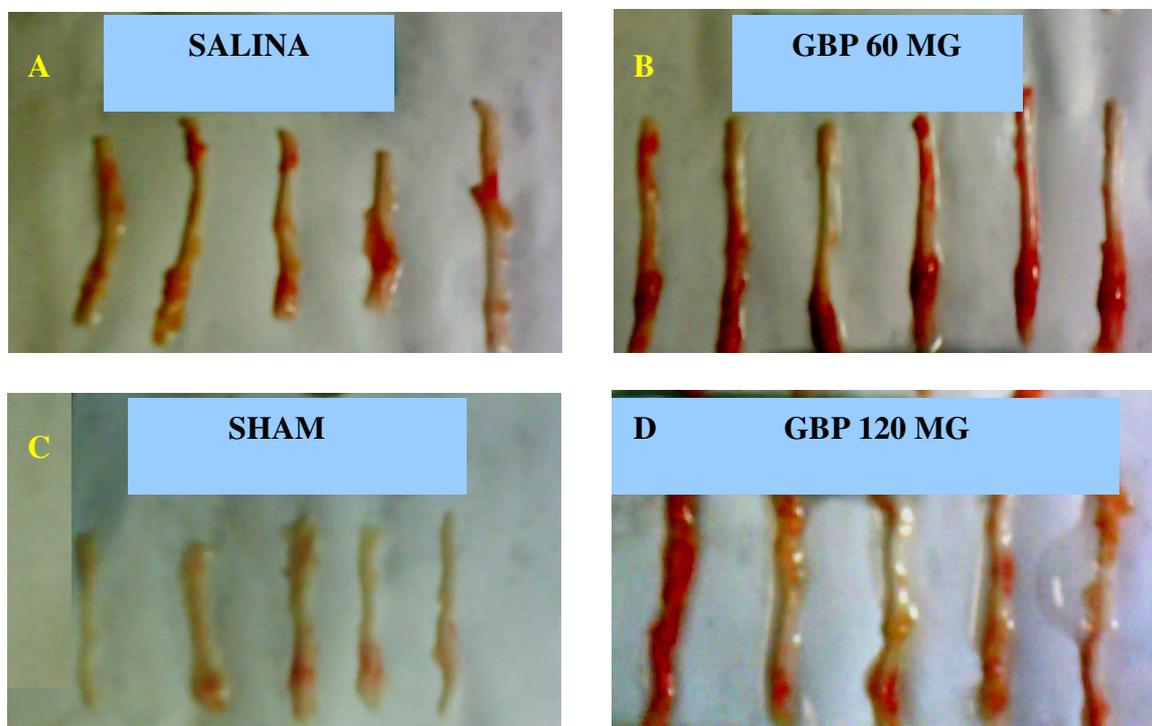
**Painel A:** Atividade da MPO em pele de pata de rato (sem CCNC) edematizada por Cg. (N=6)

**Painel B:** Atividade da MPO em nervo ciático de ratos com CCNC (sem aplicação de Cg). N=6. Mesmo protocolo anterior.

**Nota:** A injeção de Cg ocorreu no 5º dia, 80 min após a última aplicação de GBP ou salina (N=6). A atividade da MPO foi avaliada em amostras da pele da pata de ratos retiradas 5 horas após a injeção subplantar de carragenina (300 µg/pata), no 5º dia de tratamento continuado com a GBP. A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico. A variação da absorbância (Delta = Absorbância do tempo 1 min - Abs. do tempo zero) foi obtida, e expressa como UMPO/mg de tecido (atividade de MPO). As colunas representam a média ± EPM de UMPO/mg de tecido. Significativo quando \*\* p<0.001 e \*p <0,05 em relação ao grupo tratado com solução salina (0,9%). ANOVA/Turkey.



**Fig. 44: Placa de Elisa com 96 poços:** mostrando a coloração com 1 minuto de reação após a aplicação da solução de leitura.



**Figura 45. Fotografias de nervos ciáticos coletados após cinco dias da constrição crônica:**

**Painel A:** nervos de animais tratados com salina. **Painel B:** nervos de animais tratados com GBP 60mg. **Painel C:** Nervos de animais sem CCNC e não tratados. **Painel D:** Nervos de animais tratados com GBP 120mg/kg.

### **3.4.6. Efeito da GBP na expressão de TNF- $\alpha$ em nervo ciático sob constrição crônica tratado ao longo de cinco dias:**

A dose de 60 ( $324,25 \pm 50,75$  pg/mg) provocou um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) de 120,95 % na expressão de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo salina ( $146,75 \pm 10,28$ ) pg/mg). A dose de 120 ( $281,75 \pm 10,87$ ) também provocou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 91,99% em relação ao grupo salina.

Esta dose (120mg) apresentou expressão aparentemente inferior do que a dose de 60mg. Segundo o teste ANOVA as médias são diferentes, mas segundo o teste de Turkey a dose de 60 não é diferente da dose de 120mg (para  $p < 0,05$ ). Ver figura 46 A.

### **3.4.7. Efeito da GBP na expressão de IL-1 no nervo ciático sob constrição crônica. Animais tratados ao longo de cinco dias:**

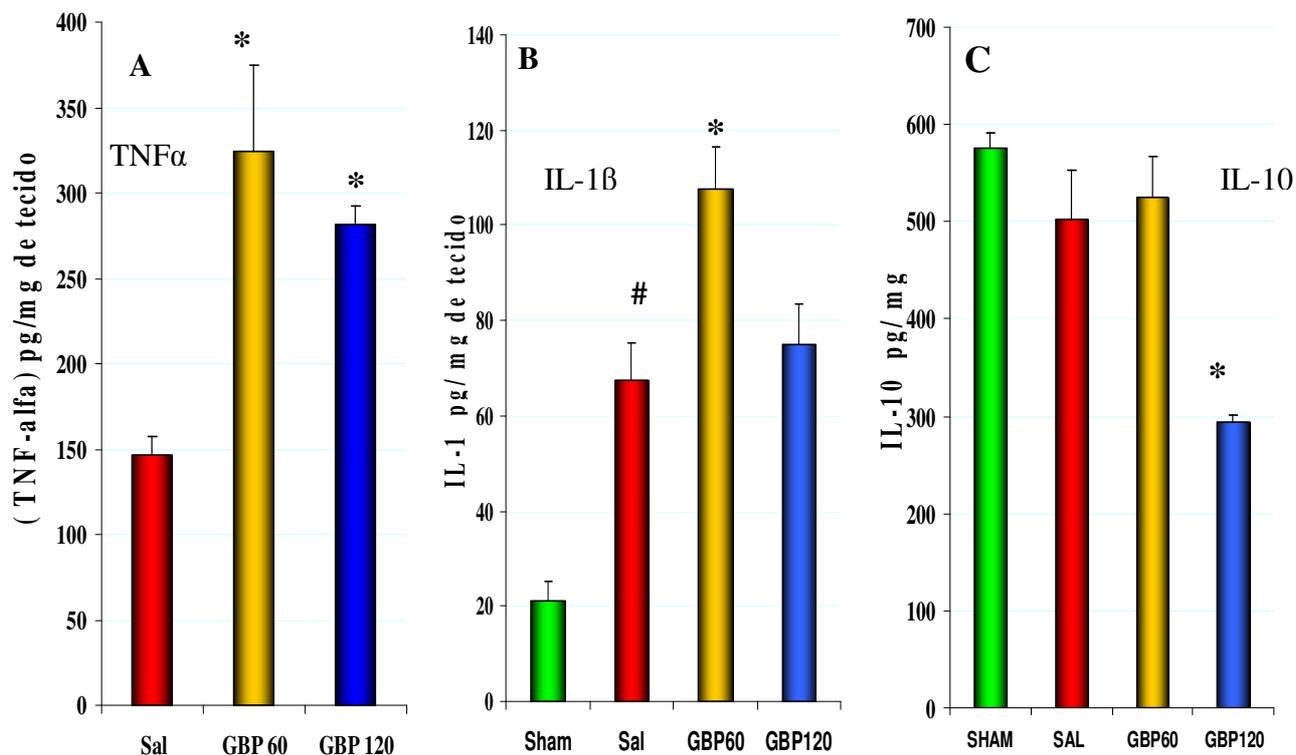
O grupo salina ( $67,5 \pm 7,77$  [IL-1] pg/mg de tecido) provocou um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na expressão de interleucina-1 em relação ao grupo *sham* ( $21,0 \pm 4,31$ ).

A dose de 60mg ( $107,5 \pm 8,83$  pg/mg) provocou um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de 59,26% na expressão de interleucina-1 em relação ao grupo salina ( $67,5 \pm 7,77$  pg/mg). Vale ressaltar que este experimento foi reproduzido obtendo-se resultados semelhantes. Ver figura 46 B.

### **3.4.8. Efeito da GBP na Expressão de IL-10 no nervo ciático sob constrição crônica. Animais tratados ao longo de cinco dias:**

O grupo salina ( $502,33 \pm 51,44$  [IL-10] pg/mg de tecido) obteve expressão de interleucina-10 não diferente ( $p > 0,05$ ) do grupo *sham* ( $575,67 \pm 16,35$ ).

A dose de 120 ( $293,17 \pm 8,66$  pg/mg) provocou redução significativa ( $P < 0,05$ ) de 41,63 % na expressão de IL-10 em relação ao grupo salina ( $502,33 \pm 51,44$  pg/mg). A expressão de IL-1 desta dose (120mg) também foi significativamente ( $p < 0,01$ ) inferior que a expressão da dose de 60mg ( $524,83 \pm 41,81$ ). Ver figura 46 C.



**Figura 46. Expressão de citocinas no nervo ciático com constrição crônica em ratos tratados com GBP ao longo de 5 dias:**

A dosagem de IL-1 $\beta$  (**Painel A**), TNF- $\alpha$  (**Painel B**) e IL-10 (**Painel C**) foi determinada por método de Elisa. Grupo salina: Ratos com CCNC tratados com solução de NaCl 0,9% (N=5). Grupo GBP 60mg (N=5) e GBP 120mg (N=5), Grupo *Sham*: ratos pseudo-operados e não tratados (N=5). Os animais foram tratados com GBP ao longo de cinco dias e no 5º dia sacrificados para coleta do nervo e Elisa 80 min após a última aplicação de GBP. As barras representam a média  $\pm$  EPM em pg/ml/mg de proteína do tecido. \*Significativo quando  $p < 0,05$  ou \*\*significativo quando  $p < 0,01$  em relação ao grupo salina. # Significativo para  $p < 0,05$  em relação ao grupo *sham*. (ANOVA-Turkey).

**3.4.9. Efeito da GBP na expressão da proteína básica de mielina (MBP) através de método de *western blot* no nervo ciático de ratos com CCNC após 5 dias de tratamento:**

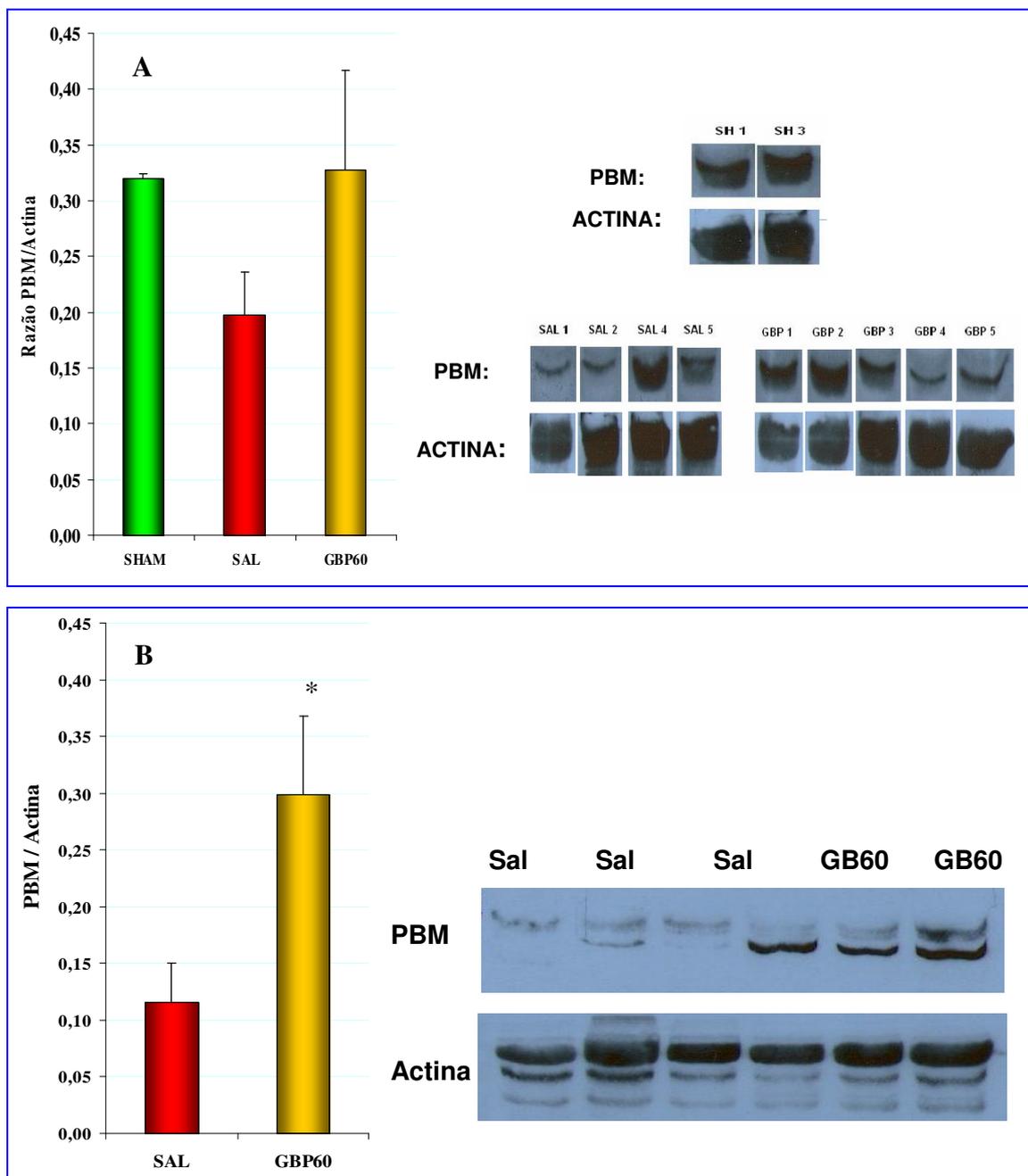
O grupo salina (razão PBM/Actina de  $0,197 \pm 0,037$ ) teve uma expressão de PBM aparentemente diminuída em relação ao grupo *sham* ( $0,32 \pm 0,004$ ) sugerindo que nos animais com CCNC (neuropáticos) ocorreu uma perda de mielina. Ver figura 47A.

A dose de 60 ( $0,327 \pm 0,08$  PBM/Act.) provocou um aumento aparente de 65,98 % na expressão de PBM em relação ao grupo salina ( $0,197 \pm 0,037$ ). Ver figura 47A. No entanto, as médias não foram estatisticamente diferentes.

**3.4.10. Efeito da GBP na expressão da proteína básica de mielina (MBP) através de método de *western blot* no nervo ciático de ratos com CCNC após 15 dias de tratamento:**

A dose de 60mg ( $0,298 \pm 0,069$  PBM/Act.) provocou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 158,06% na expressão de PBM em relação ao grupo salina ( $0,116 \pm 0,034$ ). Ver figura 47B.

O grupo salina (Razão PBM/Actina de  $0,11 \pm 0,034$ ) teve uma expressão de PBM aparentemente reduzida em relação ao grupo *sham* ( $0,264 \pm 0,08$ ) sugerindo que nos animais com CCNC (neuropáticos) ocorre uma perda de mielina. Embora esta diferença não tenha sido significativa em virtude do pequeno N do grupo *sham* (N=2). Dados não expressos no gráfico.



**Figura 47: Efeito do tratamento crônico com GBP na expressão de PBM em *Western Blot* de nervo ciático com constrição crônica e fotos representativas da eletroforese.** Os animais com CCNC foram tratados com GBP ou salina de 12 em 12 h, via oral, durante 5 ou 15 dias e depois sacrificados para coleta do nervo ciático (segmento proximal juntamente com região sob as ligaduras) 80 min após a última aplicação de GBP ou salina. As barras representam a média  $\pm$  EPM da razão PBM/Actina. \*Significativo quando  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina. Teste de Kruskal-Wallis para o estudo de cinco dias e teste “t” para o estudo de 15 dias.

**Painel A:** Em ratos tratados ao longo de 5 dias. Grupo *sham*(SH): N=2, nervos de ratos pseudo-operados e não tratados. Grupo salina (SAL), N=4, nervos de ratos com CCNC tratados com solução de NaCl 0,9%. Grupo GBP60: N=5, nervos de ratos com CCNC tratados com GBP 60mg/kg.

**Painel B:** Em ratos tratados ao longo de 15 dias. Grupo salina (SAL): N=8 e grupo GBP60: N=8. Representação das amostras com uma membrana de 6 bandas.

#### **3.4.11. Expressão de IL-1 por imunohistoquímica em nervos ciáticos de ratos com CCNC após 05 dias de tratamento com GBP 60mg/kg.p.v. ou salina:**

Pode-se observar na figura 48, painel E e F, que o grupo GBP60 teve maior marcação, com muitas células imuno-marcadas (setas vermelhas). O painel F expressa além do endoneuro pequena região do perineuro também bastante imuno-marcada.

No grupo *sham* (figura 48, Painel A e B) e grupo salina ocorre a presença de células imuno-marcadas semelhantes às células de *Schwann* (setas amarelas). A presença das células de *Schwann* no grupo *sham* nos sugere que estas células, neste grupo, expressam uma IL-1 constitutiva.

No grupo salina (painel C e D) também ocorrem muitos espaços vazios entre as fibras (setas verdes), diferente do grupo GBP60 e *sham*. Indicando provavelmente uma maior retração em consequência de desmielinização mais intensa no grupo salina.

#### **3.4.12. Expressão de TNF-alfa por imunohistoquímica em nervos ciáticos de ratos com CCNC após 05 dias de tratamento com GBP 60mg/kg.p.v. ou salina.**

Neste estudo as observações são semelhantes ao do estudo anterior. As células que expressam TNF parecem também expressar IL-1. Pode-se observar na figura 49, Painel E e F, que o grupo GBP60 teve maior marcação no endoneuro (setas vermelhas). Isto sugere que a droga em estudo na dose de 60mg/kg provoca uma elevação da expressão de TNF-alfa.

No grupo *sham* (figura 49, Painel A e B) e grupo salina ocorre a presença de células imuno-marcadas semelhantes às células de *Schwann* (setas amarelas). A presença das células de *Schwann* no grupo *sham* nos sugere que estas células, neste grupo, expressam uma concentração basal ou um TNF constitutivo.

As observações morfológicas são as mesmas para o estudo anterior.

### **3.4.13. Estudo da remodelação do nervo:**

#### **3.4.13.1. Expressão de PBM por imunohistoquímica em nervos ciáticos (corte transversal) de ratos com CCNC após 05 dias de tratamento com GBP 60mg/kg.p.v. ou salina.**

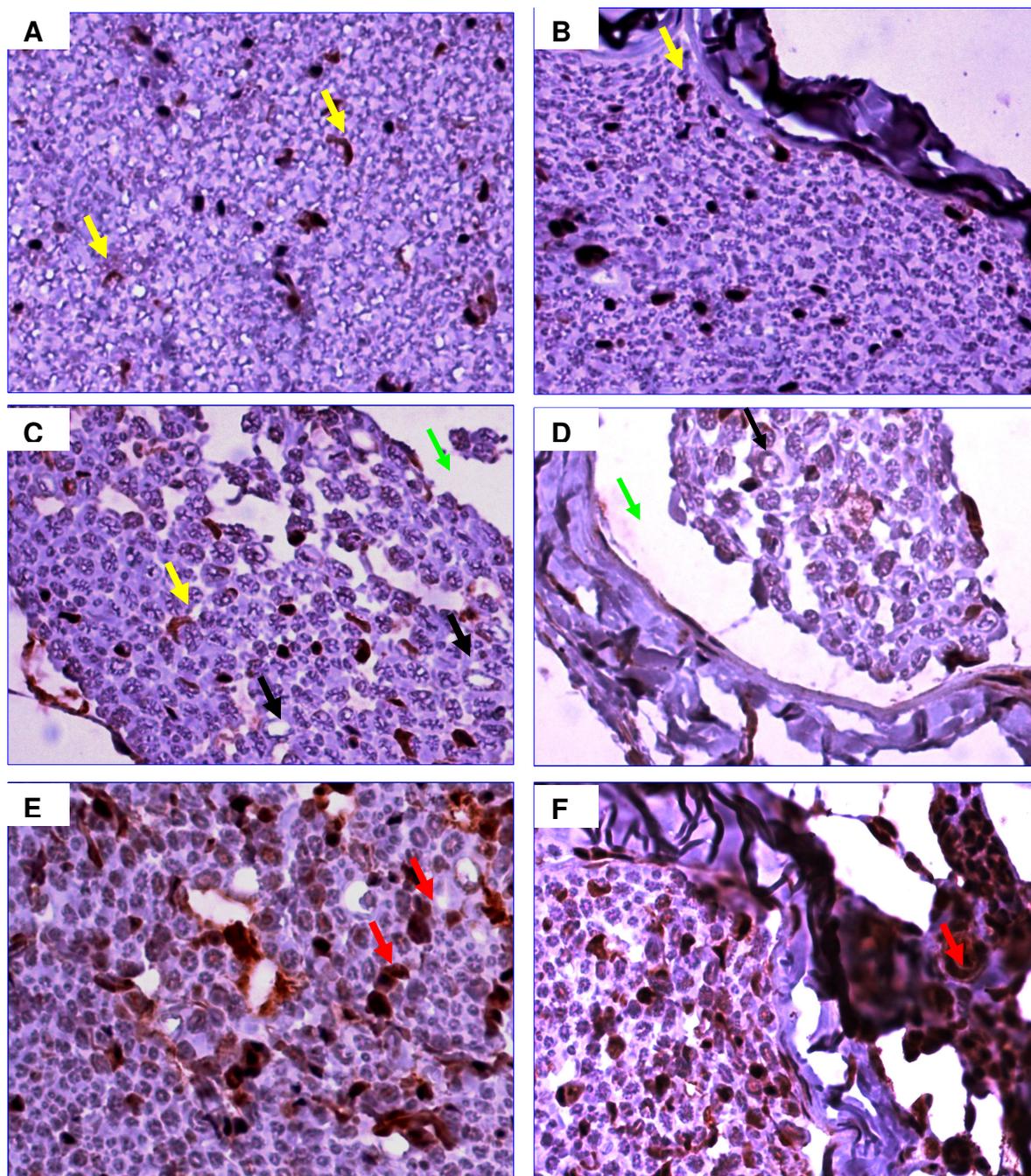
Pode-se observar na figura 50, Painel E e F, que o grupo GBP60 teve maior marcação, com muitas células imuno-marcadas (setas vermelhas). Isto sugere que a droga em estudo na dose de 60mg/kg provoca uma elevação da expressão da proteína básica de mielina.

No grupo *sham* (figura 50, Painel A e B) e grupo salina ocorre a presença de células imuno-marcadas semelhantes às células de *Schwann* (setas amarelas). A presença destas células marcadas no grupo *sham* (sem CNC) ilustra a produção de mielina que normalmente ocorre a partir destas células de *Schwann* (células da glia).

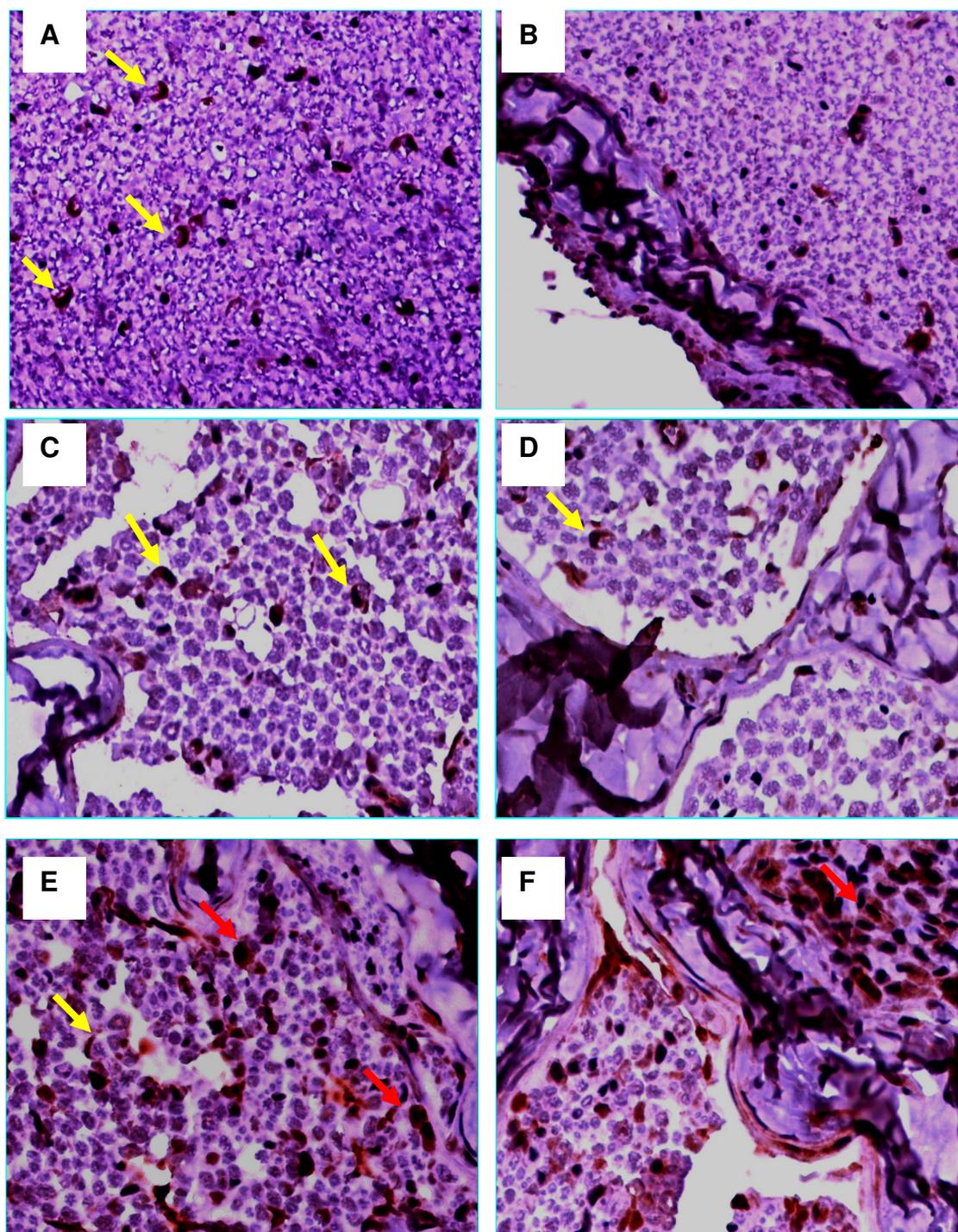
No grupo GBP60 pode-se também observar a presença de pequenos axônios, provavelmente neuritos (setas verdes) sugerindo a ocorrência de um brotamento axonal neste grupo. Embora no grupo salina também isto possa ser observado. Outras observações morfológicas são as mesmas para o estudo anterior.

#### **3.4.13.2. Expressão de PBM por imunohistoquímica em nervos ciáticos (corte longitudinal e transversal) de ratos com CCNC após 15 dias de tratamento com GBP 60mg/kg.p.v. ou salina:**

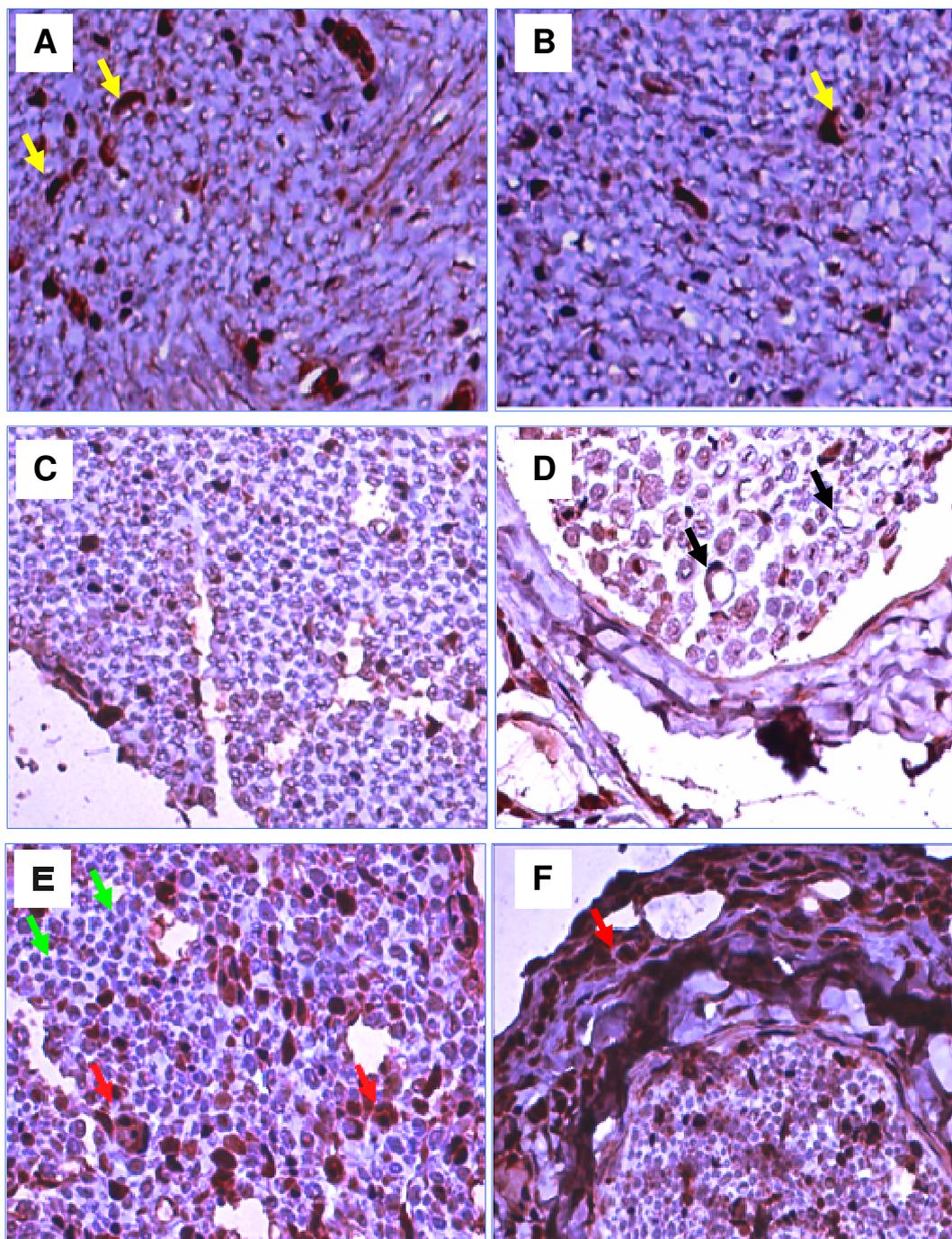
Nas figuras 51 (cortes longitudinais) e 52 (cortes transversais) pode-se observar que as lâminas do grupo GBP60 teve marcação bastante aumentada com anticorpo anti-PBM em comparação com o grupo salina.



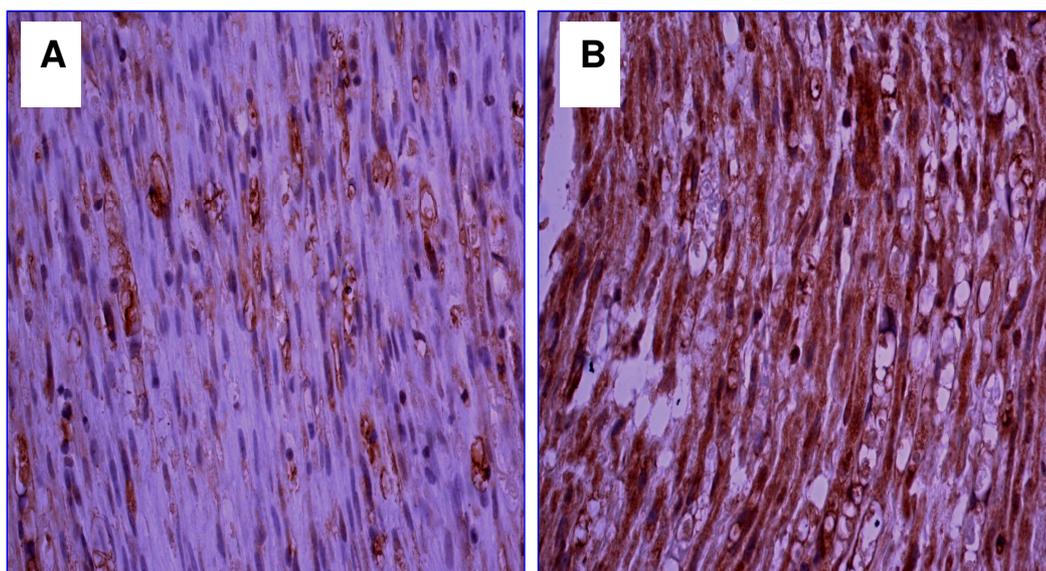
**Figura 48: Tratamento crônico (5 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-IL-1 em nervo ciático de ratos com CCNC.** Fotos de cortes TRANSVERSAIS de nervo ciático. Aumento de 400x. **Painel A** (endoneuro) e **B** (endoneuro e perineuro): Cortes de nervos de animais do grupo *sham* (pseudo-operados e não tratados). **Painel C e D**: Animais com CCNC tratados com salina (NaCl 0,9%). Observar maior espaço entre fibras ou ao redor do feixe indicando provável retração (setas verdes). Nestas lâminas ocorriam a presença de estruturas semelhante à axônios em degeneração (bainha de mielina sem axônio) ou provavelmente pequenos vasos sanguíneos (setas pretas). **Painel E e F**: Animais com CCNC tratados com GBP 60mg. Observar a presença elevada de células imuno-marcadas (setas vermelhas) inclusive em região externa ao feixe de fibras (no painel F). Observar no grupo *sham* e grupo salina a presença de células imuno-marcadas semelhante às células de *Schwann* (setas amarelas).



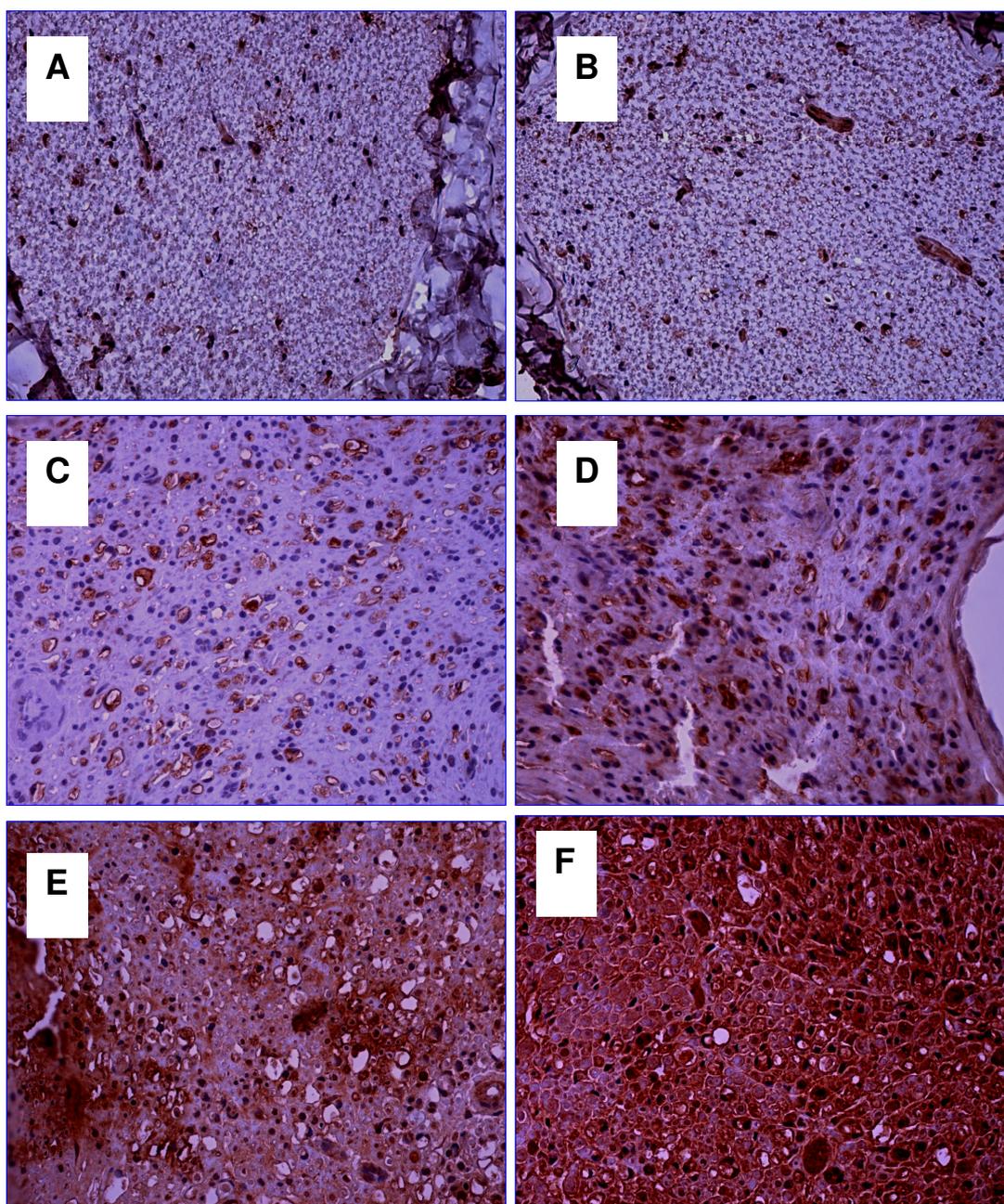
**Figura 49:** Tratamento crônico (05 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-TNF-alfa em nervo ciático de ratos com CCNC. (tratamento de 12 em 12h.). Imunohistoquímica com anticorpo anti-TNF-alfa em corte TRANSVERSAL de nervo ciático. **Painel A** (endoneuro) e **B** (endoneuro e parte do perineuro): Grupo *Sham*. **Painel C e D**: Grupo aalina. **Painel E e F**: Grupo GBP 60mg. Observar presença elevada de células imuno-marcadas (setas vermelhas). Observar no grupo *sham* e grupo salina células semelhantes às células de *Schwann* imuno-marcadas (setas amarelas). Aumento de 400x.



**Figura 50:** Tratamento crônico (05 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo Anti-PBM em nervo ciático de ratos com CCNC. Imunohistoquímica com anticorpo Anti-PBM em corte TRANSVERSAL de nervo Ciático. Aumento de 400x. (Endoneuro). **Painel A e B:** Grupo *Sham* (pseudo-operado). Observar a presença de células semelhantes às células de *Schwann* imuno-marcadas. **Painel C e D:** Grupo Salina. Observar provável retração ao redor do feixe, presença de pequenos vasos (setas pretas). **Painel E e F:** Grupo GBP 60mg. Observar presença elevada de células imuno-marcadas (setas vermelhas). A seta verde indica provavelmente a presença de finos axônios (provável brotamento de neuritos). Aumento de 400x.



**Figura 51. Tratamento crônico (15 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-PBM em nervo ciático de ratos com CCNC.** Imunohistoquímica com anticorpo anti-PBM em corte **LONGITUDINAL** de nervo ciático (endoneuro) de animal tratado com GBP 60mg durante **15 dias**, de 12 em 12 h. **Painel A:** Corte de nervo de animais do grupo salina. **Painel B.** Corte de nervo de animais tratados com GBP 60mg. Observar neste último grupo intensa marcação. Aumento de 400x.



**Figura 52.** Tratamento crônico (15 dias) com GBP 60mg aumenta a marcação de células com anticorpo anti-PBM em nervo ciático (endoneuro) de ratos com CCNC. Imunohistoquímica com anticorpo anti-PBM em corte TRANSVERSAL de nervo ciático. **Painel A e B:** Cortes de nervos de animais *sham* (pseudo-operado). **Painel C e D** (endoneuro e perineuro): animais tratados com salina. **Painel E e F:** animais tratado com GBP 60mg. Observar elevada marcação neste último grupo. Aumento de 400x.

## **DISCUSSÃO**

#### 4. DISCUSSÃO

##### **Estudo do modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCNC) de Bennett e Xie (1988) em comportamentos espontâneos.**

Um dos objetivos do presente estudo foi reproduzir o modelo de CCNC de Bennett e Xie através da avaliação de comportamentos de dor espontânea como o *scratching* e o *biting*, considerados como comportamentos indicativos de dor crônica, como já comentados. Após cinco dias de tratamento (12/12 h) com o veículo salina em animais com CCNC, o aumento bastante significativo no tempo de execução do comportamento *scratching* da pata operada (direita) neste grupo salina em relação ao grupo *sham* confirma a presença de neuropatia nestes animais. Sugere-se que a neuropatia também foi constatada no comportamento *Biting* (morder-se), visto que os animais com CCNC tratados com salina apresentaram um aumento relevante em relação aos animais do grupo *Sham*.

Nestes comportamentos *scratching* e *biting* os resultados foram expressos na forma de média do tempo de duração do comportamento no quinto dia. Os resultados na forma de ganho (diferença entre os tempos do 5º dia e os tempos antes da CCNC) também foram semelhantes (não expressos) para estes comportamentos em virtude de que no início do experimento (antes da CCNC) os grupos se apresentavam com médias aproximadamente iguais, como se pode observar nos gráficos destes comportamentos ao longo de 5 dias (fig. 26A e 27A). Diferente dos outros comportamentos mais relacionados à motricidade, discutidos a seguir, onde as médias de cada grupo se apresentavam diferentes entre si no início (antes da CCNC) (ver, como exemplo, as figuras: 29A, 30A e 31A). Sendo necessária uma expressão mais honesta destes resultados na forma de ganho (ou delta) como se pode verificar na discussão a seguir.

O final do tratamento assim como as observações e sacrifício para coleta do nervo ocorreram no quinto dia após a CCNC em virtude de que neste tempo ocorre uma expressão acentuada das três importantes citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) no nervo ciático de rato, como relatado por George *et al.*, (2000). De forma a se poder correlacionar comportamento de dor e expressão de citocinas sob o efeito do tratamento com a GBP neste período.

Em nosso laboratório pôde-se observar a expressão precoce do comportamento *scratching*, já no 2º dia pós-operatório (em torno de 100 s. de duração) e um pico em torno do 7º dia (190 s.), em ratos com neuropatia induzida através do modelo de transfixação e ligadura parcial do nervo utilizando fio mononylon (modelo de SELTZER, 1990), seguindo com

expressão considerável até 16 meses ( $233 \pm 88$  seg.), isto difere do grupo falso-operado que apresentou valores em torno de 30 segundos ao longo de todo experimento (SANTOS, 1999).

No estudo de Alves (1997), neste mesmo modelo de observação de comportamento espontâneo, em nosso laboratório, utilizando o modelo de Seltzer (1990), foi relatado que as mudanças comportamentais relativas à constrição do nervo ciático acentuavam-se principalmente a partir do vigésimo dia após a constrição e o aumento máximo das mudanças comportamentais dava-se no trigésimo dia (*Scratching* = 78,80 seg.), significativamente maior quando comparado ao grupo *sham* (2,07 seg.).

O modelo de Seltzer (1990) que consiste basicamente na transfixação do nervo em seus 2/3 e posterior ligadura (ligadura parcial do nervo ciático) é um modelo que induz um trauma perfurante no nervo e conseqüentemente pode provocar mecanismos e respostas mais imediatas do animal quanto à dor. Este modelo prejudica menos a função motora, pois a ligadura deixa livre parte das fibras, que não são afetadas, permitindo melhores respostas motoras, no entanto, se torna difícil uma padronização da ligadura nos animais (OSSIPOV; LAI & PORRECA, 2004). Diferente da ligadura frouxa com fio *cat gut* (sem transfixação), utilizada no modelo original de Bennett (1988) e no trabalho em questão, que parece induzir uma resposta de comportamento de dor mais progressiva e pode causar mais comprometimento motor. Os motivos da escolha do modelo de Bennett original para o presente estudo foram dois: O modelo de Seltzer, de acordo com os estudos de Santos (1999), causaram auto-mutilação nos animais (50% dos animais) e, além disso, o fio mononylon (sintético) utilizado, ideal para transfixação, não iria causar a resposta inflamatória desejada, comparando-se ao fio *cat gut* (produzido a partir de tecido intestinal) que possivelmente provocaria maior resposta inflamatória; um dos focos do nosso trabalho.

No 5º dia pós-lesão, início do processo de degeneração Wallerina, ocorre naturalmente um processo inflamatório como constatado a seguir neste trabalho. Como se pôde observar nos nossos resultados, o grupo com CCNC tratado com o diluente salina expressou de forma significativa comportamentos espontâneos de dor crônica (*scratching* e *biting*) podendo-se sugerir então que já neste tempo ocorre alguma sensibilização central além do processo inflamatório periférico.

Os mecanismos responsáveis pelas fases iniciais dos comportamentos de dor neuropática nos modelos de injúria do nervo ciático parecem ocorrer devido à sensibilização central secundária às descargas de injúria. Uma reorganização do circuito sináptico no corno dorsal após a injúria de nervo periférico (WOOLF, 1997) ou propriedades de descargas alteradas em neurônios lesionados dos gânglios da raiz dorsal (LIU *et al.*, 2000).

No presente estudo, a manifestação moderada do comportamento *scratching* na pata esquerda, nos animais com CCNC tratados com salina significativamente diferente do grupo *Sham* pode ser explicada pelo fenômeno chamado de “dor em espelho”.

O fenômeno chamado de “dor em espelho” tem sido relatado no membro contralateral de animais que sofreram injeção de formalina. Estudos funcionais com a técnica de 2-deoxiglicose revelaram um aumento metabólico bilateral nos cornos dorsais e ventrais da medula, acreditando-se que o fenômeno pode estar relacionado à condução desta atividade aumentada através dos funículos anterolateral e dorsolateral, via centros supraespinais (ALLOISI *et al*, 1993). Outros autores sugerem que esse fenômeno ocorre devido a existência de aferentes primários com projeções bilaterais nos cornos dorsais da medula com liberação de substância P também bilateral (“Mirror pain”, LINDEROTH and BRODIN, 1994). No estudo de comportamentos espontâneos, pode-se ainda explicar esta manifestação na pata contralateral, simplesmente através do fato de que os animais se encontram com a pata ipsilateral parcialmente incapacitada, neste período de tempo ainda muito próximo ao trauma cirúrgico, e utilizam a pata contralateral para exercer o movimento de coçar-se que para atenuar a dor.

Nossos resultados corroboram com os achados de Moura *et al*, (1995), Santos *et al*, (1995) e Alves *et al*, (1997), que relatam o aumento do comportamento de coçar-se no membro contralateral. No estudo de Santos (1999), na pata contralateral à ligadura (esquerda) também houve aumentos do *Scratching* no 2º dia (em torno de 50 seg.) e um pico no 7º dia (120 seg.) pós-lesão. Embora sejam valores inferiores ao da pata ipsilateral, estes valores foram significativamente maiores quando comparado ao grupo dos animais pseudo-operados no 7º dia pós-lesão (20 seg.) (SANTOS, 1999).

Vale salientar que a presença de “dor em espelho” ou síndrome da pata esquerda não invalida, mas confirma a efetividade da lesão à direita. Isso se fundamenta no fato de que nos animais pseudo-cirúrgicos a síndrome não se desenvolveu apesar de ter havido exposição dos nervos à direita e à esquerda. Nesses animais, no entanto, não foi infligida a lesão em nenhuma das patas o que garantiu o não desenvolvimento da síndrome.

Com relação aos outros comportamentos como o *rearing* (Empinar-se), *climbing* (escalar) e *walking* (andando), estes comportamentos são basicamente exploratórios e estão relacionados à motricidade.

A redução de 48,56% no tempo de execução do comportamento *rearing* do grupo com CCNC tratado com salina em relação ao grupo *sham* indica que, provavelmente, os animais neuropáticos expressaram uma dificuldade em se apoiar sobre os membros posteriores (onde

reside a neuropatia) por motivo de dor e/ou perda de função motora ou ainda estes animais, devido à situação desconfortante proporcionada pela dor, perderam a curiosidade para exploração (característica bastante presente neste comportamento) o que pode indiretamente confirmar a hipótese da presença de neuropatia nos animais do grupo salina.

Quanto ao comportamento *rest-sleeping*, este se apresenta significativamente aumentado no grupo salina em relação ao grupo *sham* o que pode também comprovar a presença de neuropatia, pois é possível que os animais na condição de dor estejam desencorajados para se movimentarem e assim permaneçam mais tempo parados ou dormindo. Este resultado também foi relatado por outros autores (ALVES *et al.*, 1997; SANTOS, 1999).

No entanto, os comportamentos *climbing e walking* no grupo salina e *sham* foram semelhantes no tempo de execução, deduzindo-se que a CCNC não causa prejuízo significativo na capacidade dos animais de andarem e escalar, possivelmente porque as lesões acometem principalmente fibras finas (A $\delta$  e C) mais relacionadas a dor do que fibras A $\alpha$  e A $\beta$ , relacionadas com a motricidade.

Com relação às observações clínicas, no presente estudo, o comportamento de autotomia (auto-mutilação) não foi observado em nenhum dos animais operados, portanto não concordamos com outros autores que consideram este comportamento como um parâmetro na neuropatia desenvolvida por constrição crônica do nervo (WALL *et al.*, 1979; CODERRE *et al.*, 1986).

Foi observado na maioria dos animais, ao longo dos cinco dias, perda parcial da função motora. Foi detectada hipotonia na pata ipsolateral durante a resposta à execução do reflexo extensor na perna ipsolateral ao se comparar com a pata contralateral nos animais com CCNC. No entanto, os animais andavam ou se locomoviam normalmente, semelhantes ao grupo *sham*, sem ocorrer o “arrastar da perna” ipsolateral como relatado pelo estudo de Santos (1999).

### **Efeitos da GBP nos comportamentos relacionados com a dor crônica: *Scratching* (coçar-se) e *Biting* (morder-se).**

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar os efeitos analgésicos da GBP no 3º e 5º dia após CCNC através de comportamentos espontâneos como o *scratching* e o *biting* os quais estão mais diretamente relacionados à expressão de dor crônica. O tratamento com a GBP ao longo de cinco dias (12/12h) com as doses 30, 60, 120, e 240mg provocaram redução relevante e significativa no comportamento *scratching* (pata direita, ipsolateral) em relação ao grupo neuropático tratado com salina. No entanto, não ocorreu efeito dose-dependente. Parece

existir um efeito máximo limitado à dose de 30mg que já apresentou uma redução relevante no tempo de *scratching*. Neste tipo de comportamento a dose baixa de 30mg parece ser eficaz provavelmente em virtude da resposta de dor ser integrada em nível supra-espinal. Semelhante aos resultados de Kayser and Christensen, (2000) que obtiveram efeitos relevantes no limiar de vocalização (uma resposta integrada a nível supra-espinal) também com a dose de 30mg/kg i.p. aplicada em ratos com constrição do nervo ciático.

No comportamento *biting* (lado direito), 5º dia, a dose de GBP 60mg foi mais eficaz e reduziu de forma relevante (90,53%) a manifestação deste comportamento em relação ao grupo salina.

A inibição destes comportamentos provocada pela GBP 60 e 120mg/kg não se deve ao efeito sedativo da mesma, haja vista que estas mesmas doses aplicadas aos animais intactos aumentaram significativamente a motricidade (*Rearing, Climbing e Walking*) e diminuíram os comportamentos de imobilidade, *Rest-sleeping* (onde o animal só descansava ou dormia) e o *Sniffing* (era registrado quando o animal movia só a cabeça para cheirar e mantinha o corpo parado), como visto nos resultados. De modo que a GBP demonstrou efeitos analgésicos relevantes no 5º dia de neuropatia, uma vez que inibiu comportamentos sugestivos de dor crônica sem inibir as respostas motoras.

Nos animais intactos tratados com o veículo não houve nenhuma alteração significativa dos comportamentos *Scratching* e *Biting* indicando que ele não é normalmente produzido como um hábito. Como também o tratamento durante cinco dias com GBP (60 e 120mg/kg) em animais intactos não provocou nenhuma alteração.

Praticamente todas as observações de comportamentos espontâneos realizadas no 3º dia não demonstraram resultados com diferenças significativas entre os grupos, provavelmente em virtude dos animais ainda se apresentarem debilitados, se recuperando do trauma cirúrgico recente ou por existir naturalmente um forte componente inflamatório neural como discutido a seguir. Os desvios são muito amplos, no 3º e mesmo no 5º dia, pois os fatores externos e internos indutores de variação no comportamento aumentam bastante quando se trata de comportamentos espontâneos ao longo de 20 minutos de observação.

Na literatura científica não ocorrem relatos de estudos com a GBP nestes comportamentos espontâneos *scratching* e *biting*. O que nos impede de maiores comparações neste modelo.

### **Efeito da GBP no Comportamento *Liking* (Lamber-se):**

O comportamento *liking* é mais expressivo nos modelos de dor nociceptiva, como no teste da formalina (TJOLSEN *et al.*, 1992), ou nos modelos de dor induzida em animais neuropáticos, como se pode observar a seguir no “teste da acetona”. Nos modelos de quantificação de comportamentos espontâneos ele se torna mais expressivo em torno de trinta dias após a injúria (SANTOS, 1995; ALVES *et al.*, 1997), pois, no presente trabalho nenhum dos grupos apresentou valores de comportamento diferentes entre si em nenhum dos tempos: antes, 3º e 5º dia após a CCNC. Todos os valores permaneceram próximos de zero.

### **Efeitos da GBP em comportamentos de alta mobilidade: *rearing* (empinar-se): *climbing* (escalar) e *walking* (andando) e em comportamentos de baixa mobilidade: *sniffing* (cheirando), *grooming* (escovar-se), *rest-sleeping* (descansando ou dormindo).**

Como já comentado, considerando que os grupos no tempo zero (antes da CCNC) apresentaram inicialmente médias de tempos muito desiguais, especificamente no comportamento *rearing*, calculou-se os resultados em forma de “ganho” (diferença entre os tempos do 5º dia e os tempos antes da CCNC). Os valores em ganho (ou delta) são mais expressivos e verdadeiros porque mostram a evolução de cada grupo, se excluindo as diferenças comportamentais entre os grupos que ocorrem no início do experimento.

De forma que, no tempo do comportamento *rearing*, se observou um aumento relevante e significativo do grupo GBP60mg em relação ao grupo salina. Isto sugere que esta dose melhorou a condição dos animais em se apoiarem sobre os membros posteriores (efeito antinociceptivo?) e/ou aumenta o grau de curiosidade ou ainda uma excitação do sistema motor. Quanto à dose de 240mg houve redução no tempo do *rearing*, porem não significativa. No entanto, é bem provável que esta dose cause um efeito sedativo e/ou atáxico nos animais, pois provocou um aumento significativo no tempo de *sniffing* (cheirando com os membros imóveis) em relação ao grupo salina.

Em animais intactos o tratamento ao longo de cinco dias com as doses de 60mg e 120mg apresentou um aumento muito significativo do *rearing*, *climbing* e *walking* em relação a animais intactos tratados com salina, sugerindo que a GBP nestas doses, independente de neuropatia, aumenta a capacidade motora dos animais para empinar-se, escalar e andar. Esses achados nos levam a crer que a droga em estudo pode, quando aplicada cronicamente, ter causado algum efeito excitante, aumentando a curiosidade ou ainda a sensação de “bem estar” dos animais. Logo, as doses de GBP 60 e 120mg/kg não causam efeito sedativo.

No entanto, Kayser & Christensen (2000) relatam que, em ratos tratados com dose única de GBP 100mg/kg i.p e submetidos à avaliação da motricidade no “*Rotarod teste*” (modelo onde o animal é forçado a andar por cima de um tambor giratório) a cada 20 minutos após aplicação da droga, até o total de 120 minutos, ocorreu déficits motores significativos nos tempos de 90 min e 120 min após administração da droga. Entretanto, doses inferiores foram eficazes como antialodínicas e não causaram déficits motores. Mas a questão é que, o teste de *Rotaroad* avalia incapacidade motora mais que sedação. Animais com incoordenação, sem sedação, podem cair do tambor e diminuir seu tempo de teste. Enquanto que o nosso modelo de quantificação de comportamentos espontâneos permite que o animal mesmo com incoordenação possa continuar manifestando seus comportamentos de motricidade, e estes sendo quantificados cumulativamente. Comparando-se estes dois modelos pode-se sugerir que a GBP 100 ou mesmo 120mg/kg podem causar alguma incapacidade motora mas não causariam sedação, uma vez que nos nossos resultados, as doses de 60 e 120mg/kg aumentaram significativamente a motricidade nos três comportamentos: *rearing*, *climbing* e *walking* em animais intactos.

Doses muito elevadas, como a de 240mg/kg, podem realmente causar sedação (e talvez incoordenação). Haja vista que esta dose demonstrou uma forte tendência na inibição do comportamento *rearing e climbing* e aumentou significativamente o *sniffing* em ratos neuropáticos.

Por outro lado, aparentemente contraditório, Gustafsson *et al.* (2003) demonstraram que o tratamento agudo em animais intactos com doses cumulativas causou diminuição da locomoção e do *rearing* e aumento da imobilidade a partir da dose cumulativa de 350 $\mu$ mol/kg (~ 60mg/kg) em um modelo de monitorização computadorizada do comportamento baseado na captura de imagens que quantifica estes comportamentos com observações realizadas 30 min após cada aplicação das doses cumulativas.

Comparando estes resultados com os do presente estudo, sugere-se que a GBP pode ter dois mecanismos de ação: um lento a nível intracelular, talvez excitatório, o qual provoca um aumento na motricidade como está claro nos nossos resultados, e outro agudo que gera inibição da motricidade, sendo talvez depressor de neurônios motores. No que diz respeito a este último, os resultados de Gustafsson *et al.* (2003) parecem apontar nesta direção, pois o tratamento agudo causou diminuição da locomoção e do *rearing* e aumento da imobilidade.

A possibilidade da GBP está atuando na redução do influxo de cálcio em neurônios motores é remota, pois a GBP não reduz correntes de cálcio em camundongos normais (PAN; EISENACH; CHEN, 1999), somente em camundongos com expressão aumentada de

subunidades  $\alpha 2\delta$ , condição esta que ocorre em neurônios ganglionares da raiz dorsal em animais após injúria neural (LI *et al.*, 2006; NEWTON *et al.*, 2001). É possível que o efeito agudo e depressor da motricidade, na dose de 350 $\mu$ mol/kg (~ 60mg/kg) relatado por Gustafsson *et al.* (2003) seja devido à suposta ação da GBP em receptores GABAB (NG *et al.*, 2001), ou ainda aumentando a síntese de GABA a partir do glutamato (Taylor *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1995; Bartoszyk *et al.*, 1986). Torna-se difícil especular o mecanismo do efeito crônico da GBP aumentando a motricidade, de acordo com nossos dados, pois são raros os trabalhos com tratamento crônico com a GBP em animais na literatura científica. No entanto, o fato de que a GBP aumentou as concentrações de serotonina em sangue total de pacientes saudáveis (RAO *et al.*, 1988) pode ser um dado interessante.

Colaborando com os efeitos crônicos da GBP no aumento da mobilidade, pode-se verificar nos resultados que esta ainda inibiu a imobilidade, ou seja, inibiu significativamente comportamentos relacionados à baixa mobilidade como o *grooming* e o *sniffing* (um comportamento bastante freqüente que era quantificado quando o animal estava cheirando com membros imóveis), quando comparado com o grupo salina. O *grooming* foi inibido pela GBP (60 e 120mg/kg) somente em animais intactos, no entanto, o *Sniffing* foi inibido pela GBP (60 e 120mg/kg) em animais neuropáticos e intactos.

Somando-se os comportamentos *Sniffing* e *rest-sleeping* (imobilidade) e considerando os resultados na forma de ganho, as doses de 60mg e 120mg provocaram reduções bastante significativas em relação ao grupo salina, mais uma vez comprovando-se o efeito do aumento da mobilidade provocado pelo tratamento crônico com a GBP.

Algumas doses não produziram efeitos significativos estatisticamente nestes comportamentos espontâneos, principalmente dormir e descansar, em virtude do desvio padrão ser muito elevado. Afinal, dormir ou descansar é uma atividade muito variante ao longo do dia nestes roedores de hábitos noturnos.

**Estudo do modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCNC) de Bennett e Xie (1988) nos testes de sensibilidade mecânica (*von Frey*), sensibilidade térmica ao calor (46°C) e sensibilidade térmica ao frio (“teste da acetona”, 10°C).**

No trabalho em questão, comparando-se animais com CCNC tratados com salina com animais *sham*, no modelo de sensibilidade mecânica (*von Frey* eletrônico) pode-se verificar com muita assertividade (desvios padrões muito diminuídos e médias dos grupos muito distantes) que animais com CCNC tratados com salina apresentaram uma sensibilidade muito elevada (expressão de dor) em relação ao grupo *sham*. Isto sugere que a CCNC causou a

condição de dor neuropática no 3º e 5º dia pós CCNC, pois o limiar de retirada da pata induzido por pressão exercida sobre a região plantar da pata direita (operada) do grupo salina foi muito inferior ao do grupo *sham*.

Em animais com CCNC tratados com o veículo (salina), nos modelos de alodínia mecânica (*von Frey*) e alodínia térmica ao frio 10°C (teste da acetona), o aumento de sensibilização foi muito significativo e progressivo do 3º para o 5º dia no grupo salina, como se realmente o processo de sensibilização estivesse aumentando. Embora os sintomas da neuropatia (alodínia e hiperalgesia) estejam estabilizados ao máximo a partir do 14º dia pós-injúria como descrito por Bennett e Xie (1988) e Attal *et al.* (1990).

No presente estudo, considerando o quinto dia de evolução da neuropatia, no teste de alodínia ao frio 10°C (teste da acetona) os animais com CCNC tratados com salina desenvolveram relevantemente a alodínia quando comparado com o grupo *sham*. Paradoxalmente, o teste de alodínia ao calor à 40°C (resultados não mostrados) não detectou a condição de alodínia nos animais com CCNC tratados com salina quando comparados com o grupo *sham*. De forma que, comparando-se entre os testes térmicos de estímulos não nocivos, pode-se verificar que o teste de alodínia ao frio 10°C (teste da acetona) é bem melhor que o teste da alodínia ao calor de 40°C.

Comparando-se entre os testes de sensibilidade ao calor não nocivos (abaixo de 44°C, que detectam alodínia térmica) e nocivos (acima de 44°C, que detectam hiperalgesia térmica), Bennett (1988) relatou que este último proporciona medidas mais quantitativas e mais sensíveis para detectar o início da hiperalgesia, de forma a não utilizar alodínia térmica ao calor em seu trabalho.

Pode-se observar nos nossos resultados que o tempo de cinco dias de evolução da neuropatia em animais com CCNC é suficiente para detecção de alodínia mecânica e alodínia ao frio, onde as diferenças entre os grupos com CCNC tratado com salina e grupo *sham* foram muito relevantes. Apesar de um tempo precoce, a alodínia mecânica e térmica ao frio se manifestaram de forma significativa e intensa nos animais com CCNC. No entanto, este tempo parece ser muito precoce para o desenvolvimento de alodínia térmica ao calor 40°C (dados não expressos) e razoável para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao calor 46°C. Neste último os animais com CCNC tratados com salina desenvolveram uma sensibilidade moderada quando comparado ao grupo *sham*. De fato, Bennett (1988) utilizando fonte radiante de calor (n=148 animais) relatou que 85% dos animais se tornaram hiperalgésicos em torno do 6º dia pós CCNC.

No trabalho em questão, no teste de alodínia mecânica podem-se observar efeitos da GBP mais coerentes e com menores desvios comparando-se ao teste de hiperalgia térmica (46°C) onde apesar dos efeitos anti-hiperalgésicos da GBP terem sido significativos foram também aparentemente intrigantes, pois os tempos de latência dos grupos tratados com GBP 30, 60 e 120mg foram superiores não somente ao grupo salina mas também ao grupo *sham*. Indicando um efeito anestésico ou sedativo neste teste de hiperalgia. Apesar deste efeito anestésico ou sedativo ser provavelmente próprio da droga (embora não observado nos outros testes) Hofman *et al.* (2003) também verificou em modelo de injúria em nervo tibial que a alodínia mecânica é mais confiável que a hiperalgia térmica na avaliação dos efeitos das drogas.

Segundo De Vry *et al.* (2004), ambos os teste de hiperalgia térmica (*plantar test*) e alodínia mecânica (*von Frey* eletrônico) foram eficazes no estudo de diferentes drogas inclusive da GBP a qual produziu efeitos anti-hiperalgésicos e anti-alodínicos significativos.

Bridges *et al.* (2001) relata que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hiperalgia térmica após injúria neural são, pelo menos em parte, diferentes dos mecanismos da alodínia mecânica.

Fibras A $\beta$ , mielinizadas aferentes, medeiam alodínia mecânica (CAMPBELL *et al.*, 1988) enquanto que a hipersensibilidade térmica é mediada através de fibras amielínicas tipo C (KOLTZENBURG *et al.*, 1992) que expressam receptores opióides enquanto que fibras de largo diâmetro tipo A provavelmente não expressam receptores opióides (ZANG *et al.*, 1998). Ambos os tipos de fibras possuem diferentes papéis na manifestação de dor neuropática. Após injúria neural periférica o predomínio de fibras ativas é do tipo A $\beta$ , A $\delta$  (>80%), e as fibras C constituem uma pequena proporção (0-30%) da população ativa (KAJANDER & BENNETT, 1992).

Isto sugere que a utilização dos testes térmicos ao calor no 3º e 5º dia após a injúria neural se torna um pouco dificultada por que muitas fibras sensitivas degeneram e não tiveram tempo suficiente para regenerarem. O motivo pelo qual se obteve efeitos mais coerentes no teste de alodínia mecânica (*von Frey*) se deve ao fato de que, como já comentado, este teste envolve principalmente fibras tipo A (que detectam pressão) e após a lesão neural periférica ocorre predomínio destas fibras (>80%). Os testes de alodínia térmica e principalmente hiperalgia térmica envolvem a participação das fibras C, que degeneram com maior rapidez, constituindo uma pequena proporção (0-30%) da população ativa. E realmente nos testes de alodínia térmica ao calor de 40° C (dados não mostrados), no 3º e 5º dia, pode-se observar nos grupos experimentais o bloqueio da sensibilidade, indicando talvez

uma menor presença destas fibras sensitivas. Paradoxalmente, o teste térmico da alodínia ao frio 10°C (teste da acetona) se apresentou muito sensível, com resultados significativos e interessantes, como já comentado. Isto talvez se deva ao fato de que a detecção do frio envolve fibras A $\delta$  que possuem diâmetros maiores que as fibras C (detecta calor) e assim degeneram menos, ocorrendo melhor função sensitiva (CRUCCU *et al.*, 2004; SCHESTATSKY P. 2008)

Quanto à precocidade das respostas de dor, se compararmos com outros estudos de comportamentos de dor induzida, foi observada alodínia mecânica em animais já no 1º dia após ligadura parcial do nervo ciático (MALMBERG & BASBAUM, 1998; SELTZER *et al.*, 1990) e após ligadura do nervo espinal (KIM & CHUNG, 1992; MANSIKKA *et al.*, 2000).

**Efeitos da GBP no teste de sensibilidade mecânica (*Von Frey*), teste de sensibilidade térmica ao frio (“teste da acetona”, 10°C) e teste sensibilidade térmica ao calor (46°C).**

Entre as doses de 30, 60, 120 e 240mg/kg, a dose de 120mg provocou a melhor resposta antinociceptiva em todos os testes de dor induzida, no 5º dia de evolução da neuropatia. Sendo uma resposta moderada nos testes de sensibilidade mecânica e no teste de alodínia ao frio (uma recuperação de 57,76% e 42,26%, respectivamente em relação ao *sham*). E uma resposta analgésica intensa no teste de hiperalgesia ao calor. A dose de 60mg não foi significativamente inferior, se apresentando com valores próximos à dose de 120mg, provocando uma recuperação de 45,96% do LRP em relação ao *sham* no teste de alodínia mecânica. Não houve efeito dose-dependente nestes modelos. Em adição, os efeitos da dose de 30mg foram também muito próximos aos da dose de 60mg. Talvez a dose de 30mg tenha sido uma dose com efeitos sub-máximos e as doses superiores não puderam potencializar estes efeitos.

O que poderia também explicar os efeitos moderados e a falta de efeito dose dependente, seria o fato de que a GBP esteja inibindo os mecanismos de sensibilização central, como por exemplo, inibindo influxo de cálcio, como já comentado, mais não esteja atenuando a dor produzida pelo processo inflamatório que no quinto dia se encontra ainda pronunciado na DW, onde ocorre normalmente a liberação periférica de substâncias hipersensibilizantes como bradicinina e substância P e citocinas hiperalgésicas (SCHOLZ, 2007) onde a GBP não teria efeito inibitório. Pelo contrário, como proposto pelo presente estudo, a GBP utilizada cronicamente teria efeito pró-inflamatório (assunto melhor discutido a seguir).

De qualquer forma, apesar dos efeitos moderados, as doses de 60 e 120mg produziram efeitos significativos em diminuir a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica. A dose de 30mg teve também efeitos antinociceptivos significantes nos modelos de alodínia mecânica e também na hiperalgesia térmica.

A partir dos resultados do presente estudo, sugere-se que a GBP, apesar dos seus efeitos pró-inflamatórios que poderiam causar dor, possui efeitos antinociceptivos centrais subseqüentes predominantes e talvez também efeitos antinociceptivos periféricos ativando a via do NO/GMPc/PKC/K<sup>+</sup> (ORTIZ *et al.*, 2006)

No teste de hiperalgesia ao calor (46°C) a dose de 120mg provocou uma resposta analgésica muito elevada, com 146,08% em relação ao grupo neuropático tratado com salina. E também ultrapassando bastante os valores do grupo *sham*. O que pode significar que esta dose pode ter diminuído a sensibilidade ao calor provocando uma sensibilidade inferior à

observada nos animais normais. Isto sugere que neste teste de hiperalgesia ao calor esta dose de 120mg/kg provocou não só uma analgesia, mas talvez próximo a um efeito anestésico. Não se supõe que a CCNC *per se* tenha causado este bloqueio da sensibilidade porque o grupo com CCNC tratado com salina apresentou tempo de latência significativamente inferior ao grupo *sham*. E a possibilidade de ser um efeito sedativo também é remota pelo fato desta dose ter induzido um aumento nos comportamentos relacionados à alta motricidade, como já comentado. Corroborando com esta suposição acima, na pata esquerda a dose de 120mg provocou um aumento significativo no tempo de latência.

E em adição, a dose de 240mg provocou em relação ao grupo salina uma redução (efeito hiperalgésico) no tempo de retirada da pata (TRP). E na pata contralateral esta dose de 240mg também provocou uma redução significativa no TRP em relação ao grupo salina. Sugerindo-se neste caso um efeito hiperalgésico e não restrito ao local da injúria provocado por esta dose de 240mg. Este efeito pró-nociceptivo da dose de 240mg parece ter se repetido no teste de alodínia ao frio no 3º e 5º dia após a CCNC, mas não foi estatisticamente significativo. É possível que os efeitos pró - inflamatórios, discutidos a seguir, da GBP 240mg estejam pronunciados, causando assim estes efeitos pró-nociceptivos.

É possível que esta dose elevada (240mg/kg) aumente a atividade (dor) nos receptores de calor e/ou nas fibras nervosas sensitivas térmicas (fibras tipo C). Sem efeito nas fibras tipo A, pois este efeito pró-nociceptivo não ocorreu na sensibilidade mecânica (*von Frey*) onde estas fibras estão envolvidas. Seguramente, como já comentado, estes modelos de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica possuem mecanismos diferentes. A dose de 240 não foi utilizada nos experimentos de dosagem de citocinas. No entanto, se a dose de 240mg provocasse um aumento na expressão do TNF no nervo gradativamente maior do que os efeitos relevantes observados nas doses de GBP 60 e 120mg poderíamos explicar este efeito nociceptivo da GBP 240mg a partir do estudo de Junger & Sorkin (2000) o qual relata que a atividade pró-nociceptiva do TNF está relacionada principalmente às fibras do tipo C onde esta citocina produziria uma sensibilização aguda de mecanismo rápido talvez por ação em receptores presentes nas fibras C ou então ativando a enzima COX levando a geração de eicosanóides. Em adição, foi relatado que o TNF possui efeito hiperalgésico em neuropatias por constrição crônica de nervo (ZANELLA *et al.*, 2008).

Estes efeitos pro-nociceptivos do TNF através da dose de GBP 240mg poderiam estar mascarando os efeitos antinociceptivos da GBP via inibição dos canais de cálcio. No entanto, isto precisa ser melhor estudado, pois a GBP 120mg não apresentou efeito superior do que a

dose de 60mg na expressão de TNF- $\alpha$ , o que indica que a dose de 240mg talvez também não provocasse efeito superior.

No modelo de alodínia ao frio (10°C), a ausência de significância das doses de 30 e 60 talvez tenha sido em virtude do alto desvio que este modelo apresenta. Os animais apresentam grande variação no comportamento. Ou seja, alguns animais preferiam não lamber a pata (*licking*) depois do estímulo frio (acetona) em virtude do cheiro forte da acetona ou por outro motivo, o que deixa variações nas possibilidades de resposta dos animais ao estímulo frio da acetona sobre a pata. Diferente do teste do *von Frey* que apresentou resposta com pequenos desvios, sendo um modelo mais preciso. No entanto este modelo de sensibilidade ao frio é importante por que avalia a função das fibras de sensibilidade térmica (frio), fibras finas e amielinizadas tipo C, como já comentado. E a dose de 120mg neste teste provocou redução significativa do escore de dor em relação ao grupo controle salina. Em adição, a presença de alodínia ao frio foi claramente constatada nos animais com CCNC tratados com salina quando comparados com os animais *sham*, se comprovando mais uma vez a presença de neuropatia e a eficácia deste teste.

Talvez a ausência de efeito dose-dependente como também o moderado efeito antialodínico da GBP podem ser explicado pelo motivo de serem concentrações muito próximas (doses de 30 e 60mg) e/ou o modelo de CCNC de Bennett (1988) não é tão sensível aos efeitos da GBP. Como por exemplo, quando comparado ao modelo de Kim e Chung (1992) de ligadura de nervo espinal (L5) que demonstrou efeitos sensivelmente mais expressivos da GBP. LaBuda and Little (2005), utilizando este modelo de neuropatia e testando a sensibilidade táctil com os monofilamentos de *von Frey*, utilizou três doses de GBP (30, 60 e 120mg/kg i.p.) e demonstrou relevantes efeitos anti-alodínicos. Os aumentos dos limiares de retirada da pata (LRP) em relação ao grupo neuropático tratado com salina foram de 143, 206 e 180% respectivamente. A dose de 60 obteve uma recuperação relevante do LRP em torno de 88% em relação ao grupo *sham*. Como se pôde verificar, esta dose de 60mg obteve melhores efeitos, demonstrado um efeito anti-alodínico de grande magnitude (206%). Os testes foram realizados 1h após aplicação da droga.

DE VRY *et al.* (2004), utilizando o modelo original de Bennet & Xie (1988), demonstrou efeitos anti-hiperalgésicos e anti-alodínicos moderados da GBP na dose de 50mg/kg i.p. (no 27º dia pós-injúria) em torno de 31% e 35% respectivamente, e a dose de 100mg/kg não obteve efeito superior.

Baseado nos efeitos obtidos por estes autores decidiu-se, no trabalho em questão, utilizar principalmente as doses de 60 e 120mg/kg.p.v. via gavagem. O uso da via oral não

causa prejuízos significativos nos níveis séricos da droga, haja vista que, como já comentado, a GBP praticamente não sofre biotransformação em ratos e bem absorvida no trato gastrointestinal.

Podemos concluir que os efeitos antialodínicos e anti-hiperalgésicos da GBP estão consolidados, a dose ideal está em torno de 50 a 60mg/kg e que o modelo de Kim e Chung (1992) de ligadura de Nervo Espinal (L5), de acordo com os dados da literatura vistos acima, é muito mais sensível que o modelo de Constrição Crônica do Nervo Ciático (BENNETT & XIE, 1988) na avaliação dos efeitos da GBP. Provavelmente porque neste modelo de Kim e Chung (1992) a lesão dos nervos espinais é mais próxima dos gânglios dorsais e quanto maior a proximidade da lesão maior as alterações na DW, causando maior expressão das subunidades  $\alpha 2\delta$  dos canais de cálcio voltagem dependentes nos neurônios ganglionares da raiz dorsal, uma vez que, de fato, este aumento ocorre após injúria neural (LUO and RABOISSON, 2001) e que a GBP tem seu principal mecanismo de ação na dor neuropática atuando nestas subunidades  $\alpha 2\delta$ . Como demonstrado que camundongos *knockout* para  $\alpha 2\delta$  desenvolveram neuropatia, mas não responderam mais à GBP ou PGB (FIELD *et al.*, 2006). Colaborando com estes achados, foi verificado que GBP suprimiu *in vivo* as descargas ectópicas em fibras aferentes do nervo Ciático de animais neuropáticos e não teve efeito em fibras normais (PAN *et al.*, 1999). Realmente pode ser proposto que um estado de sensibilidade aumentado (com plasticidade neuronal induzida por injúria) do sistema nervoso seja essencial para a ação da GBP, pois em modelo de formalina a GBP (~17 mg/kg s.c.) não teve efeito na fase 1, produzindo efeito significativo na fase 2, como proposto por Gustafsson *et al.* (2003), e resultados semelhantes também foram relados por Field *et al.* (1996). De qualquer forma nossos dados estão compatíveis com estes mesmos autores no sentido de que a GBP atua como uma substância antialodínica anti-hiperalgésicos e a magnitude de seus efeitos dependem do modelo de indução de neuropatia.

### **Gabapentina e a via NOS/GMPc/NO/K<sup>+</sup>**

Tem sido demonstrado que a atividade catalítica da NOS constitutiva (Óxido Nítrico Sintetase Constitutiva) está diminuída no corno dorsal da medula espinal após lesão provocada por constrição crônica (CIZKOVA *et al.*, 2002) e no modelo de ligação de nervo espinal (GRANADOS-SOTO, *in press*, 2006). Enquanto que o RNAm e a proteína da NOS não estão alteradas nestas condições (LUO *et al.*, 1999; CIZKOVA *et al.*, 2002).

A GBP (30 a 300 $\mu$ g) administrada por via subcutânea produziu antinocicepção periférica local por ativação da via NO/GMPc/PKG/canais de potássio (ORTIZ *et al.*, 2006). Como também administrada por via intratecal induziu um efeito anti-alodínico em ratos com constrição de nervos espinais (Modelo de KIM; CHUNG, 1992) provavelmente, e pelo menos em parte, através do aumento da ativação da via NO/GMPc/PKG/canais de K<sup>+</sup> (MIXCOATL-ZECUATL; FLORES-MURRIETA, GRANADOS-SOTO, 2006).

Existem relatos que a ativação da via NO/GMPc seria hiperalgésica a nível central (PATIL *et al.*, 2006). Talvez a GBP tenha algum efeito analgésico também ao nível central, pois segundo Oka e colaboradores (2003), a GBP **inibiu** a ativação da NOS induzida por despolarização (K<sup>+</sup>) em neurônios corticais via bloqueio dos canais de cálcio tipo P/Q e L. (OKA *et al.*, 2003).

Os efeitos da GBP na atividade da iNOS ou através da via NO-GMPc parecem variar de acordo com os modelos experimentais utilizados, diferentes tipos de tecidos, como também devido à variações nos conteúdos intracelulares de NO e GMPc (KAWABATA *et al.*, 1994; PEHL; SCHIMID, 1997; TEGEDER *et al.*, 2002). Como se pode verificar este assunto é muito controverso e seriam necessários no presente estudo experimentos direcionados para esta via do NO para melhores esclarecimentos.

### **Efeitos da GBP na Inflamação:**

HURLEY *et al.* (2002) desenvolveram um estudo onde foi realizada a aplicação oral com GBP (3-300mg/kg) isolada ou associada ao naproxeno (0,1-30mg/kg), 2,5 horas após estímulo com carragenina intraplantar e verificação do volume de edema de pata e medida de limiar nociceptivo 1 hora após a aplicação das drogas (GBP e/ou Naproxeno). O referido estudo concluiu que a GBP e o naproxeno tiveram efeitos sinérgicos no aumento do limiar nociceptivo. Contudo, a GBP aplicada em dose única e neste tempo (2,5 horas após a carragenina) não demonstrou nenhum efeito significativo na inflamação, verificado no modelo de edema de Pata.

No presente estudo, o ponto principal gerador das diferenças dos efeitos da GBP obtidos no presente trabalho em relação aos outros, talvez seja o tratamento crônico realizado e o tempo pós-lesão escolhido para a realização de todos os testes comportamentais, pois realmente na evolução da DW no 3º e 5º dia após a injúria existe ainda um forte componente inflamatório participante no desencadeamento da dor, onde a GBP parece não inibir estes mecanismos inflamatórios limitando assim, em parte, os seus efeitos antialodínicos e

antihiperalgésicos. Na verdade, no presente estudo, a GBP quando aplicada preventivamente e continuamente (de 12/12hs) durante cinco dias, demonstra efeitos pró-inflamatórios relevantes, visto que provocou aumentos de 53% e 87% no volume de pata inflamada por carragenina nas doses 60 e 120mg respectivamente em relação ao grupo tratado com salina.

Apesar dos efeitos hiperalgésicos do TNF e IL-1 (SACHS *et al.*,2002; CUNHA *et al.*, 1992a) que devem estar aumentados com o tratamento crônico da GBP, esta última ainda produziu efeitos analgésicos relevantes no presente estudo, sugerindo que provavelmente seus efeitos nos canais de cálcio e supostamente na via NO/GMPc sobrepujam os efeitos hiperalgésicos do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Possivelmente estes efeitos na indução do aumento de TNF e IL-1 pela GBP sejam de pequena duração, somente enquanto persistir a inflamação (primeira semana da DW), o que não iria interferir numa maior participação do seu efeito analgésico posteriormente ao longo do processo de degeneração neural. Além disso, o efeito da GBP pode também precisar de um estado ativado da célula para exercer seus efeitos no nível das citocinas. Semelhante ao observado no efeito da GBP em inibir a liberação de neuropeptídeos na medula espinal de ratos, onde foi necessário um estado de inflamação ou ativação da PKC para que a GBP produzisse estes efeitos (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003). Em adição, nos nervos coletados ao 15º dia de tratamento contínuo com a GBP não se detectou nenhum sinal aparente de inflamação na observação macroscópica destes nervos. No entanto, seria necessário avaliar a expressão destas citocinas em tempos posteriores nos nervos com CC tratados cronicamente com a GBP para avaliar se esta droga iria afetar a expressão de citocinas nestes tempos tardios da DW. Onde neste caso poderia afetar a regeneração neural.

### **Efeitos da GBP na migração de neutrófilos:**

Em relação a expressão de mieloperoxidase (MPO), a GBP 60mg provocou aumento de 982,16% na atividade da MPO no nervo em relação ao grupo salina. No entanto a dose de 120mg produziu uma expressão de MPO bem inferior. A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e macrófagos, é utilizada como marcador da presença de células inflamatórias no tecido inflamado. Estes achados sugerem que a GBP aumentou a migração destas células para o nervo lesionado. Este efeito crônico da GBP no aumento da migração de células também foi obtido no modelo de migração para cavidade peritoneal induzido por carragenina. Onde a dose de 60mg provocou um aumento de 262,19% em relação ao grupo salina e 90,40% das células migradas neste grupo GBP60mg eram

neutrófilos, de acordo com a microscopia realizada com as lâminas que continham o líquido peritoneal coletado quatro horas após a aplicação da carragenina. Haja vista que as doses GBP 60 e 120mg/kg também aumentaram significativamente a expressão de TNF- $\alpha$ , como visto pelo método de ELISA, é possível que esta migração de células tenha ocorrido como consequência do aumento da expressão do TNF- $\alpha$ . Como já comentado, o TNF- $\alpha$  tem um papel importante no recrutamento de macrófagos para o local da lesão (LIEFNER *et al.*, 2000) e estes por sua vez poderiam sinalizar a migração de outras células. Como já foi comprovado que a intensidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal de animais estimulados com carragenina ou outros estímulos (inclusive estímulos endógenos como IL-1 e TNF- $\alpha$ ) é proporcional ao número de macrófagos residentes presentes nesta cavidade (FACCIOLLI *et al.*, 1990; CUNHA & FERREIRA, 1986; DE SOUZA & FERREIRA, 1985). Como também efeitos específicos da ligação do TNF ao receptor incluem ativação de neutrófilos (SHALABY, M. R. *et al.*, 1985; KLEBANOFF, S. J. *et al.*, 1986). Como já comentado, o TNF- $\alpha$  também se mostrou capaz de estimular e agir sinergicamente com muitas outras interleucinas e interferons, incluindo IL-1, IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  que por sua vez podem desencadear quimiotração para neutrófilos. Corroborando com estes achados, *upregulation* do TNF $\alpha$  provoca aumento na atividade das metaloproteases da matriz (secretadas por macrófagos ativados) que controlam a integridade do espaço extracelular e desencadeia a quebra da barreira hemato-neural facilitando a passagem de células em migração (WEE YOUNG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996; SHUBAYEV *et al.*, 2006).

### **Gabapentina, inflamação e NF-kappaB**

Segundo Park (2008), GBP e pregabalina (um análogo da gabapentina) suprimiram a ativação do NF- $\kappa$ B induzido por substância P em células de neuroblastoma humano e células de glioma de ratos. Estas drogas também inibiram ativação do NF- $\kappa$ B em células ganglionares da raiz dorsal pré-tratadas *in vitro* com substância P. Sugerindo um prévio e indefinido papel da GBP e PGB na regulação da sinalização intracelular relacionada à inflamação em ambos as células neuronais e gliais.

### **Gabapentina, TNF- $\alpha$ e dor:**

De acordo com os resultados, no quinto dia de evolução da neuropatia, o tratamento contínuo (12/12 h) com as doses de GBP 60 e 120mg/kg provocaram aumentos significativos de 120,95 % e 91,99% na expressão de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo salina, obtido através do imunoenensaio ELISA.

Pode-se verificar que, apesar dos efeitos nociceptivos (hiperalgésicos) do TNF- $\alpha$  (JUNGER; SORKIN, 2000; ZANELLA *et al.*, 2008) que poderiam estar potencializados com o tratamento crônico com a GBP, esta última ainda demonstrou efeitos analgésicos neste período precoce da evolução da neuropatia. De forma que os efeitos antinociceptivos da GBP parecem ser predominantes (como visto nos resultados deste presente estudo nos modelos de alodínia mecânica e térmica) e provavelmente atuam via modulação dos canais de cálcio (subunidade  $\alpha_2\delta$ ) e/ou através via NO/GMPc/PKC/K<sup>+</sup>.

### **O TNF- $\alpha$ teria ação desmielinizante?**

Embora o TNF $\alpha$  tenha sido pensado como um importante agente anti-tumoral, agora está relacionado a várias doenças desmielinizantes incluindo Esclerose Múltipla (SM), Encefalite Autoimune Experimental (EAE) e Neurite Autoimune Experimental (EAN). Por causa desta correlação, o TNF $\alpha$  parece ter um efeito inibitório na expressão da proteína básica de mielina (PBM) e tem sido recentemente proposto possuir um papel prejudicial na progressão da Esclerose Múltipla. Além disso, a aplicação intravitreal de TNF $\alpha$  induziu degeneração axonal de nervo óptico com fraco envolvimento neuronal da retina, e a inibição experimental do NF- $\kappa$ B p65 levou a uma proteção axonal (KITAOKA *et al.*, 2006). E o fato de que uma direta injeção de TNF $\alpha$  em nervo periférico resultou em DW confirma esta hipótese (REDFORD *et al.*, 1995; UNCINI *et al.*, 1999).

Nossos dados colaboraram com os achados de Huang e colaboradores (2002), onde demonstraram que o TNF- $\alpha$  modula a transcrição do gen para PBM através da ativação de NF- $\kappa$ B em linhagem de células de oligodendroglomas. De acordo com este estudo, a via NF- $\kappa$ B pode ter um papel fundamental durante desenvolvimento, manutenção e regeneração da mielina. Então o TNF $\alpha$  modularia a expressão da PBM ao nível da transcrição.

## O TNF $\alpha$ é importante para degradação e fagocitose da mielina

Se considerarmos que o TNF $\alpha$  modula negativamente a expressão da PBM, este fenômeno pode ser considerado favorável à regeneração se considerarmos que o pico de TNF- $\alpha$  é em torno de 12 horas após a injúria (onde predomina a degeneração axonal) e seus níveis parecem ser significativos somente até o 7º dia após a lesão (GEORGE *et al.* 2004) onde predominam a degradação e remoção dos fragmentos de mielina, processos necessários para gerar um ambiente favorável para o posterior alongamento dos axônios e remielinização, como já comentado. No estágio da DW onde ocorre predominantemente a remielinização, depois da segunda semana após a injúria, a expressão de TNF está a níveis bem inferiores.

Nos primeiros dias da DW talvez não seja importante o aumento da síntese de PBM e mielina, tendo-se em vista que, logo após a injúria neural, a maior parte dos axônios, no segmento distal à lesão, está sob degeneração aguda, processo aparentemente irreversível. Kerschenstein *et al.* (2005) demonstraram *in vivo* que em 30 min centenas de micrômetros de axônios degeneram. O influxo de cálcio é um dos eventos mais precoces e sinaliza o início da degeneração (KRAUSE *et al.*, 1994).

Fundamental nesta fase inicial da DW não é a síntese de mielina e sim a remoção dos resíduos de mielina. Estes resíduos de mielina contêm inibidores dos fatores de crescimento dos axônios, uma glicoproteína associada à mielina (MAG). O recrutamento de macrófagos e a fagocitose dos *debris* de mielina por células de *Schwann* e macrófagos removem também os inibidores (MAG) criando condições favoráveis para o alongamento dos axônios (TEMPORIN *et al.*, 2008a; QIU *et al.*, 2000; STOLL; JANDER, 1999; STOLL; MULLER, 1999; HIRATA *et al.*, 1999).

Alguns autores comentaram que: “um possível efeito do TNF- $\alpha$  seria um efeito ativacional nas células de *Schwann*. Este então poderia direcionar a uma degradação e fagocitose da bainha de mielina por macrófagos, processos essenciais para uma eficaz regeneração do axônio” (BISBY & CHEN, 1990; TANAKA *et al.*, 1992).

Várias são as evidências de que o TNF- $\alpha$  pode ter uma contribuição na regeneração do nervo periférico, considerando-se como pré-requisito para a regeneração neural a remoção dos resíduos de mielina e de axônios. O TNF- $\alpha$  é mediador autócrino nas células de *Schwann* e parece estar envolvido na prolongada ativação destas células (QIN; CHENG, 2007). As células de *Schwann* ativadas por sua vez promovem precoce remoção dos *debris* de mielina e do axônio (STOLL *et al.*, 1989; PERRY *et al.*, 1995, FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995) proliferam formando uma linha de células chamadas de *bands of Büngner*, as quais suportam

o crescimento axonal (KOEPPEN, 2004). Também é conhecido que células de *Schwann*, macrófagos, e fibroblastos no segmento distal do nervo expressam uma grande variedade de moléculas neurotróficas incluindo NGF, desta forma gerando um ambiente de suporte para a regeneração do axônio (HEUMANN *et al.*, 1987; VARGAS: BARRES, 2007, pág.162). O TNF tem importante papel no recrutamento de macrófagos (LIEFNER *et al.*, 2000). Macrófagos estimulados por fragmentos de mielina liberaram IL-12 e TNF $\alpha$  e este último pode atuar novamente de forma autócrina nos macrófagos. Sugerindo que TNF $\alpha$  e IL-12 podem potencializar ou regular a atividade dos macrófagos na fagocitose dos *debris* de mielina no nervo sob DW (CONSTANTINESCU *et al.*, 2000). O TNF- $\alpha$  induz a produção de metaloproteases (MMP-9) em macrófagos e células de *Schwann* e estas por sua vez facilitam a infiltração de macrófagos hematogênicos para o interior do nervo periférico lesado (SHUBAYEV; MYERS, 2000; MYERS *et al.*, 2001). Parece que o TNF tem papel importante também na fagocitose imuno-mediada, pois os genes que codificam o TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  também estão envolvidos com a expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (SPIES *et al.*, 1986; MULLER *et al.*, 1987).

O TNF- $\alpha$  pode também ter um efeito benéfico indireto na regeneração neural, através da ativação de outras citocinas. Como já mencionado, TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a produção de IL-1  $\beta$  (DINARELLO *et al.*, 1986), e a IL-1  $\beta$  induz a produção de IL-6 (VAN DAMME *et al.*, 1987). E a IL-6 parece ter tido efeito regenerativo, visto que camundongos *knock-out* para IL-6 exibiram potencial de ação sensitivo diminuído e regeneração do nervo sensorial retardada (ZHONG *et al.*, 1999). E também a IL-1 $\beta$ , por sua vez, promoveu, *in vivo*, alongamento axonal após injúria de nervo ciático (TEMPORIN *et al.*, 2008).

Segundo Qin e Cheng (2007), o TNF- $\alpha$  e IL-6 estão envolvidos no controle neuronal e na ativação glial, proliferação, diferenciação e sobrevivência glial, desta forma influenciando a plasticidade neuronal e glial, degeneração, como também no desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso.

### **Os receptores do TNF- $\alpha$**

Estudos têm demonstrado que o TNFR1 está envolvido em sinalização intracelular que desencadeia inflamação e sobrevivência celular. Em resposta a um único ligante (TNF), TNFR1 pode, contraditoriamente, mediar sinalização apoptótica. Em contraste, TNFR2 está envolvido na transdução de sinais principalmente para sobrevivência e inflamação (MAK & YEH, 2002). TNFR1 também está envolvido com a ativação de fibroblastos (BAO *et al.*,

2003) Logo, a ação do TNF- $\alpha$  *in vivo* pode ser complicada dependendo da expressão das diferentes populações dos subtipos de receptores (KITAOKA, 2006) ao longo do curso da DW.

Através de estudos com ELISA, foram investigados os níveis TNFR1 e TNFR2 no endoneuro após constrição crônica do nervo ciático em camundongos. O TNFR2 (inflamatório) foi muito marcado já no 1º dia após lesão e aumentou de sete vezes mais no 3º e 7º dia pós-lesão (SOOMER, 2005). Após trauma de medula espinal esta precocidade da expressão do receptor TNFR2 foi confirmada, embora com diferença de poucas horas (4 horas) nos picos de expressão de cada (YAN *et al.*, 2003). Concluindo-se que TNFR1 e TNFR2 endoneurais são diferentemente regulados durante DW. E parece que o TNFR2 (sobrevivência e inflamação) é precocemente expressado.

Camundongos nocaute para TNF mostraram um significativo retardo no início da doença e uma notável redução da desmielinização na encefalomielite autoimune experimental (EAE) induzida por glicoproteína mielínica de oligodendrócitos (MOG). Em contraste, o curso da doença em ratos nocautes para TNFR2 foi severo e associado com notável desmielinização. Concluindo-se que a indução da EAE/MOG e a desmielinização está associada ao receptor TNFR1, e TNFR2 teria um papel protetor na EAE. No entanto quando estes animais recebiam múltiplas doses de TNF antes da indução com MOG estes animais não desenvolviam a doença (EUGSTER *et al.*, 1999). Um outro estudo de Shen *et al.* (1997) também demonstra o papel neuroprotetor do receptor TNFR2 em linhagem de células neuronais humanas. Estes dados indicam que o TNF demonstra possuir mais do que apenas efeitos negativos em oligodendrócitos. O completo quadro do TNF no cérebro é mais complexo do que se tem previamente pensado.

Por outro lado, em um estudo de Lu *et al.*, (2007) com Neurite Autoimune Experimental (EAN) foi demonstrado que camundongos deficientes para TNFR1 apresentaram sinais clínicos aumentados e em paralelo com aumento de células inflamatórias infiltradas no nervo periférico e proliferação de células T, como também um notável aumento da expressão de MHC classe II e CCR3 nos macrófagos na cauda equina. Estes dados sugerem que o TNF (mais precisamente o receptor TNFR1) pode ter um efeito antiinflamatório prevenindo o desenvolvimento da EAN neste modelo animal (LU *et al.*, 2007). E como se pode observar o TNFR2 teria efeitos inflamatórios proliferativos que seriam prejudiciais neste modelo de doença auto-imune. Logo, pode-se sugerir também que o modelo ou a patologia avaliada em questão é também importante para se concluir se TNF- $\alpha$  e seus receptores possuem ações benéficas ou prejudiciais.

Em suma, TNFR2 teria um papel protetor na encefalomielite auto-imune experimental (EAE), e TNFR1 pode ter um efeito antiinflamatório prevenindo o desenvolvimento da neurite auto-imune experimental (EAN). Parece que oligodentrócitos (SNC) e células de *Schwann* (SNP) possuem mecanismos de transdução diferentes para cada receptor de TNF.

Os diferentes modelos de localização dos receptores de TNF- $\alpha$  nas células gliais e neuronais, os seus estados de ativação e os efetores de atividade subliminar (*down-strem*), são todos considerados possuir um importante papel em determinar se TNF- $\alpha$  irá exercer efeitos benéficos ou prejudiciais no SNC (revisto por FIGIEL, 2008).

Também se sugere que a estimulação aguda ou crônica do TNF- $\alpha$  por células de *Schwann* na inflamação de nervo periférico pode ser crítica na determinação se TNF irá desencadear efeito ativacional (inflamatório) ou citotóxico (QIN; CHENG, 2007).

### **TNF- $\alpha$ na adaptação do alongamento do nervo, sem ocorrer injúria neural.**

Por outro lado, parece que o TNF- $\alpha$  também estar envolvido em papéis adaptativos do nervo, pois um interessante trabalho no campo da cirurgia ortopédica, através da utilização de um “alongador” para fêmur de rato (sem causar injúria ou inflamação no nervo), demonstrou as variações das citocinas de acordo com o alongamento gradual do nervo ciático. E pôde-se constatar que somente a expressão de RNAm para TNF- $\alpha$  estava aumentada nos nervos que sofreram o aumento gradual no comprimento. Enquanto que não houve nenhuma alteração na expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5. Vale ressaltar que outros autores relatam que o alongamento de nervo não desencadeia DW, e em adição, realmente comprovou-se que o TNF- $\alpha$  foi produzido por células de *Schwann* não proliferativas. Sugerindo-se que talvez o TNF- $\alpha$  tenha um papel crítico na adaptação do nervo periférico em alongamento (HAGIWARA *et al.*, 2005).

### **TNF $\alpha$ e TNF $\beta$ estão envolvidos na homeostase do cálcio intracelular:**

Dados recentes indicam que fatores neurotróficos e citocinas utilizam mecanismos de transdução similares. Embora fatores neurotróficos podem proteger neurônios do SNC contra uma variedade de insultos, o papel das citocinas na respostas às injúrias é obscuro. De acordo com os experimentos realizados, reporta-se que TNF $\beta$  e TNF $\alpha$  (1-100ng/ml) podem proteger cultura de hipocampo embrionário de rato, neurônios septais e corticais, contra injúria induzida por privação de glicose e toxicidade de aminoácidos excitatórios. A elevação da

concentração do cálcio intracelular ( $[Ca^{++}]_i$ ) induzida por privação de glicose, glutamato, NMDA ou AMPA foi atenuada em neurônios pré-tratados com  $TNF\beta$ . O mecanismo pelo qual TNFs estabiliza as  $[Ca^{++}]_i$  pode envolver regulação da expressão de proteínas envolvidas na manutenção da homeostase da  $[Ca^{++}]_i$ , uma vez que ambos  $TNF\beta$  e  $TNF\alpha$  causaram aumento de 4 a 8 vezes na expressão de proteína ligante de cálcio – Calbindin- $D_{28k}$  em neurônios. Estes dados sugerem um papel neuroprotetor para o TNF na resposta cerebral à injúria (CHENG; CHRISTAKOS; MATTSON, 1994).

A GBP poderia induzir aumento da expressão de TNF no nervo talvez através das alterações das concentrações intracelulares de  $Ca^{++}$ , uma vez que a GBP pode diminuir estas concentrações e que, como foi relatado acima, o TNF estabiliza estas  $[Ca^{++}]_i$  em respostas às injúrias no SNC. Embora, segundo os relatos acima, a liberação do TNF esteja relacionada ao aumento da  $[Ca^{++}]_i$  que ocorre em resposta às injúrias. Resta saber também se a síntese e liberação de TNF é também sensível às reduções nas  $[Ca^{++}]_i$  no nervo, o que poderia explicar o mecanismo de ação da GBP no aumento desta citocina. Por outro lado, o aumento da produção de  $TNF-\alpha$  poderia ocorrer devido a ativação de células do perineuro somente e não do próprio neurônio, desconsiderando-se esta suposição acima mencionada.

### **Gabapentina, IL-1 e regeneração:**

De acordo com os resultados, a dose de GBP 60mg/kg provocou um aumento significativo de 59,26% na expressão de Interleucina-1 em relação ao grupo salina avaliado pelo método de ELISA. Já a dose de 120mg não provocou expressão de IL-1 significativamente diferente do grupo salina. Semelhante ao efeito da GBP na expressão da mieloperoxidase (MPO), a dose de 60mg provocou aumento de 982,16% na atividade da MPO no nervo em relação ao grupo salina e, no entanto, a dose de 120mg produziu uma expressão de MPO bem inferior, semelhante a expressão do grupo salina.

Estimulação de células com IL-1 inicia uma cascata de eventos de sinalização, incluindo ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kappaB) e uma quinase de N-Terminal do c-jun (c-jun N-terminal Kinase - JNK), ambas as quais aumentam a expressão de vários genes inflamatórios no núcleo (DINARELLO *et al.*, 1996).

Em estudo com animais de rápida DW e com animais mutantes que apresentam lenta DW, foi demonstrado que a produção de proteínas de  $TNF-\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi deficiente nos animais mutantes com *Slow-WD* (Wlds - *Wallerian degeneration slow mouse*), e que  $TNF-\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem então acelerar a DW. Segundo Shamash et al (2002),  $TNF-\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e

IL-1 $\beta$  podem regular, indiretamente, o recrutamento de macrófagos, a remoção de mielina, regeneração, e dor neuropática (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002).

O aumento relevante de 59,26% na expressão de IL-1 nos nervos de animais tratados com GBP 60mg/kg, verificado na dosagem por ELISA, pode ter sido conseqüente ao aumento da expressão de TNF provocado pela GBP na mesma dose. Uma vez que o TNF induz a produção de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986). Foi proposto que TNF ativa uma cascata de liberação de citocinas (CUNHA *et al.*, 1992a; LORENZETTI *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 1988; THOMAZZI, 1996). Em um modelo de sepse experimental foi sugerido que TNF é um dos primeiros mediadores secretados em resposta a um estímulo nocivo. Dentre os mediadores que são liberados em resposta ao TNF estão as citocinas IL-1 e IL-6 (FONG & LOWRY, 1990).

### **IL-1 e fagocitose imuno-mediada**

IL-1 tem ações inflamatórias, hematopoiéticas, imunológicas, metabólicas e fisiológicas (DINARELLO *et al.*, 1991), sendo que dentre estas as mais conhecidas são as ligadas a mecanismos imunes e inflamatórios, sendo bastante conhecidas as suas propriedades de ativar linfócitos (designada anteriormente como Fator Ativador de Linfócitos-LAF, GERY *et al.*, 1972). O aumento relevante da expressão de IL-1 $\beta$  provocado por GBP 60mg/kg nos faz acreditar, deixando de lado as implicações inflamatórias e hiperalgésicas já discutidas, que os mecanismos imunológicos também estarão intensificados no nervo com CCNC de animais tratados com GBP. Estes mecanismos imunológicos também podem ser importantes na remoção dos fragmentos de mielina e fragmentos de axônios. Anticorpos possuem importante papel na remoção dos fragmentos de mielina no SNP. Anticorpos naturais são produzidos por linfócitos B-1 e são também anticorpos IgM de baixa afinidade normalmente presentes no soro sem estimulação de antígenos exógenos. Anticorpos IgM naturais ligam-se a lisofosfatidilcolina (LPC) e fosforicolina (PC) (KIM *et al.*, 2002) os quais aparecem na superfície de células mortas, fragmentos de células e bactérias. Além disso, LPC e PC podem ser produzidos por fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) durante a DW. Bloqueio de PLA<sub>2</sub> resulta em fagocitose de mielina e axônio marcadamente lenta na DW do SNP (DE *et al.*, 2003). Estas observações respaldam a possibilidade dos anticorpos naturais promoverem a remoção dos fragmentos de mielina ricos em lipídios. Além do mais, anticorpos para gangliosídios e proteína básica de mielina (PBM) estão presentes durante DW, e anticorpos para proteína de mielina periférica (PMP22) são detectáveis em 70% dos pacientes na neuropatia hereditária

Charco-Marie-Tooth 1A (CMT1A). Estes achados sugerem que as produções de anticorpos têm importante papel na DW. Receptores Fc ( $\gamma$ RI e  $\gamma$ RIII) expressos nas superfícies dos macrófagos reconhecem anticorpos IgG, desta forma disparando sinais para iniciar a fagocitose nos macrófagos. Anticorpos IgG foram observados se acumulando dentro do segmento do nervo distal por volta do 6º dia após lesão, coincidindo com o influxo de macrófagos periféricos. E em animais deficientes de células B a remoção de mielina e o influxo de macrófagos estavam significativamente retardados por uma semana. Estes achados indicam que os auto-anticorpos para degeneração de nervos ajudam a mediar a rápida remoção da mielina em degeneração. Estes achados também demonstram que a remoção de mielina no SNP está dividida em duas fases: Uma fase precoce independente de anticorpos mediada por células de *schwann* e outra fase tardia dependente de anticorpos mediada por fagócitos hematógenos (revisto por VARGAS & BARRES, 2007, pág. 166).

A opsonização dos fragmentos de mielina pelos anticorpos poderia desencadear a ligação e a ativação de proteínas do sistema complemento. A ativação dos receptores complemento e receptores Fc nos macrófagos sinergisticamente ativam a fagocitose. Fagocitose por macrófagos dos fragmentos dos nervos é fortemente dependente de opsonização. Opsoninas são moléculas que encobrem os fragmentos extracelulares desta forma marcando especificamente para posterior remoção por macrófagos. Desta forma, opsoninas controlam potentemente a fagocitose. Os macrófagos expressão receptores de superfície que reconhecem opsoninas específicas. A barreira hemato-neural no SNP é comprometida dentro de 48 h ao longo do nervo, permitindo que as opsoninas hematogênicas penetrem no nervo em degeneração. Os três principais grupos de opsoninas normalmente encontradas no soro sanguíneo são complementos, pentraxinas, e anticorpos. Vários estudos têm demonstrado que o sistema complemento contribui para a remoção dos fragmentos durante a DW (revisto por VARGAS & BARRES, 2007, pág. 166).

Muitas evidências sugerem que degeneração retardada produz detrimientos na regeneração do axônio. O atraso do curso temporal na remoção de mielina do SN e a conseqüente extensa presença de fatores inibitórios do crescimento de axônios associados à mielina (incluindo a glicoproteína associada à mielina – MAG) provocam efeitos prejudiciais na regeneração dos axônios. De fato, a lenta DW em nervos do SNP exibida nos camundongos mutantes *Wld<sup>s</sup>* (Wallerian Degeneration Slow mouse) é acompanhada por uma regeneração diminuída de axônios sensitivos e motores. Além disso, estudos *in vivo*, demonstram que a depleção do sistema complemento retarda a regeneração de axônios após injúria de nervo periférico (revisto por VARGAS & BARRES, 2007, pág. 166, 167).

### Efeitos maléficos da IL-1

IL-1 $\beta$  é raramente considerada um alvo terapêutico em virtude dos seus efeitos pro-inflamatórios. Muitos estudos descrevem possibilidades terapêuticas com agentes inibidores da sua ação, tais como anticorpos anti-IL-1, antagonistas de receptores de IL-1 e inibição de caspase-1, a qual converte pró-IL-1 $\beta$  em IL-1 $\beta$  madura reduzindo assim os danos de isquemia cerebral (ALLAN *et al.*, 2005; BASU *et al.*, 2004; TOUZANI *et al.*, 1999). IL-1 $\beta$  pode também contribuir para formação de placa e morte neuronal pelo aumento de expressão de  $\beta$ -amilóide. O aumento da produção de IL-6 por IL-1 $\beta$  ou TNF $\alpha$  pode afetar o curso das doenças neurodegenerativas. Visto que RNAm para proteína amilóide é induzida por IL-6 em neurônios corticais de ratos, indicando um possível papel para esta citocina na deposição de  $\beta$ -amilóide na doença de Alzheimer's (DEL *et al.*, 1995).

### Efeitos benéficos da IL-1

Porém, efeitos benéficos da IL-1 $\beta$  também são relatados. Sugere-se que IL-1 $\beta$ , induzindo expressão de IL-6 em células neuroendócrinas, pode prover estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores neuroendócrinos e hematopoiéticos (SPANGELO *et al.*, 1995). A Interleucina IL-1 $\beta$  derivada de macrófagos estimulou as células de Schwann e fibroblastos a induzirem a síntese de NGF no nervo ciático (LINDHOLM *et al.*, 1987; 1988), o qual promove sobrevivência neuronal e alongamento axonal. A neutralização com um antagonista para o receptor de IL-1 $\beta$  impediu a regeneração neural (GUENARD *et al.*, 1991). É interessante notar que entre o 3º e 14º dia pós-injúria existe um aumento de cinco a sete vezes na expressão de RNAm para NGF no segmento distal do nervo ciático (HEUMANN *et al.*, 1987) A expressão de proteínas de IL-1 ao longo da DW é aproximadamente no mesmo período (GEORGE *et al.*, 2000). Ver figura 8.

A IL-1 $\beta$  promoveu proliferação de células de Schwann *in vitro* (CONTI *et al.*, 2002) e também induziu migração de macrófagos durante a DW e estes são importantes na remoção de mielina, a qual facilita o crescimento axonal (PERRIN *et al.*, 2005). Além do mais, considerando-se que IL-1 $\beta$  induz IL-6, também foi relatado que camundongos *knock-out* para IL-6 exibiram potencial de ação sensitivo diminuído. E após injúria neural, regeneração de nervo sensorial foi retardada nestes animais transgênicos, enquanto que as fibras motoras regeneraram normalmente (ZHONG *et al.*, 1999).

Colaborando com os relatos acima, foi relatado que a administração de IL-1 $\beta$  (100ng/ml) ao longo das duas semanas iniciais após injúria, no local da lesão em nervo ciático de ratos, promoveu regeneração em fibras sensitivas (TEMPORIN *et al.*, 2008b). Verificou-se que a função sensitiva melhorou precocemente (em torno da 5ª semana após injúria) para o grupo tratado com IL-1 $\beta$  e a contagem de axônios (através de anticorpo anti-neurofilamento-NF 200) também estava significativamente aumentada neste grupo. Logo seus resultados sugerem que IL-1 $\beta$  promove alongamento axonal de fibras sensitivas após injúria de nervo ciático.

### **IL-1 pode não prejudicar a remielinização:**

No presente estudo, apesar do aumento de expressão de 59,26% da IL-1 $\beta$  provocado pela GBP, tem-se a expectativa de que a IL-1 $\beta$  não iria prejudicar a remielinização, apesar desta suposta possibilidade. Pois, como já comentado, a IL-1  $\beta$  promove proliferação de células de *Shwann in vitro* (CONTI *et al.*, 2002), logo, IL-1 $\beta$  poderia opor-se a remielinização no SNP uma vez que a proliferação ocorre num estágio de não diferenciação enquanto que mielinização ocorre em estágio de diferenciação das células de *Shwann* (HARRISINGH *et al.*, 2004). Mas, segundo o mesmo trabalho comentado acima (TEMPORIN *et al.*, 2008b), foi demonstrado através de imunoquímica fluorescente, usando anticorpos anti-PBM, que não ocorreu impedimento algum da remielinização observando-se os nervos coletados na 12ª semana pós-injúria, com o tratamento continuado de IL-1 $\beta$  durante as duas semanas iniciais da DW. As áreas de marcação (com anticorpos anti-PBM) estavam inclusive aumentadas para o grupo tratado com IL-1 $\beta$  em comparação com o grupo controle. Também é provável que IL-1 $\beta$  endógena seja expressa somente em limitada extensão, num estágio precoce da DW e desaparece logo em seguida, quando as células de *Schwann* necessitam remielinizar. (GILLEN *et al.*, 1998; JANDER; STOLL, 1998; SHUBAYEV; MYERS, 2000; MENGE *et al.*, 2001).

Na fase inicial depois da lesão neural, os axônios necessitam se alongarem sob um ambiente não favorável onde permanece os resíduos de mielina, e realmente a proteína RhoA (*Ras Homolog gene family member A*, proteínas envolvidas na regulação e coordenação temporal da divisão celular) a qual inibe o alongamento dos neuritos, está ativada em motoneurônios 24 horas após a injúria do nervo ciático (HIRAGA *et al.*, 2006). A proteína RhoA é ativada pelo inibidor MAG (glicoproteínas associadas a mielina) (HIRAGA *et al.*, 2006). Desta forma, a inibição da RhoA, especialmente em estágios precoces da DW em nervo periférico, pode aumentar a extensão axonal. E recentemente foi demonstrado que IL-

1 $\beta$  inibiu a atividade do RhoA nos neurônios e promoveu crescimento dos neuritos *in vitro* (TEMPORIN *et al.*, 2008a). Apesar da expressão de IL-1 $\beta$  estar aumentada após injúria em nervo ciático isto parece ser insuficiente para os neurônios motores (HIRAGA *et al.*, 2006).

### **Considerações finais sobre a IL-1**

Desta forma IL-1 $\beta$  possui diversas ações com relação à regeneração neural (WYSS-CORAY & MUCKE, 2002). Os efeitos opostos à regeneração neural podem estar relacionados ao grau e ao curso temporal da inflamação, uma vez que inflamação excedente ou intempestiva (anacrônica, descoordenada) induz morte neuronal provocando degeneração neural (ALLAN & ROTHWELL, 2001). Por outro lado se os processos inflamatórios são moderados e sincronizados, estes podem ajudar a regeneração neural. No SNP, aumento expressivo de IL-1 $\beta$  imediatamente após lesão neural e sua subsequente atenuação pode contribuir, como visto acima, no alongamento axonal, sobrevivência neuronal, recrutamento de macrófagos, proliferação de células de *schwann*, e subsequente remielinização. Desta forma é importante controlar a inflamação para assegurar que esta ocorra em grau apropriado e em tempo correto.

### **Gabapentina e IL-10.**

Como já comentado, a IL-10 é uma citocina de caráter antiinflamatório e induz a inibição da liberação de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e de outras citocinas em vários tipos de células (MOORE *et al.*, 1993). Na verdade, esta citocina pode bloquear a atividade do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B (WANG *et al.*, 1995).

George *et al.* (2000) utilizando ELISA e RT-PCR demonstraram que os níveis de proteína de IL-10 declinam abruptamente logo após injúria neural em ratos em torno do 3º dia pós-lesão. E foi sugerido que a depleção abrupta de IL-10 logo no início da DW (a partir de 12h após a injúria) seria um dos fatores que aceleram o processo de degeneração, potencializando a expressão do TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e suas ações. Logo se a GBP induz a inibição desta citocina pode então estar acelerando o processo de degeneração. Mais uma vez, se este processo de degeneração inclui a remoção dos resíduos de mielina e axônios, a GBP pode então contribuir com a regeneração neural. Desde que esta inibição de IL-10 seja também coordenada ou limitada ao longo do tempo, ou seja, somente nos primeiros dias após a injúria. Depois da

primeira semana de evolução da DW é realmente necessária a supressão do processo inflamatório e degenerativo para que ocorra normalmente a regeneração neural.

A curva de altos níveis da produção de IL-10, após o 4º dia é determinada pelos picos de recrutamento de macrófagos, os quais produzem grandes quantidades de IL-10. A partir daí a IL-10 inibe a produção das citocinas inflamatórias e de si própria (BE'ERI *et al.*, 1998; De WAAL MALEFYT, 2001), desta forma inibindo a DW (SHAMASH *et al.*, 2002).

No entanto, a inibição da expressão de IL-10 pela GBP não foi provavelmente a causa do aumento da expressão de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observado nos resultados. Uma vez que a dose de 60mg, a qual causou relevante aumento na expressão de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , não causou nenhum efeito significativo na expressão de IL-10. Somente a dose de 120mg realmente deprimiu a expressão desta citocina. Na verdade, se torna difícil especular um mecanismo comum que tenha sido induzido pela GBP provocando aumento de expressão de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e ao mesmo tempo inibindo os níveis de IL-10. Mas é interessante saber que o TNF $\alpha$  aumentou a atividade do fator de transcrição inflamatório NF- $\kappa$ B no nervo óptico (KITAOKA *et al.*, 2006) e em linhagens de células de oligodendroglomas (HUANG, *et al.*, 2002), enquanto que a IL-10 inibe a atividade deste mesmo fator (DRIESSLER *et al.*, 2004).

### **Gabapentina e PBM**

De acordo com os resultados, pode-se verificar através de imunohistoquímica e principalmente através de *Western Blot* com anticorpo anti-PBM, que houve um aumento relevante de 158,06% na expressão de PBM no 15º dia (2ª semana) após CCNC no segmento proximal à ligadura dos nervos do grupo tratado continuamente (12/12 h) com GBP 60mg/kg em comparação com o grupo tratado Salina.

Segundo Setton-Avruj *et al.* (2002), os quais realizaram um estudo temporal (3, 7 e 14 dias) da expressão da proteína básica de mielina (PBM) em nervo ciático de ratos após sua constricção, utilizando métodos de imunohistoquímica e eletroforese (SDS-PAGE), no segmento distal à ligadura ocorreu um pico máximo de expressão de PBM com sete dias após lesão, regredindo em seguida, e no segmento proximal à ligadura um pico máximo de PBM ocorre com 14 dias, motivo pelo qual, também no presente estudo escolhemos este ponto (15º dia) para coleta do nervo e estudo da expressão de PBM através de WB nos segmentos proximais enquanto que os segmentos distais foram coletados para estudo histológico (ver metodologia). Segundo estes mesmos autores, este aumento da intensificação do sinal de PBM no 14º dia ainda não é totalmente conhecido, entretanto, pode ser devido a uma parcial

degradação de proteína permitindo assim uma alta adesão dos anticorpos (Anti-PBM utilizados no ensaio). Este processo ocorre de forma mais dramática no segmento distal e de forma mais lenta no segmento proximal.

Pode-se comprovar isso através da ordem cronológica em que os eventos acontecem: Como uma pronta resposta à perda axonal, células de *schwann* se tornam indiferenciadas, diminuem a síntese de proteínas mielínicas dentro de dois dias (LEBLANC AND PODUSLO, 1990), proliferam, seqüestram pequenos pacotes de *debris* de mielina, fragmentam sua própria bainha de mielina transformando-as em formações “ovóides”(STOLL *et al.*, 1989; MARTINEZ; CANAVARRO *et al.*, 2000), continuam proliferando e formam a partir do 3º dia uma linha de células chamada de “*bands of Bungner*” as quais servem de apoio para guiar as fibras em regeneração (STOLL *et al.*, 1989; LIU *et al.*, 1995). Influxo de macrófagos periféricos para o endoneuro ocorre a partir do 6º dia quando começa a remoção (fagocitose) da mielina pelos macrófagos (BEUCHE; FRIEDE, 1984; STOLL; HARTUNG; 1992; BRÜCK *et al.*, 1996, BRÜCK 1997). De acordo com estes dados verifica-se que provavelmente não ocorre síntese de proteína ou mielina significativa até o 14º dia da DW. Os picos de PBM observados no 7º dia (segmento distal) e no 14º (segmento proximal) devem-se a fragmentação da bainha de mielina e formação ovóides e depois formação das faixas de *Bungner*. Como já comentado, estes processos são dependentes da ativação das células de *Shwann*. Após estes picos de expressão de PBM (depois do 7º dia nos segmentos distais e depois de 14 dias nos segmentos proximais) neste estudo de Setton-Avruij *et al.*, (2002) foi observado um decréscimo da expressão de PBM, que coincide com o mesmo tempo que ocorre o alto número de macrófagos hematogênicos invadindo a periferia dos nervos lesionados (AVELLINO *et al.*, 1995) deduzindo-se que este decréscimo ocorra devido à fagocitose e degradação da mielina, sendo que no segmento proximal este processo ocorra mais lentamente (depois do 14º dia). De fato, macrófagos produzem altos níveis de metaloproteases (MMPs) após a injúria de nervo periférico (WEE YONG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996). Metaloproteases podem quebrar a mielina e especificamente promover a digestão da PBM (MATYSZAK; PERRY, 1996; CHANDLER *et al.*, 1997; PROOST *et al.*, 1993). Este decréscimo após o pico de expressão de PBM também se deve a *downregulation* na expressão dos genes para MBP, após a injúria do nervo ciático (LEBLANC AND PODUSLO, 1990; GUPTA *et al.*, 1993, GILLEN *et al.*, 1995).

A síntese de mielina significativa só deva ocorrer posteriormente no processo de DW, onde a expressão dos genes para síntese de mielina requer um contínuo sinal dos axônios em crescimento (GUPTA, 1993). Logo, pode-se sugerir que até o 15º dia da DW a GBP 60mg no

segmento proximal estudado incrementou a fragmentação da bainha de mielina, surgimento das formações ovóides e provavelmente incrementou a formação das bandas de *Bungner* através da intensa ativação das células de *Shwann* e macrófagos em função do aumento da expressão do TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  provocado pelo tratamento crônico com GBP 60mg, como já demonstrado. Mais uma vez sugerindo que a GBP pode acelerar o processo de degradação e remoção dos fragmentos de mielina e axônios e assim proporcionando condições favoráveis à regeneração.

No presente estudo, GBP, através da indução do TNF $\alpha$ , pode ter induzido uma intensa fragmentação parcial da bainha de mielina a qual pode ter deixado mais disponível os fragmentos de proteína de mielina se tornando alvos mais fáceis para serem encontrados pelos anticorpos (anti-PBM) durante os *blots* do imunoensaio (SETTON-AVRUJ *et al.*, 2002) explicando então a expressão aumentada de PBM nos nossos resultados no 15º dia em relação ao grupo CCNC tratado com salina.

### **Considerações finais**

Neste atual momento seria muita pretensão especular o mecanismo de ação do tratamento crônico com a GBP na indução das citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e inibição da IL-10. Embora ocorra em comum a presença da participação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Porém, o seu mecanismo na indução do aumento de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no nervo possa ser mesmo em nível intracelular visto que, nos estudos de Hendrich *et al.* (2008) com canais de cálcio e subunidades  $\alpha 2\delta$ -2, a GBP atuou primeiramente em alvos intracelulares requerendo captação para o interior da célula. Pois o uso de bloqueadores do Sistema-L de transporte de aminoácidos bloqueou os efeitos da GBP cronicamente aplicada, e a co-expressão de um transportador aumentou seus efeitos inibitórios no influxo de cálcio. Na verdade, seus efeitos no influxo de cálcio a nível superficial, em receptores de membrana existem, mas são mais sutis. (HENDRICH *et al.*, 2008)

Macrófagos e células de *schwann* demonstraram cooperar na degradação da mielina, gerando condições favoráveis para regeneração subsequente (FERNÁNDEZ-VALL *et al.*, 1995; SHEN *et al.*, 2000; BAICHWAL *et al.*, 1988; STOLL *et al.*, 1999; HIRATA *et al.*, 1999). Em adição, segundo Hall (1978), a rápida proliferação das células de *Schwann* (3 a 4 dias após à lesão) é o evento decisivo para promover a regeneração do axônio. Se TNF $\alpha$  induz a ativação das células de *Schwann* e macrófagos e se GBP aumenta a expressão de TNF poderia se sugerir que GBP teria um papel positivo e indireto na regeneração do nervo.

Como já comentado, o processo inflamatório após axotomia tem um papel benéfico na reparação neural (STOLL; JANDER; MYERS, 2002). Para que a GBP tenha um efeito benéfico na regeneração neural é de se esperar que tenha efeito pró-inflamatório somente no início da DW (primeira semana), onde já existe naturalmente o processo inflamatório, e onde o TNF e IL-1 teriam também um papel benéfico, através da ativação das células de *Schwann* e macrófagos e conseqüente degradação e remoção precoce da bainha de mielina, como demonstrado com o aumento da expressão de PBM, o que iria repercutir em um alongamento dos axônios e remielinização mais rápidos. É possível também que estas citocinas, numa fase mais tardia da DW, e em concentrações menores, tenham também algum papel benéfico na remielinização como alguns estudos têm tentado demonstrar.

Parece que não existem citocinas malélicas ou benéficas, seus efeitos benéficos podem resultar de uma harmonia conseqüente entre os seus níveis de concentração, a expressão dos seus receptores, e principalmente a fase no curso temporal da evolução da neuropatia onde atuaria estas citocinas.

Sugere-se que os efeitos pro-inflamatórios da GBP só ocorreram no período de tempo onde já existia inflamação, ou seja, no período inicial da DW (primeira semana p.o.), pois no 15º dia de tratamento com GBP 60mg/kg ao coletarmos os nervos e avaliarmos macroscopicamente estes se apresentavam sem inflamação alguma, com diâmetro e coloração aparentemente normal.

## **CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

1. O modelo de neuropatia induzido por constrição crônica do nervo ciático (BENNETT & XIE, 1989, modificado por Sommer and Myers, 1995) foi reproduzido, ocorrendo manifestações de dor crônica como a alodínia mecânica, térmica, e comportamentos espontâneos de dor: *scratching e biting*, já no 5º dia de evolução após a CCNC em animais tratados com o diluente salina.
2. O tratamento crônico com gabapentina (60mg e 120mg) produziu efeitos antinociceptivos relevantes em fase precoce da neuropatia (no 5º dia após a CCNC). Visto que inibiu comportamentos espontâneos sugestivos de dor crônica: *scratching e biting* e também produziu efeitos anti-alodínicos e anti-hiperalgésicos significativos, sem inibição as respostas motoras.
3. O tratamento ao longo de cinco dias com as doses de 60mg e 120mg em animais com CCNC e animais intactos produziu um aumento significativo dos comportamentos *Rearing, Climbing e Walking* em relação ao grupo controle salina. Isto sugere que a GBP nestas doses, independente da neuropatia, aumenta a atividade motora dos animais para empinar-se, escalar ou andar, talvez por causarem efeito excitante, aumentando a curiosidade ou talvez alguma sensação de “bem estar” dos animais.
4. A dose elevada de GBP (240mg/kg) aplicada cronicamente causou efeito pronociceptivo no teste de hiperalgesia térmica (46°C) e alodínia ao frio (10°C).
5. O tratamento crônico com GBP (60 e 120mg) em animais intactos demonstrou atividade pró-inflamatória relevante, pois aumentou o edema de pata induzido por carragenina.
6. Os efeitos pró-inflamatórios do tratamento crônico com a GBP(60 e 120mg) em animais intactos provavelmente envolvem o aumento da migração de neutrófilos, visto que também aumentou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.

7. O tratamento crônico com GBP (60mg) produziu atividade pró-inflamatória devido à migração de células também no nervo ciático com constrição crônica, visto que aumentou relevantemente a expressão da mieloperoxidase, uma enzima marcadora da presença de células inflamatórias.
8. A amplificação da resposta inflamatória observada no desenvolvimento da neuropatia em animais tratados cronicamente com a GBP ocorreu provavelmente devido ao aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias, visto que a GBP (60mg) aumentou a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a GBP (120mg) diminuiu a expressão de IL-10 (citocina anti-inflamatória) no nervo ciático com constrição crônica. Estes efeitos podem contribuir, pelo menos em parte, com a regeneração neural.
9. O tratamento ao longo de 15 dias com a GBP (60mg/kg) produziu relevante aumento na expressão da proteína básica de mielina (PBM) no nervo com constrição crônica. Isto sugere que a GBP, através da indução do aumento de expressão do TNF- $\alpha$ , produziu maior degradação e remoção dos fragmentos de mielina, proporcionando condições favoráveis para a regeneração neural.

## REFERÊNCIAS

- ALI, Z.; RINGKAMP, M.; HARTKE, T. V.; CHIEN, H. F.; FLAVAHAN, N. A.; CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. **J. Neurophysiol.**, v. 81, p. 455-466, 1999.
- ALEY K.O., McCARTER G, LEVINE J.D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **J. Neurosci.**, v. 18, p.7008-7014, 1998.
- ALLOISI, A. M.; PORRO, C. A.; CAVAZZUTI, M.; BARALDI, P.; CARLI, G. "Mirror, Pain" in the Formalin test: Behavioral and 2-deoxy-glycose studies. **Pain**, v. 55, p. 267-273. 1993.
- ALVES, N. D. Estudo comportamental-farmacológico do possível efeito analgésico da vigabatrina (gama-vinil-GABA) em dor neuropática crônica experimental. 1997. 133 f. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.
- ALVES, N. D.; De CASTRO-COSTA, C. M.; CARVALHO, A. M.; SANTOS, F. J. C.; SILVEIRA, D. Possible analgesic effect of vigabrin in animal experimental chronic neuropathic pain. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 57, n. 4, p. 916-920, dez. 1999.
- ANDREWS *et al.*, 1990
- ASIPU, A.; BLAIR, G. E. Regulation of myelin basic protein-encoding Gene transcription in rat oligodendrocytes. **Gene**, v. 150, p. 227-234, 1994.
- ATTAL, N.; JAZART, F.; KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, v. 41, p. 235-251, 1990.
- ASHCROFT. S.J.; ASHCROFT F.M.; The sulfonylurea receptor. **Biochem Biophys Acta.**, v 1175, p. 45-59, 1992.
- ASIPU, A., BLAIR, G.E..Regulation of myelin basic protein-encoding gene transcription in rat oligodendrocytes. **Gene**, v.150, p.227-234, 1994.
- AURON, P. E.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J.; MUCCI, S. F.; RICH, A.; WOLFF, S. M.; DINARELLO, C. A. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.790711, 1984.
- BACK, S. K.; WON, S. Y.; HONG, S. K.; NA, H. S. Gabapentin relieves mechanical, warm and cold allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. **Neurosci. Lett.**, v. 368, n. 3, p. 341-344, Sept. 2004.
- BACKONJA, M. Anticonvulsants (antineuropathics) for neuropathic pain syndromes. **Clin. J. Pain**, v. 16, p. S67-S72, 2000.

BACKONJA, M.; GLANZMAN, R. L. Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. **Clin. Ther.**, v. 25, n. 1, p. 81-104, Jan. 2003.

BAO, L.; LINDGREN, J.U.; ZHU, Y.; LJUNGGREN, H.G.; ZHU, J. Exogenous soluble tumor necrosis factor receptor type I ameliorates murine experimental autoimmune neuritis. **Neurobiol. Dis.**, v.12(1), p. 73-81. 2003

BARTOSZYK, G.D.; MEYERSON, N.; REIMANN, W.; SATZINGER, G.; VON HODENBERG, A. Gabapentin. In: Meldrum, B.S.; PORTER, R.J. (Eds.). **New Anticonvulsant Drugs**. John Libbey, London, p. 147-163, 1986.

BASBAUM, A.I. Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. **Exp. Neurol.**, v. 42, P. 490-501, 1974.

BE'ERI, H.; REICHERT, F.; SAADA, A.; ROTSHENKER, S. The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 2707-2713, 1998.

BENNETT, D. L.; FRENCH, J.; PRIESTLEY, J. V.; MCMAHON, S. B. NGF but not NT-3 or BDNF prevents the A-fiber sprouting into lamina II of the spinal cord that occurs following axotomy. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 8, p. 211-220, 1996.

BENNETT, G. J. Neuropathic pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, p. 494-510, 1994.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BERGEY, G. K.; MORRIS, H. H.; ROSENFELD, W.; BLUME, W. T.; PENOVICH, P. E.; MORRELL, M. J.; LEIDERMAN, D. B.; CROCKATT, J. G.; LAMOREAUX, L.; GAROFALO, E.; PIERCE, M. Gabapentin monotherapy: I. An 8-day, double-blind, dose-controlled, multicenter study in hospitalized patients with refractory complex partial or secondarily generalized seizures. The US Gabapentin Study Group 88/89. **Neurology**, v. 49, n. 3, p. 739-745, Sept. 1997.

BERTRAND S.; GORDON Y.K. NG; PURISAI M.G.; The anticonvulsant, antihyperalgesic agent Gabapentin is an agonist at Brain  $\gamma$ -aminobutyric acid Type B Receptors negatively Coupled to voltage-dependent calcium channels. **The journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics.**, v. 298 n° 1, p. 15-24, 2001.

BEUTLER, B., GREENWALD, D., HULMES, J.D., CHANG, M., PAN, Y.C.E.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R.; CERAMI, A.; Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature.**, v. 316, p. 552-554, v.143, 168-170, 1985a

BEUTLER, B.; MAHONEY, J.; LE TRANG, N.; PEKALA, P.; CERAMI, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. **J. Exp. Med.**, v. 161, n. 5, p. 984-995, May 1985b.

BEUTLER, B., MILSARK I.W.; CERAMI, A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*. Aug 30; 229(4716), p. 869-871, 1985c.

BISBY MA; CHEN S.; Delayed wallerian degeneration in sciatic nerves of C57BL/Ola mice is associated with impaired regeneration of sensory axons. **Brain Res.**, v.530, p.117-20, 1990.

BLACK R.A.; RAUCH C.T.; KOZLOSKY C.J. PESCHON J.J.; SLACK J.L.; WOLFSON M.F. CASTNER B.J.; STOCKING K.L. REDDY P.; SRINIVASAN S. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385; p. 729-733, 1997.

BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting mechanism for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- $\alpha$  and interleukin 10. **J. Biol. Chem.**, v. 32, p. 23301-23308, 1992.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1549-1555, Dec. 1991.

BOUCHER, T. J.; OKUSE, K.; BENNETT, D. L.; MUNSON, J. B.; WOOD, J. N.; McMAHON, S. B. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 124-127, 2000.

BRIDGES, D., Thompson, S.W.N., Rice, A.s.C., 2001. Mechanisms of neuropathic pain. **Br.J.Anaesth.**, v.87, p.12-26, 2001.

BRUCK W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. **Brain Pathol.** v.7, p.741-752, 1997.

BROWN J.P.DISSANAYAKE V.U.; BRIGGS A.R.; MILIC M.R. GEE N.S..Isolation of the [3H]gabapentin-binding protein/alpha 2 delta Ca<sup>2+</sup> channel subunit from porcine brain: development of a radioligand binding assay for alpha 2 delta subunits using [3H]leucine. **Anal Biochem.**, v.255, p.236-243.

BURGESS, S. E.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H.; MALAN, T. P. JR; VANDERAH, T. W.; LAI, J.; PORRECA, F.; Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but does not initiate, neuropathic pain. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 5129-5136, 2002.

CALCUTT, N.A., CHAPLAN, S.R..Spinal pharmacology of tactile allodynia in diabetic rats. **Br. J. Pharmacol.** v. 122, p. 1478-1482, 1994.

CAMPBELL, J. N. Nerve lesions and the generation of pain. **Muscle Nerve**, v. 24, p. 1261-1273, 2001.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, p. 77-92, 2006.

CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N.; MEYER R.A. et al. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**, v.32, p. 89-94, 1988.

CANTÍ, C.; NIETO-ROSTRO, M.; FOUCAULT, I.; HEBLICH, F.; WRATTEN, J.; RICHARDS, M. W.; HENDRICH, J.; DOUGLAS, L.; PAGE, K. M.; DAVIES, A. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha_2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 32, p. 11230–11235, Aug. 2005.

CARROLL, S.L., MILLER, M.L., FROHNERT, P.W., KIM, S.S. & CORBETT, J.A. Expression of Neuregulin and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J. Neurosci.* 17, 1642–1659 (1997).

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, Sept. 1975.

CARRIER, G.O.; FUCHS, L.C.; WINECOFF, A.P.; GIULUMIAN, A.D.; WHITE, R.E. Nitrovasodiladores relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am. J. Physiol.* v. 273, p.76-84. 1997.

CHANDLER, S. ETAL. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J. Neuroimmunol.* v.72, p.155–161, 1997.

CHAPLAN, S.R., POGREL, J.W., YAKSH, T.L.. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 269, p. 1117-1123, 1994.

CHENG, B.; CHRISTAKOS, S. AND MATTSON M.P.. Tumor necrosis factor protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. 1994.

CHEN, S. R.; XU, Z.; PAN, H. L. Stereospecific effect of pregabalin on ectopic afferent discharges and neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation in rats. **Anesthesiology**, v. 95, n. 6, p. 1473-1479, Dec. 2001.

CHOI B, ROWBOTHAM MC - Effect of adrenergic receptor activation on post-herpetic neuralgia pain and sensory disturbances. **Pain**, v. 69, p. 55-63, 1997.

COWAN, H.A.; KHUNAWAT, P.; ZHU, Z.X.; GMEREK, D.E. Current concepts: IV. Effects of bombesin on behavior. **Life Sci.**, v.37, p.135-145, 1985.

CODERRE, T. J.; GRIMES, R. W.; MELZACK, R. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. **Pain**, v. 26, p. 61-84, 1986.

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

COLPAERT, F. C.; De WITTE, P.; MAROLI, A. N.; AWOUTERS, F.; NIEMEGERES, C. J.; JANSSEN, P. A. Self-Administration of the analgesic suprofen in arthritic rats: Evidence

of *Mycobacterium butyricum* induced arthritis as an experimental model of chronic pain. **Life Sci.**, v. 27, n. 11, p. 921-928, 1980.

CONSTANTINESCU CS; GOODMAN DBP; HILLIARD B; WYSOCKA M; COHEN JA. Murine macrophages stimulated with central and peripheral nervous system myelin or purified myelin proteins release inflammatory products. *Neurosci Lett*, v.287, p.171-174, 2000.

CONTENT, J.; De WIT, L.; POUPART, P.; OPPENARKER, G.; VAN DAMME, J.; BILIAU, A. Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. **Eur. J. Biochem.**, v. 152, p. 253, 1985.

CORNBROOKS CJ; CAREY DJ; McDONALD JA; TIMPL R; BUNGE RP. In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**,v.80, p 3850-54, 1983.

CRUCCU G, ANAND P, ATTAL N, GARCIA-LARREA L, HAANPÄÄ M, JØRUM E, SERRA J, JENSEN TS. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. **Eur J Neurol.**; v.11, p. 153-62. 2004.

CUNHA F.Q.; FERREIRA S.H. The release of neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur J Pharmacol.**, v. 129(1-2), p.65-76, 1986.

CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S.; et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br. J. Pharmacol.* 104: 765, 1991.

CUNHA, F.Q., MONCADA, S. AND LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 182: p. 1155, 1992b.

CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA; S.H. The pivotal role of tumor Necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* v. 107, p. 660, 1992a.

CUNHA J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 6, p. 1418-1424, July 2000.

DAVIS, A.J., PERKINS, M.N. Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* 33: 127, 1994.

DE CASTRO-COSTA, M.; De SUTTER, P.; GYBELS, J.; VAN HEES, J. Adjuvant induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 13, n. 2, p. 205-206, June 1981.

DE CASTRO-COSTA, M.; GYBELS, J.; KUPERS, R.; HEES, J. V. Scratching behavior in arthritic rat: a sign of chronic pain or itch?. **Pain**, v. 29, p.123-131, 1987.

DE SOUZA G.E.; FERREIRA S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** , v. 17(1); 97-103. 1985.

DE VRY, J.; KUHL, E.; FRANKEN-KUNKEL, P.; ECKEL, G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 491, n. 2/3, p. 137-148, May 2004.

DE WAAL MALEFYT, R. IL-10. In: OPPENHHEIM, J. J.; FELDMAN, M. (Ed.). **Cytokine reference.** New York: Academic. p. 165-185, 2001.

DE WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C.; and De VRIES, J.. **J. Exp. Med.** V. 174, p. 1209-1220, 1991.

DECOSTERD, I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, p. 149-158, 2000.

DEVOR, M.; SELTZER, Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain.** 4<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone, p. 129-164, 1999.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F.. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 83, p.207-211, 1987.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; BERNHEIM, H. A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A.; O'CONNOR, J. V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J. Exp. Med.**, v. 163, n. 6, p. 1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A.; IKEJIMA, T.; WARNER, S.J., et al. Interleukin-1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **J. Immunol.** v.139: p.1902, 1987.

DINARELLO C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **The FASEB Journal.** V. 8, p. 1314-1325, 1994.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 1177-84, 1991.

DOBRY, P.J.K.;PIERCY, M.F. AND SCHROEDER, I. A pharmacological characterization of scratching behavior induced by intracranial injection of substance P and somatostatin. **Neuropharmacology**, v 20: 267-272, 1981.

DONNERER, J.; SCHULIGOI, R.; STEIN, C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. **Neuroscience**, v. 49, p. 693-698, 1992.

DOOLEY, D.J.; SUMAN-CHAUHAN, N.; MADDEN, Z.; Inhibition of K<sup>+</sup>-evoked [3H]noradrenaline release from rat neocortical slices by the anticonvulsant gabapentin. **Soc. Neurosci.** Abstract. 22, 1992

DRAY, A., PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trens Neurosci.** V. 16. p.99, 1993.

DREYER, E.B. ZURAKOWSKI D.; SHUMER R.A.; PODOS S.M.; LIPTON S.A. Elevated glutamate in the vitreous body of humans and monkey with glaucoma. *Arch Ophthalmol.*, v.114: p.299-305, 1996.

DRIESSLER, F.; VENSTROM, K.; SABAT, R.; ASADULLAH, K. AND A.J. SCHOTTELIUS. Molecular mechanisms of interleukin-10 mediated inhibition of NFκB activity: a role for p50. **Clin. Exp. Immunol.** v. 135: 64-73.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanisms of central analgesia Induced by morphine or carbachol and the L-arginine–Nitric Oxide–cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 221, p. 171–174, 1992.

DUARTE I.D. NAKAMURA M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 21, p. 341, 1988.

DUBOIS-DAUPHIN M; FRANKOWSKI H; TSUJIMOTO Y; HUARTE J, MARTINOU J.C. Neonatal motoneurons overexpression the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. **Proc. Nat Acad. Sci. USA.** v.91; 3309-13, 1994

ECK, M. J.; SPRANG, S. R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 29, p. 17595-17605, Oct. 1989.

ESPEJO, E.F.; STINUS, L.; CADOR M.; MIR, D. Effects of morphine and nalozone on behavior in the hot plate test: a ethopharmacological study in the rat. **Psychopharmacology**, v. 115, p. 500-510, 1994.

ESPER, R.M.; LOEB, J.A. Rapid axo-glia signaling mediated by neuregulin and Neurotrophic factors. **J. Neurosci.** v.24, p. 6218–6227, 2004.

EUGSTER, H.P., FREI, K., BACHMANN, R., BLUETHMANN, H., LASSMANN, H., FONTAN A., A., A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1. **Eur. J. Immunol.**, v.29(2), 626–632, 1999.

FACCIOLLI LH; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neurotrophil migration “in vivo” by indirect mechanisms. **Agents Actions.** Jun, v. 30(3-4), p.344-9, 1990.

FAWCETT J.W.; KEYNES RJ. Peripheral nerve regeneration. **Annu. Ver. Neurosci.** V. 13, p. 43-60, 1990.

FEHRENBACHER, J. C.; TAYLOR, C. P.; VASKO, M. R. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. **Pain**, v. 105, n. ½, p. 133-141, Sept. 2003.

FERNANDEZ-VALLE, C.; BUNGE RP; BUNGE MB. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrofagos: evidence in vitro studies of Wallerian degeneration. **J. neurocytol.** v.24: p.667-79, 1995.

FERREIRA S.H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. *Ann Ist Super Sanita.*; 29(3): 367-73, 1993.

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

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 53, n. 1, p. 39, 1978.

FIELD, MJ.; OLES, R.J.; LEWIS, A.S.; McCLEARY, S.; HUGHES, J.; SINGH, L.. Gabapentin (Neurotin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br. J. Pharmacol.*, v.121, p. 1513-1522, 1997.

FIGIEL, I.; Pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp. (review).*, v. 68, p.526-534, 2008.

FINK, K.; DOOLEY, D. J.; MEDER, W. P.; SUMAN-CHAUHAN, N.; DUFFY, S.; CLUSMANN, H.; GÖTHERT, M. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 2, p. 229-236, Feb. 2002.

FINNERUP NB, OTTO M, MCQUAY HJ, JENSEN TS, SINDRUP SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal. **Pain**, v. 218, p. 289-305, 2005.

FINN JT; WEIL M; ARCHER F; SIMAN R; SRINIVASAN A, et al. Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. **J. Neurosci.** v.20, p.1333-41, 2000.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. K. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081, 1989.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3444, 1991.

FLATTERS, S.J.L.; BENNETT G.J.. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain.**, v. 109, p.150-161, 2004.

FOLCH-PUY, E.; GRANELL, S.; DAGORN, J. C.; IOVANNA, J. L.; CLOSA, D. Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 6, p. 3774-3779, Mar. 2006.

FONG Y.; LOWRY, S.F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clin Immunol Immunopathol.* May; 55(2): 157-70, 1990.

FORTE, W. N. **Imunologia básica e aplicada**. São Paulo: Artmed, 2004.

FOTIN-MLECZEK M; HENKLER F; SAMEL, D; REICHWEIN, M; HAUSSER, A; PARMRYD, I; SCHEURICH, P.; SCHMID, J.A.; WAJANT, H.. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 2757-2770, 2002.

FOX, A.; GENTRY, C.; SADHANA, P.; KESINGLAND, A.; BEVAN, S. Comparative activity of the anti-convulsants oxcarbazepine, carbamazepine, lamotrigine and gabapentin in a model of neuropathic pain the rat and guinea pig. **Pain**, v. 105, p. 355-362, 2003.

FROST, S. A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A.; KHAN, A. A. Does hyperalgesia to cooling stimuli characterize patients with sympathetically maintained pain (reflex sympathetic dystrophy)? *In*: DUBNER, R.; GEBHART, G. F.; BOND, M. R. (Ed.). **Pain Research and Clinical Management**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 151-156.

FRANEK M., History and the present of metabotropic GABAB receptor. **Cesk Fysiol.**, v.53(3), p.117-124, 2004.

FUKAU, M.; MASON, H.S.; BRITTON, F.C.; KENION, J.L.; HOROWITZ, B.; KEEF K.D.. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK<sub>Ca</sub> channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. **J. Biol. Chem.** 274, 10927-10935, 1999.

FUKUOKA, T.; KONDO, E.; DAI, Y.; NOGUCHI, K. The role of neighboring intact DRG neurons in a rat neuropathic pain model. *In*: WORLD CONGRESS ON PAIN, 9<sup>th</sup>, Seattle. **Proceedings...**Seattle: IASP Press., **Progress in Pain Research and Management**, v. 16, p. 137-146, 2000

GALER, B. S.; JENSEN, M. P. Development and preliminary validation of a pain measure specific to neuropathic pain: the Neuropathic Pain Scale. **Neurology**, v. 48, p. 332-338, 1997.

GARBAY, B., HEAPE, A.M., SARGUEIL, F., AND CASSAGNE, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v.61, p.267-304, 2000.

GARCIA-LARREA, L.; MAGNIN, M. Physiopathologie de la douleur neuropathique: revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. **Presse Med.**, v. 37, p. 315-340, 2008.

GARRY, M. G.; HARGREAVES, K. M. Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. **Brain Res.**, v. 582, p. 139-142, 1992.

GEE, N. S.; BROWN, J. P.; DISSANAYAKE, V. U.; OFFORD, J.; THURLOW, R.; WOODRUFF, G. N. The Novel Anticonvulsant Drug, Gabapentin (Neurontin), Binds to the Subunit of a Calcium Channel. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 10, p. 5768-5776, Mar. 1996.

GENOVESE, T.; ESPOSITO, E.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; CAMINITI, R.; BRAMANTI, P.; CAPPELANI, A.; CUZZOCREA, S. Absence of endogenous interleukin-10

enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. **J. Neurochem.**, v. 108, n. 6, p. 1360-1372, Mar. 2009.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineural tumor necrosis factor-alpha protein. **Neurosc. Lett**, v. 372, p. 215-219, 2004.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian Degeneration of mouse Sciatic nerve. **Exp. Neurol.**, v. 192, n. 1, p.163-166, Mar. 2005.

GEORGE, A.; MARZINIAK, M.; SCHÄFERS, M.; TOYKA, K. V.; SOMMER, C. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor- $\alpha$ , increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**, v. 88, p. 267-275, 2000.

GEORG EB; GLAS JD; GRIFFIN JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through  $\text{Ca}^{2+}$ -specific channels. **J. Neurosci.** v.15, p. 6445-52, 1995.

GERY, I.; GERSHON, R. K.; WAKSMAN, B.H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.136, p.12831, 1972.

GIGLI, G. P. Entendendo a dor de seu animal. **Vet. News**, v. 4, n. 41, p. 12, 1999.

GIDAL B.E.; DECERCE J. BOCKBRADER H.N. GONZALEZ J.; KRUGER S.; PITTERLE M.E.; RUTECKI P.; RAMSAY R.E.; Gabapentin bioavailability: effect of dose and frequency of administration in adult patients with epilepsy. **Epilepsy research.** V. 31, n<sup>o</sup>2, p. 91-99, 1998.

GÖTZ, E., FEUERSTEIN, T.J. MEYER, D.K.. Effects of gabapentin on release of  $\gamma$ -aminobutyric acid from slices of rat neostriatum. **Drug Res.** v. 43, p. 636-638, 1993.

GOLDLUST, A.; SU, T.; WELTY, D.F.; TAYLOR, C.P., OXENDER, D.L..Effects of the anticonvulsant drug gabapentin on enzymes in the metabolic pathways of glutamate and GABA. **Epilepsy Res.**, v. 22, p.1-11, 1995.

GRANT, G. A.; BRITZ, G. W.; GOODKIN, R. The utility of magnetic resonance imaging in evaluating peripheral nerve disorders. **Muscle Nerve**, v. 25, p. 314-331, 2002.

GRELL. M, ZIMMERMANN, G.; GOTTFRIED, E.; CHEN C.M.; GRÜNWARD, U.; HUANG D.C., WU LEE Y.H.; DÜRKOP, H.. Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. **EMBO J.**, v. 18, p. 3034-3043, 1999.

GRIFFIN, J. W.; MCARTHUR, J. C.; POLYDEFKIS, M. Assessment of cutaneous innervation by skin biopsies. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 14, p. 655-659, 2001.

GRIMBALDESTON, M.; NAKAE, S.; KALESNIKOFF, J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 10, p. 1095-1104, Oct. 2007.

GUERREIRO, C. A. M. **Tratamento medicamentoso das epilepsias com novas drogas e complicações de epilepsias crônicas**. 2001. Dissertação (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

GUERTIN, A.D., ZHANG, D.P., MAK, K.S., ALBERTA, J.A. & KIM, H.A. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. **J. Neurosci.** v. 25, p. 3478–3487, 2005.

GUPTA, S. K.; PRINGLE, J.; PODUSLO, J. F.; MEZEI, C. Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. **J. Neurosci. Res.**, v. 34, n. 1, p. 14-23, Jan. 1993.

GURNEY, M.E.; PU, H.; CHIU, A.Y.; DAL CANTO, M.C; POLCHOW, C.Y.; ALEXANDER, D.D. Motor neuron degeneration in mice expressing a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, v. 264, p. 1772-1775. 1994.

GURNEY, M.E.; CUTTING, F.B.; ZHAI, P.; DOBLE, A.; TAYLOR, C.P. ANDRUS, P.K.; HALL, E.D., Benefit of vitamin E, riluzole and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol.**, v.39, p.147-157, 1996.

GUSTAFSSON, H.; FLOOD, K.; BERGE, O. G.; BRODIN, E.; OLGART, L.; STILLER, C. O. Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. **Exp. Neurol.**, v. 182, n. 2, p. 427-434, Aug. 2003.

GYBELS, J.; KUPERS, R. Significance of autotomy and scratching after peripheral nerve injury. In JM BENSON and G.GUILBAUD (eds) Lesions of primary afferent fibers as a tool for the study of clinical pain. Elsevier Science Publishers B.V. p,101-106, 1991.

HAGIWARA, N.; IKEDA, K.; HIGASHIDA, H.; TOMITA, K.; YOKOYAMA, S. Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in Schwann cells after gradual elongation of rat sciatic nerve. **J. Orthop. Sci.**, v. 10, n. 6, p. 614-621, Nov. 2005.

HALL SM. 1978. The Schwann cell: a reappraisal of its role in the peripheral nervous system. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** V. 4, p 165-76, 1978.

HARRINGTON JF, MESSIER AA, LEVINE A, SZMYDYNGER-CHODOBSKA J, CHODOBSKI A. Shedding of tumor necrosis factor type 1 receptor after experimental spinal cord injury. 2007

HEBLICH, F.; TRAN VAN MINH, A.; HENDRICH, J.; WATSCHINGER, K.; DOLPHIN, A. C. Time course and specificity of the pharmacological disruption of the trafficking of voltage-gated calcium channels by gabapentin. **Channels (Austin)**, v. 2, n. 1, p. 4-9, Jan./Feb. 2008.

HELDMANN, U.; THORED, P.; CLAASEN, J. H.; ARVIDSSON, A.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. TNF- $\alpha$  antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain. **Exp. Neurol.**, v. 196, n. 1, p. 204-208, Nov. 2005.

HENDRICH, J.; VAN MINH, A. T.; HEBLICH, F.; NIETO-ROSTRO, M.; WATSCHINGER, K.; STRIESSNIG, J.; WRATTEN, J.; DAVIES, A.; DOLPHIN, A. C.

Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 9, p. 3628-3633, Mar. 2008.

HERRERO, J. F.; ROMERO-SALDOVAL, E. A.; GAITAN, G.; MAZARIO, J. Antinociception and the new cox-inhibitors: Research approaches and clinical perspectives. **CNS Drug Rev.**, v. 9, p. 227–252, 2003.

HEUMANN R, KORSCHING S, BANDTLOW C, THOENEN H Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. **J Cell Biol.** v. 104, p.1623–16<sub>2</sub>, 1987

HEUMANN R, LINDHOLM D, BANDTLOW C, MEYER M, RADEKE MJ, MISKO TP, SHOOTER E, THOENEN H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA.** V. 84: p.8735–8739, 1987.

HINGTGEN C. M.; WAITE K.J.; VASKO, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3,5-cyclic monophosphate transduction cascade. **J.Neurosci**, v. 5, p. 5411–9. 1995.

HIRATA K; MITOMA H; UENO N; HE J.; KAWABUCHI M. Differential response to macrophage subpopulations to myelin degradation in the injured sciatic nerve. **J. Neurocytol.**, v. 28, p.685-95, 1999.

HIRAGA, A.; KUWABARA, S.; DOYA, H.; KANAI, K.; FUJITANI, M.; TANIGUCHI, J.; ARAI, K.; MORI, M.; HATTORI, T.; YAMASHITA, T.. Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury, **J.Peripher.Nerv.Syst.**, v.11, p.217–224, 2006.

HOFMANN, F.; BIEL, M.; FLOCKERZI, V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17, p. 399-418, 1994.

HOFMANN, H.A., De Vry, J., Sieling, A. Spreyer, P., Denzer, D.. Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 470, 17-25. 2003.

HOPKINS, S. J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 49, n. 4, p. 207, 1990.

HOWARD M. ; O’GARRA A, ISHIDA H., DE WAAL MALEFYT R. ; DE VRIES J. Biological properties of interleukin 10. **J Clin Immunol.** v. 12(4), p. 239-47, 1992.

HUANG, C. J.; NAZARIAN, R.; LEE, J.; ZHAO, P. M.; ESPINOSA-JEFFREY, A.; VELLIS, J. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic Protein gene through nuclear factor kappa B in a human Oligodendroglioma cell line. **Int. J. Devl. Neurosci.**, v. 20, p. 289–296, 2002.

HUNTER, J.C.; GOGAS; K.R.; HEDLEY, L.R.; JACOBSON, L.O.; KASSOTAKIS, L.; THOMPSON, J.; FONTANA, D.J. . The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 324, 153-160, 1997.

HURLEY, R. W.; CHATTERJEA, D.; ROSE FENG, M.; TAYLOR, C. P.; HAMMOND, D. L. Gabapentin and pregabalin can interact synergistically with naproxen to produce antihyperalgesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p.1263-1273, Nov. 2002.

HURTADO O; CÁRDENAS, A.; LIZASOAIN, I.; BOSCÁ, L.; LEZA J.C.; LORENZO, P.; MORO M.A. Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 1094-1102, 2001.

HURTADO O; LIZASOAIN, I.; FERNANDEZ-TOMÉ P.; ALVAREZ-BARRIENTOS A., LEZA J.C. LORENZO P.; MORO M.A. TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxigen-glucose deprivation or glutamate. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** , v. 22, p. 576-585, 2002.

HUTSON, S.M.; DROWN, P.; PLYOSOVA, D.; REINHART, G.D. Role of gabapentin and branched chain aminotransferase isoenzymes in astrocyte neurotransmitter metabolism [abstract]. **J. Neurochem.** 66. S76., 1995.

HWANG, J.H. YAKSH, T.L.; Effect of subarachnoid gabapentin on tactile-evoked allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. **Reg. Anesthesia.**, v. 22, p.249-256. 1997.

HYLDEN, J.K. and WILCOX, G.L. Intratecal substance P elicits a caudally directed biting and scratching behavior im mice. **Brain Res.**, v.217, p.212-215, 1981.

IASP Committee for Research and Ethical Issues. Ethical standards for Investigation of Experimental Pain in Animals. **Pain.** v. 16, p. 109-110, 1983.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J. J.; GUILBAUD, G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants attenuates the allodynia-like behaviour. **Pain**, v. 79, p. 281-290, 1999.

ISOM, L. L.; DE JONGH, K. S.; CATTERALL, W. A. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. **Neuron**, v. 12, n. 6, p. 1183-1194, June 1994.

JANDER, S.; STOLL, G. Differential induction of interleukin-12, interleukin-18, and interleukin-1beta converting enzyme mRNA in experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat. **J. Neuroimmunol.**, v. 91, n. ½, p. 93-99, Nov. 1998.

JASMIN, L.; KOHAN, L.; FRANSSEN, M.; JANNI G.; GOFF, J. R. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain**, v. 75, p. 367-382, 1998.

JAZAT, F.; GUILBAUD, G. the "tonic" pain-related behavior seen in mononeuropathic rats is modulated by morphine and naloxone. **Pain**, v. 44, p. 97-102, 1991.

JEHLE T.; LAGRÉZE W.A.; BLAUTH E.; KNÖRLE R.; SCHNIERLE P.; LÜCKING C.H. FEUERSTEIN T.F.. Gabapentin-lactam (8-Azaspino (5,4) decan-9- on, GBP-L) inhibits

ischemia-evoked (3H)-glutamate release and is a neuroprotective agent in a model of acute retinal ischemia. Naunyn-Schmiedeberg's **Arch Pharmacol.**, v. 362, p. 74-81, 2000.

JUNGER, H., SORKIN, L.S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF- $\alpha$ . **Pain.** v. 85(1-2): 145-51, 2000.

KAJANDER K.C.; BENNETT G.J. Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons. *Journal of Neurophysiology.*, v. 68, p.734-744, 1992.

KASE H.; IWAHASHI, K.; NAKANISHI, S.; MATSUDA Y.; YAMADA. K.; et al.; K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 142, p. 436-440, 1987.

KAWABATA A.; MANABE S.; MANABE Y. TAKAGI H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **Br J. Pharmacol.**, v. 112, p. 547-550, 1994.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. **J. Exp. Med.**, v. 154, n. 3, p. 631-639, Sept. 1981.

KAYSER, V.; CHRISTENSEN, D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats depends on stimulus characteristics and level of test integration. **Pain**, v. 88, p. 53-60, 2000.

KAYSER, V.; DESMEULES, J.; GUILBAUD, G. Systemic clonidine differentially modulates the abnormal reactions to mechanical and thermal stimuli in rats with peripheral mononeuropathy. **Pain**, v. 60, p. 275-285, 1995.

KAYSER, V.; FARRÉ, A.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. Effects of the novel analgesic, cizolirtine, in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, p. 169-177, 2003.

KEHRL, J. H.; WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B.; JAKOWLEW, S.; ALVAREZ-MON, M.; DERYNCK, R.; SPORN, M. B.; FAUCI, A. Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp. Med.**, v. 163, p. 1037, 1986.

KERSCHENSTEIN M, SCHAWAB ME; LICHTMAN JW; MISGELD T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. **Nat. Med.** v.11, p.572-577, 2005.

KIM, Y. S.; CHANG, H. K.; LEE, J. W.; SUNG, Y. H.; KIM, S. E.; SHIN, M. S.; YI, J. W.; PARK, J. H.; KIM, H.; KIM, C. J. Protective effect of gabapentin on N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in rat hippocampal CA1 neurons. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 109, n. 1, p. 144-147, Jan. 2009.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model of peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, p. 355-363, 1992.

KITAOKA Y.; KITAOKA, Y.; KWONG J.M.K.; ROSS-CISNEROS F.N; WANG J.; TSAI R.K.; SADUN A.A. and LAM T.T.. TNF-alpha-induced Optic Nerve Degeneration and Nuclear Factor-kB p65. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 47(4), 1448-1457, 2006.

KLEBANOFF, S. J.; VADAS, M. A.; HARLAN, J. M.; SPARKS, L. H.; GAMBLE, J. R. AGOSTI, J. M.; WALTERSDORPH, A. M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v. 136, n. 11, p. 4220-4225, June 1986.

KOEPPEN, A.H.. Wallerian degeneration: history and clinical significance, **J.neurol. Sci.**, v.220, p.115-117, 2004.

KOLTZENBURG, M. Afferent mechanisms mediating pain and hyperalgesia in neuralgia. *In: JÄNIG, W.; STANTON-HICKS, M. (Ed.). Reflex Sympathetic Dystrophy: A Reappraisal.* Seattle: IASP Press,.. **Progress in Pain Research and Management**, v. 6, p. 123-150, 1996.

KOLTZENBURG, M. Classification of neuropathic pain. *In: GIAMBERARDINO, M. A. (Ed.): an update review: refresher course syllabus.* Seattle: IASP Press, 2002. **Pain** p. 149-153. 2002

KOLTZENBURG, M.; KEES, S.; BUDWEISER, S.; OCHS, G.; TOYKA, K. V. The properties of unmyelinated afferents change in a chronic constriction neuropathy. *In: WORLD CONGRESS ON PAIN, 7th, 1994, Seattle. Proceedings.* Seattle: IASP Press.. **Progress in Pain Research and Management**, v. 2, p. 511-522, 1994.

KOLTZENBURG, M.; LUNDBERG LE; TOREBJORK HE..Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. **Pain**, v.51, p.207-219, 1992.

KOTLZENBURG, M.; SCADDING, J. Neuropathic pain. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 14, p. 641-647, 2001.

KRAUSE TL; FISHMAN HM, BALLINGER ML, BITTNER GD. 1994. Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. **J. Neurosci.** v. 14, 6638-51, 1994.

KRONKE, M.; SCHUTZE, S.; SCHUERICH, P.; SCHLUTER, C.; UCER, U.; PFIZEN-MAIER, K.16th annual UCLA symposium. Abstracts: Mechanisms of control of gene expression. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 11, Part C, p. 143, 1987.

KULKARNI, A.S. Scratching response induced in mice by mescaline and related amphetamine derivatives. **Biol. Psychiatr.**, v.6, p.177, 1973.

KUNKEL, S.; STANDIFORD, T.; CHENSUE, S. W.; KASAHARA, K.; STRIETER, R. M. Cellular and molecular mechanisms of cytokine networking. **Agents Actions Suppl.**, v. 32, p. 205-218, 1991.

KUPERS, R. C.; NUYTTEN, D.; DE CASTRO-COSTA, M.; GYBELS, J. M. A time course análisis of the changes in spontaneous and evoked behaviour in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 50, p. 101-111, 1992.

KUPERS, R. **Chronic pain**: animal models and modulation by electric brain stimulation and opioides. Leuven: Kathol Lieke Universitiet Leuven (Belgiuns), 1994.

LA FLEUR, M., UNDERWOOD, J.L., RAPPOLEE, D.A., AND WERB, Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: Defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. **J.Exp. Med.** v.184, p.2311–2326. 1996.

LAGRÈZE W.A.; KNORLE R.; BACH M., FEUERSTEIN T.J. Memantine is neuroprotective in rat model of pressure-induced retinal ischemia. **Invest Ophthalmol, Vis Sci** v.39, p.1063-1066, 1998.

LAGRÈZE W.A. OTTO T.; FEUERSTEIN T.J. ; Neuroprotektion bei Ischämie der Netzhaut im Tiermodell. **Ophthalmolge**, v. 96, p.370-374, 1999

LABUDA, C. J.; LITTLE, P. J. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 144, n. 2, p. 175-181, June 2005.

LAGRÈZE, W. A.; MÜLLER-VELTEN, R.; FEUERSTEIN, T. J. The neuroprotective properties of gabapentin-lactam. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 239, n. 11, p. 845-849, Nov. 2001.

LARSEN, C.G.; ZACHARIAE; C.O.C. OPENHEIM, J.J.; MATSUSHIMA, K.. Production of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) by human dermal fibroblasts in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor. **Biochem Biophys. Res. Commn.**, v. 160, p.1403, 1989

LEVITT, M. Disestesias and self mutilation in human and subhumans: a reviw of clinical and experimental studies. **Brain Res Rev.** v. 10, p. 247-290, 1985.

LE, J. & VILCEK, Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **J. Lab. Invest.**, v. 56, p 234, 1987.

LI CY; et al.. Calcium channel alpha(2)delta(1) subunit mediates spinal hyperexcitability in pain modulation. **Pain**, v. 125, p.20-34, 2006

LIEFNER, M.; SIEBERT, H.; SACHSE, T.; MICHEL, U.; KOLLIAS, G.; BRÜCK, W. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. **J. Neuroimmunol.**, v. 108, n. ½, p. 147-152, Aug. 2000.

LIU, H.-M., YANG, L.H., AND YANG, Y.J.. Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, V.54, p.487–496. 1995

LIU CN; MICHAELIS M, AMIR R; DEVOR M. Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons. Relation to neuropathic pain. **J Neurophysiol.**, v. 84, p. 205-15, 2000.

LINCOLN, T.M., KOMALAVILAS, P. CORNWELL, T.L., 1994. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. **Hypertension**, v. 23, p 1141-1147, 1994.

LINDEROTH, B and BRODIN, E. "Mirror pain" and indications of bilateral dorsal horn activation in response to unilateral nociception. *Pain*, v.58, p. 277-278, 1994.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LOMBARD, M. C.; NASHOLD, B. S.; ALBE-FESSARD, D.; SALMAN, N.; SAKR, C. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 6, p. 163-174, 1979.

LORENZETTI, B.B., VEIGA, F.H., CANETTI, C.A., POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw**. Oct-Dec; v.13(4), p. 456-461, 2002

LOUZADA-JUNIOR P.; DIAS J.J.; SANTOS W.F.; LACHAT J.J.; BRADFORD H.F.; COUTINHO-NETO J.. Glutamate release in experimental ischemia of the retina: an approach using microdialysis. *J. Neurochem.*, v. 59, p.358-363, 1992.

LU, M. O.; DUAN, R. S.; QUEZADA, H. C.; CHEN, Z. G.; MIX, E.; JIN, T.; YANG, X.; LJUNGGREN, H. G.; ZHU, J. Aggravation of experimental autoimmune neuritis in TNF-alpha receptor 1 deficient mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 186, n. 1/2, p. 19-26, May 2007.

LUO, L., RABOISSON, P. Gabapentin and mexiletine inhibit formalin-induced peripheral nerve activity in the rat. Society for Neuroscience 31th annual meeting, San Diego, Abstract n°. 615.18.,2001.

LUO, ZD; CHAPLAN S.R.; SCOTT, BP; CIZKOVA, D.; CALCUTT, N.A.; YAKSH, T.L.; 1999. Neuronal nitric oxide synthase mRNA upregulation in rat sensory neurons after spinal nerve ligation: lack of role in allodynia development. **J. Neurosci.** 19, 9201-9208, 1999.

MAK, T. W. & YEH, W. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. Supplement Review. Available online <http://arthritis-research.com/content/4/S3/S243>. **Arthritis Research** v. 4 (Suppl 3), p. 243-252, 2002.

MALCANGIO, M.; RAMER, M. S.; JONES, M. G.; MCMAHON, S. B. Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 397-399, 2000.

MALIN,S.A. *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize Nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J.Neurosci.* v. 26, p. 8588–8599, 2006.

MALMBERG A.B.; BASBAUM AL.. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, 215-22, 1998.

MANNION RJ, WOOLF CJ - Pain mechanisms and management: a central perspective. **Clin J Pain**, v.16, p.144-156. 2000.

MANNION, R. J.; DOUBELL, T. P.; COGGESHALL, R. E.; WOOLF, C. J. Collateral sprouting of uninjured primary afferent A-fibers into the superficial dorsal horn of the adult rat spinal cord after topical capsaicin treatment to the sciatic nerve. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 5189-5195, 1996.

MANSIKKA, H.; SHETH, R.N.; DeVries, C.; Lee, H.; winchurch, r.; raja, s.n.. Nerve injury-induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin-1 receptor knockout mice. **Exp. Neurol.** 162, 343-349, 2000.

MARAIS, E.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN. F. Calcium Channel alfa-2 subunits-Structure and Gabapentin Binding. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p. 1243-1248, May 2001.

MARTINEZ, AMB. AND CANAVARRO, S. Early myelin breakdown following sural nerve crush: A freeze-fracture study. *Braz J. Med. Biol. Res.* v.33, p.1477-1482, 2000.

MATSUKAWA, A. STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. **Acta Med. Okayama**, v. 61, n. 5, p. 239-245, Oct. 2007.

MATSUSHIMA, K. OPPENHEIM, J.J. Interleukin 8 and MCAF: Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and clinical aspects of visceral hyperalgesia. **Gastroenterology**. Jul; v. 107, n. 1, p. 271-93, 1994.

MATYSZAK, M.K. AND PERRY, V.H.. Delayed-type hypersensitivity lesions in the central nervous system are prevented by inhibitors of matrix metalloproteinases. **J. Neuroimmunol.** 69:141–149, 1996.

MCMAHON, S.B. - Neuropathic Pain Mechanisms, em: Giamberardino M.A. – **Pain**, an updated review: Refresher course syllabus. IASP Press: Seattle, p. 155-161, 2002.

McCLEANE, G. J. Comment on: Serpell et al., gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised double-blind, placebo controlled trial (*Pain* 2002; 99: 557–66). **Pain**, v. 103, n. ½, p. 227, May 2003.

McLEAN, M. J.; RAMSEY, R. E.; LEPIK, I.; ROWAN, A. J.; SHELLENBERGER, M. K.; WALLACE, J. Gabapentin as add-on therapy in refractory partial epilepsy: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. **Neurology**, v. 43, p. 2292-2298, 1993

McMAHON, S. B.; BENNETT, D. L. H. Trophic factors and pain. *In*: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. 4<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone, 1999. p. 105-128.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. NO and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127–136, 1993.

MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B. Management of Restless Legs Syndrome with Gabapentin (Neurontin). **Sleep**, v. 19, n. 3, p. 224-226, 1996.

MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B. Successful Treatment of Reflex Sympathetic Dystrophy (RSD) with Gabapentin (Neurontin) (Letter) **J. Pain Symptom Manag.**, v. 10, n. 4, p. 265-266, 1995a.

MELLICK, G. A.; MELLICK, L. B. Successful treatment of restless legs syndrome with gabapentin (Neurontin). **Sleep Res.**, v. 24, p. 290, 1995b.

MICHAELIS, M.; LIU, X.; JÄNIG, W. Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin peripheral nerve lesion. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 2742-2748, 2000.

MIXCOATL-ZECUATL, T.; FLORES-MURRIETA, F. J.; GRANADOS-SOTO, V. The nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K<sup>+</sup> channel pathway participates in the antiallodynic effect of spinal gabapentin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 531, n. 1/3, p. 87-95, Feb. 2006.

MOORE, K. W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D. F.; TROUNSTINE, M. L.; KHAN, T. A.; MOSMANN, T. R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248, p. 1230, 1990.

MOORE K. W., O'GARRA, A., DE WAAL MALEFYT, R., VIEIRA, P., and MOSMANN, TR.. *Annu. Rev. Immunol.* v. 11, p.165-190, 1993.

MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. M. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animal and hypothesis for assessment. **Vet. Res.**, v. 116, p. 431-436, 1985.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. In: ASH, C.; GALLAGHER, R. B. (Ed.). **Immunoparasitology today**. Cambridge, UK: Elsevier Trends Journals, 1991. p. A 49-53.

MOSS M.L.; JIN, S.L.; MILLA M.E. BICKETT D.M.; BURKHART, W. et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor-alpha. **Nature**, v. 385, 733-736, 1997.

MOURA, F. E. A. Estudo comportamental farmacológico de ratos portadores de mononeuropatia ciática. Fortaleza. 1995. 119 f. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1995.

MULLER, U.; JONGENEEL, C. V.; NEDOSPASOV, S. A.; LINDAHL, K. F.; STEINMETZ, M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. **Nature**, v. 325, n. 6101, p. 265-267, Jan. 1987.

MURINSON B.B.; ARCHER D.R.; Li Y GRIFFIN J.W. Degeneration of myelinated efferent fiber fibers prompts mitosis in Remak cells of uninjured C-fiber afferents. **J. neurosci.** v.25: p. 1179-87, 2005.

MYERS RR. SHUBAYEV VI, CAMPANA WM. Anatomy and Pathology of the Peripheral Nervous System: Neuropathology of painful Neuropathies. In: Pain Due to Peripheral Nerve Diseases. Sommer C (Ed). Karger, Basel p. 8-30, 2001.

NANAYAMA, T.; KURAISHI, Y.; OHNO, H.; SATOH, M. Capsaicin-induced release of calcitonin gene-related peptide from dorsal horn slices is enhanced in adjuvant arthritic rats. **Neurosci. Res.**, v. 6, p. 569-572, 1989.

NETA, R.; SAYERS, T.; OPPENHEIM, J. J. Relationship of tumor necrosis factor to interleukins. In: VILCEK, J.; AGGARWAL, B. B. (Ed.). **Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 499-566.

NEWTON, R.A. BINGHAM, S., CASE, P.C., SANGER, G.J., LAWSON, S.N. Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel  $\alpha 2\delta-1$  subunit following partial sciatic nerve injury. **Mol. Brain Res.** v. 95, p. 1-8, 2001.

NIIRO H., OTSUKA, T.; IZUHARA K.; YAMAOKA K. OHSHIMA K.; TANABE T; HARA S; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA,H.; NIHO Y.. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. **Blood.** 1; 89(5), p. 1621-1628, 1997.

NIIRO, H.; OTSUKA, T.; TANABE T., HARA S., KUGA S., NEMOTO Y., TANAKA Y., NAKASHIMA H., KITAJIMA S., ABE M., et al. Inhibition by interleukin-10 of inducible cyclooxygenase expression in lipopolysaccharide-stimulated monocytes: its underlying mechanism in comparison with interleukin-4. **Blood.** v. 15; 85(12): 3736-45, 1995

NG GYK, BERTRAND S, SULLIVAN R, ETHIER N.; WANG J. YERGEY J..  $\gamma$ -Aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action. *Mol pharmacol.*, v.59, p.144-152, 2001.

OKA, M.; ITOH, Y.; WADA, M.; YAMAMOTO, A.; FUJITA, T. Gabapentin blocks L-type and P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels involved in depolarization-stimulated nitric oxide synthase activity in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. **Pharm. Res.**, v. 20, n. 6, p. 897-899, June 2003.

OKU, R.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Release of substance P from the spinal dorsal Horn is enhanced in poly arthritic rats. *Neurosci Lett*, v. 74:p. 315-9, 1987.

OLIFF, A.; DEFEO-JONES, D.; BOYER, M.; MARTINEZ, D.; KIEFER, D.; VUOCOLO, G.; WOLFE, A.; SOCHER, S. H. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. **Cell**, v. 50, n. 4, p. 555-563, Aug. 1987.

ORTIZ, M. I.; MEDINA-TATO, D. A.; SARMIENTO-HEREDIA, D.; PALMA-MARTÍNEZ, J.; GRANADOS-SOTO, V. Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K<sup>+</sup> channels pathway by gabapentin on the formalin test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 83, n. 3, p. 420-427, Mar. 2006.

OSSIPOV, M.H.; LAI, J. & PORRECA, F.; Mechanisms of experimental neuropathic pain: integration from animals models. Capítulo 59, Pain, 2004

PAN, H. L.; EISENACH, J. C.; CHEN, S. R Gabapentin suppresses ectopic nerve discharges and reverses allodynia in neuropathic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 288, n. 3, p. 1026-1030, Mar. 1999.

PARADA, C.A. YEH J.J.; JOSEPH E.K. AND LEVINE J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1847-1852, 2003.

PARK, S.; AHN, E. S.; HAN, D. W.; LEE, J. H.; MIN, K. T.; KIM, H.; HONG, Y. W. Pregabalin and gabapentin inhibit substance P-induced NF-kappaB activation in neuroblastoma and glioma cells. **J. Cell Biochem.**, v. 105, n. 2, p. 414-423, Oct. 2008.

PARTRIDGE, B. J.; CHAPLAN, S. R.; SAKAMOTO, E.; YAKSH, T. L. Characterization of the effects of gabapentin and 3-isobutyl-gamma-aminobutyric acid on substance P-induced thermal hyperalgesia. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 196-205, Jan. 1998.

PARSONS C.G.; WOJCIECH D.; QUACK G. Glutamate in CNC disorders as a target for drug development: an update. *Drugs News perspect*, v. 11, p. 523-569, 1998.

PASLAWSKI, T.; TREIT, D.; BAKER, G.B.; GEORGE, M.; COUTTS, R.T.. The antidepressant drug phenelzine produces antianxiety effects in the plus-maze and increases in rat brain GABA. *Psychopharmacology*, v. 127, p.19-24, 1996.

PATIL, C. S.; PADI, S. V.; SINGH, V. P.; KULKARNI, S. K. Sildenafil induces hyperalgesia via activation of the NO-cGMP pathway in the rat neuropathic pain model. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1/2, p. 22-27, Mar. 2006.

PEHL U, SCHIMID H.A. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. **Neuroscience.**, v. 77, p. 563-573, 1997.

PELLEGRINO RG; POLITIS MJ; RITCHIE JM; SPENCER PS. Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve degeneration. **J. Neurocytol.** v. 15: p.17-28, 1986.

PERKINS, M.N. KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 110 (4): 441, 1993.

PERRY V.H.; TSAO J.W.; FEARN S.; BROWN, M.C. Radiation-induced reduction in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. **Eur. J. Neurosci.** v. 7, p. 278-280, 1995.

PIERCEY, M.F., DOBRY, P.J.K., SCHOEDER, L.A.; EINSPAHR. Behavioral evidence that substance P may be a spinal cord sensory neurotransmitter. *Brain Res.*, v. 210, p. 407-412, 1981.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, v. 25, p. 319-325, 2002.

PORTER, R. J.; FRENCH, J. A. New Antiepileptic Drugs: Discovery, Development, and Update. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 2-3, Jan. 2007.

POOLE, S., CUNHA, F.Q.; SELKIRK, S., LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H.; Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br.J. Pharmacol.* v. 115, p. 684, 1995.

PROOST, P., VAN DAMME, J., AND OPDENAKKER, G. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 1175–1181, 1993.

PUGSLEY, T.A.; WHETZEL, S.Z., DOOLEY, D.J. Reduction of 3,4-diaminopyridine-induced biogenic amine syntheses and release in rat brain by gabapentin. **Psychopharmacol.** 1997

QIN, Y.; CHENG, C.; WANG, H.; SHAO, X.; GAO, Y.; SHEN, A. TNF-alpha as an autocrine mediator and its role in the activation of Schwann cells. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 6, p. 1077-1084, June 2007.

QIU J.; CAI, D.; FILBIN, MT.. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. **Glia**, v.29, p. 166-174, 2000.

RAO, M. L.; CLARENBACH, P.; VAHLENSIECK, M.; KRÄTZSCHMAR, S. Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. **J. Neural Transm.**, v. 73, n. 2, p. 129-134, 1988.

RADULOVIC LL, TÜRCK D, VON HODENBERG A, VOLLMER KO, MCNALLY WP, DEHART PD, HANSON BJ, BOCKBRADER HN, CHANG T. Disposition of gabapentin (neurontin) in mice, rats, dogs, and monkeys. Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Parke-Davis Pharmaceutical Research, Ann Arbor, MI 48105, USA. 1987.

RAMON Y CAJAL S.. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York: Hafner. 1928

REIMANN, W.; Inhibition by GABA, Baclofen and gabapentin of dopamine release from rabbit caudate nucleus: are there common or different sites of action? *Eur.J. Pharmacol.*, v.94, p.341-344, 1983.

REDFORD, E.J.; HALL, S.M.; SMITH, K.J.. Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of tumor necrosis factor. **Brain.**, v. 118, 869-878, 1995.

ROCK, D. M.; KELLY, K. M.; MACDONALD, R. L. Gabapentin actions on ligand- and voltage-gated responses in cultured rodent neurons. **Epilepsy Res.**, v. 16, n. 2, p. 89-98, 1993.

ROTHSTEIN, J.D., KUNCL, R.W., 1995. neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *J. Neurochem.*, v. 65, 643-651, 1995.

SACHS D; CUNHA F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity **Pain.** Mar; v.96 (1-2): p. 89-97, 2002.

SANES JR. Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. **J. Cell Biol.**, v.93, p. 442-451, 1982.

SANTOS, T. J.; De CASTRO-COSTA, C. M.; GIFFONI, S. D.; SANTOS, F. J.; RAMOS, R. S.; GIFONI, M. A. The effect of baclofen on spontaneous and evoked behavioural expression of experimental neuropathic chronic pain. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 57, n. 3B, p. 753-760, Sept. 1999.

SANTOS, T. J. T. Efeito analgésico do baclofeno (Beta-P-clorofenil GABA) em dor neuropática experimental. **Tese** (Mestrado de Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

SAWADA, T.; SANO, M.; OMURA, T.; OMURA, K.; HASEGAWA, T.; FUNAHASHI, S.; NAGANO, A. Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. **Neurosci. Lett.**, v. 417, n. 1, p. 55-60, Apr. 2007.

SCHESTATSKY P. Revisão HCPA. v. 28(3), p. 177-87, 2008

SCHLICKER, E.; REIMANN, W.; GOTHERT, M.; Gabapentin decreases monoamine release without affecting acetylcholine release in the brain. **Drug Res.**,v 35, p. 1347-1349.

SCHLAEPFER WW, BUNGE RP. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. **J. Cell. Biol.** V. 59, p. 456-70, 1973.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat. Neurosci.**, v. 10, p. 1361 – 1368, 2007.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1990.

SERPELL, M. G. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 557-566, Oct. 2002.

SETTON-AVRUJ, C. P.; AQUINO, J. B.; GOEDELMA, C. J.; SOTO, E. F.; VILLAR, M. J. P0 and myelin basic protein-like immunoreactivities following ligation of the sciatic nerve in the rat. **Neurochem Res.**, v. 27, n. 11, p. 1293-303, Nov. 2002.

SHALABY, M. R.; AG ARWAL, B. B.; RINDERKNECHT, E.; SVEDERSKY, L. P.; FINKLE, B. S.; PALLDINO, M. A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. **J. Immunol.**, v. 135, n. 3, p. 2069-2073, Sept. 1985.

SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-1beta, and Interleukin-1alfa. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, Apr. 2002.

SHARE, N.M.; RACKHAM, A. Intracerebral substance P in mice: behavioral effects and narcotic agents. **Brain Res.**, v.211, p.379-386, 1981.

SHEN Y, LI R, SHIOSAKI K. Inhibition of p75 tumor necrosis factor receptor by antisense oligonucleotides increased hypoxic injury and  $\beta$ -amyloid toxicity in human neuronal cell line. **J Biol Chem.**, v. 272, p.3550–3553, 1997.

SHISTIK, E., IVANINA, T., PURI, T., HOSEY, M., DASCAL, N., 1995.  $\text{Ca}^{2+}$  current enhancement by  $\alpha 2\delta$  and  $\beta$  subunits in Xenopus oocytes: Contribution of changes in channel gating and  $\alpha 1$  protein level. **J. Physiol.** v. 489, p. 55-62. 1995.

SHUBAYEV, V.I. *et al.* TNF $\alpha$ -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. **Mol.Cell.Neurosci.** v. 31, p. 407–415, 2006.

SHUBAYEV, V.I, MYERS RR, Upregulation and interaction of TNF $\alpha$  and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Research.* v. 855, p. 83-89, 2000.

SINGH, L.; FIELD, M.J.; HUGHES, J., MENZIES, R., OLES, R.J., VASS, C.A., WOODRUFF, G.N.. The behavioral properties of CI-988, a selective cholecystokininB receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, v. 104, p.239-245, 1991.

SINGH, L.; FIELD, M.J.; FERRIS, P., HUNTER, J.C.. The antiepileptic agent gabapentin (neurotin) possesses anxiolytic-like and antinociceptive actions that are reversed by D-serine. *Psychopharmacology*, v. 127, p. 1-10, 1996.

SMITH, K. A.; LACHMAN, L. B.; OPPENHEIN, J. J.; FAVATA, M. F. The functional relationship of the interleukins. **J. Exp. Med.**, v. 151, p. 1551, 1980.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-17, Jan. 2007.

SOMMER C, MYERS RR. Neurotransmitters in the spinal cord in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol.* v. 90. p.478-485, 1995.

SOUTHALL, M. D.; MICHAEL, R. L.; VASKO, M. R. Intrathecal NSAIDS attenuate inflammation-induced neuropeptide release from rat spinal cord slices. **Pain**, v. 78, p. 39-48, 1998.

SPIES, T.; MORTON, C. C.; NEDOSPOV, S. A.; FIERS, W.; PIOUS, D.; STROMINGER, J. L. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 22, p. 8699-8702, Nov. 1986.

STEWART, B. H.; KUGLER, A. R.; THOMPSON, P. R.; BOCKBRADER, H. N. A Saturable transport mechanism in the intestinal absorption of Gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. **Pharm. Res.**, v. 10, p. 276-281, 1993.

STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R. R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 7, n. 1, p. 13-27, Mar. 2002.

STOLL, G; JUNG S; JANDER S, VAN DER MEIDE P, HARTUNG HP. Tumor necrosis factor-alpha in degeneration and immune-mediated demyelination of the rat peripheral nervous system. *J. Neuroimmunol.*, v. 45, p. 175-182, 1993.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.*, v. 58, p.233-247, 1999

STOLL, G.; MÜLLER, H. W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol.**, v. 9,n. 2, p. 313-325, Apr. 1999.

STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., SHOWELL, H.J., et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1beta. *Science* v.243 (4897): p. 1467, 1989.

SU, T., LUNNEY, E., CAMPBELL, G., OXENDER, D.L., Transport of gabapentin, a  $\gamma$ -amino acid drug, by system L  $\alpha$ -amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes and CHO cells. *J. Neurochem.* v. 64, p. 2125-2131, 1995.

SUGARMAN, B. J.; AGGARWAL, B. B.; HASS, P. E.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A.; SHEPARD, H. M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 943-945, Nov. 1985

SWEET, W.H. Animal models of chronic pain: their possible validation from human experience with posterior rhizotomy and congenital analgesia. **Pain**, v. 10, p. 275-295, 1981.

TANAKA, K.; ZHANG, Q. L.; WEBSTER, H.D. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush : morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditions lesions. **Exp. Neurol.**, v.118, p.53-61, 1992.

TAYLOR, C.P., VARTANIAN, M.G., ANDRUSZKIEWIEWICZ, R., SILVERMAN, R.B.. 3-alkyl GABA and 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents. **Epilepsy Res.** v.11, p. 103-110, 1992

TAYLOR, C.P.. Gabapentin: Mechanism of Action. In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*. Raven Press, New York, p. 829-841, 1995

TAYLOR, C. P.; GEE, N. S.; SU, T. Z.; KOCSIS, J. D.; WELTY, D. F.; BROWN, J. P.; DOOLEY, D. J.; BODEN, P.; SINGH, L. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. **Epilepsy Res.**, v. 29, n. 3, p. 233-249, Feb. 1998.

TEGEDER, I. SCHMIDTKO, A.; NIEDERBERGER E.; RUTH, P.; GEISSLINGER G. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. **Neurosci Lett.**, v.332, p.146-150, 2002.

TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, A. B. **Dor**: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001.

TEMPORIN, K.; TANAKA, H.; KURODA, Y.; OKADA, K.; YACHI, K.; MORITOMO, H.; MURASE, T.; YOSHIKAWA, H. IL-1beta promotes neurite outgrowth by deactivation RhoA via p38 MAPK pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 365, p. 375-380, 2008a

TEMPORIN, K.; TANAKA, H.; KURODA, Y.; OKADA, K.; YACHI, K.; MORITOMO, H.; MURASE, T.; YOSHIKAWA, H. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. **Neurosci. Lett.**, v. 440, n. 2, p. 130-133, Aug. 2008b.

THOMAZZI, S.M. Participação de macrófagos e citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais. Dissertação de Mestrado apresentada ao Depto. de Fisiologia e Farmacologia – UFC, 1996.

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

TORTI, F. M.; DIECKMANN, B.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; RINGOLD, G. M. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia *Science*, v. 229, n. 4716, p. 867-869, Aug. 1985.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. *Pain. Jul*; 82(1): 81-7, 1999.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, I. W.; HARIRI, R. J.; FAHEY, T. J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J. D.; SHIRES, G. T.; CERAMI, A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v. 234, n. 4775, p. 470-474, Oct. 1986.

TREED *et al.*, **Neurology**, v. 70: p.1630-1635, 2008.

TREMONT-LUKATS, I. W.; MEGEFF, C.; BAKONJA, M. M. Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes. **Drugs**, v. 60, p. 1029-1052, 2000.

TZENG, S.F., DEIBLER, G.E., NEUBERGER, T.J., AND DE VRIES, G.H. Two mitogenic regions of myelin basic protein interact with different receptors to induce Schwann cell proliferation in a cAMP dependent process. **J. Neurosci. Res.**, v. 42, p.758–767. 1995.

TZENG, S.F., DEIBLER, G.E., AND DE VRIES, G.H. Myelin basic protein and myelin basic protein peptides induce the proliferation of Schwann cells via ganglioside GM1 and the FGF receptor. **Neurochem. Res.**, v. 24(2), p.255–260, 1999.

UEDA, H.; INOUE, M. Animal models and peripheral nociception tests for the study of neuropathic pain. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 118, n. 2, p. 89-95, Aug. 2001.

UNCINI, A. DI MUZIO, A., DI GUGLIELMO, G.; DE ANGELIS, M.V.; DE LUCA, G., LUGARESI, A.; GAMBI, D.; 1999. Effect of rhTNF-alpha injection into rat sciatic nerve. *J. Neuroimmunol.*, v. 94, p. 88-94, 1999.

URCA, G.; RAIGORADSKY, G. Behavioral classification of excitatory aminoacid receptors in mouse spinal cord. *Eur J. Pharmacol*, v.153, p.211-220, 1988.

VARGAS, M. E.; BARRES, B. A. Why is wallerian degeneration in the CNS so slow? **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 30, p. 153-179, 2007.

VASKO M.R. Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord. **Prog. Brain Res.**, v.104, p. 367–80, 1995.

VALE M.L., MARQUES J.B., MOREIRA C.A., ROCHA F.A.; FERREIRA S.H.; POOLE, S.; CUNHA F.Q. RIBEIRO R.A. Antinociceptive effects of interleukin-4, IL-10, IL—13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 304(1): 102-8, 2003.

VAN DAMME, J. DE LEY, M., VAN SNICK, J., et al. The role of interferon-beta 1 and the 26-kDa protein (interferon-beta 2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.** v. 139(6): p.1867, 1987.

VANDERAH, T. W.; GARDELL, L. R.; SUENAGA, N. M. H.; ZHONG, C. M.; MALAN, T. P. JR.; LAI, J.; PORRECA, F. Enhanced evoked CGRP after spinal nerve injury is mediated by spinal dynorphin. *In: 31st ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 31<sup>st</sup>, 2001, San Diego. SFN Abstract Viewer and Itinerary Planner.* Disponível em: <<http://sfn.scholarone.com/itin2001>>. Acesso em: 23 Apr. 2009.

VEIZEROVÁ, L.; SVETLÍK, J.; KETTMANN, V. Voltage gated calcium channels: structure, characteristics and terminology. **Ceska Slov. Farm.**, v. 56, n. 4, p. 178-182, July 2007.

VOLLMER, K. O.; VON HODENBERG, A.; KÖLLE, E. U. Pharmacokinetics and metabolism of gabapentin in rat, dog and man. **Arzneimittelforschung**, v. 36, n. 5, p. 830-839, May 1986.

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

WAGNER R; MYERS RR. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, p. 625-629, 1996

WAHL, S. M.; HUNT, D. A.; WONG, H. L.; DOUGHERTY, S.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; WAHL, L. M.; ELLINGSWORTH, L.; SCHMIDT, J. A.; HALL, G.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor $\beta$  is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1 dependent lymphocyte proliferation. **J. Immunol.**, v. 140, p. 3026, 1988.

WALL, P. D.; DEVOR, M.; INBAL, R.; SCADDING, J. W.; SCHONFELD, D.; SELTZER, Z.; TOMKIEWICZ, M. M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. **Pain**, v. 7, p. 103-113, 1979.

WALL, P. D.; GUTNICK, M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses arising from a neuroma. **Exp. Neurol.**, v. 45, p. 576-589, 1974.

WAMIL, A. W.; MCLEAN, M. J.; TAYLOR, C. P. Multiple cellular actions of gabapentin. **Neurology**, v. 41, Suppl. 1, p. 140, 1991.

WANG, P.; WU, P.; ANTHES, J.; SIEGEL, I.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M. **Blood**. v. 83, p.2678-2683, 1994a.

WANG, P.; WU, P.; SIEGEL, I.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M. **J. Immunol.** v. 153, p. 811-816, 1994b.

WANG, P.; WU, P.; SIEGEL, I.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M. InterleukinB (NFB) activation in human monocytes. IL-10 (IL)-10 inhibits nuclear factor and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 16, p. 9558–9563, Apr. 1995.

WANG, Z.; WANG, J.; LI, X.; YUAN, Y.; FAN, G. Interleukin-1 beta of Red nucleus involved in the development of allodynia in spared nerve injury rats. **Exp. Brain Res.**, v. 188, n. 3, p. 379-384, July 2008.

WARE, C.F., CROWE, P.D., VANARSDALE, T.L., ANDREWS, J.L., GRAYSON, M.H., JERZY, R., SMITH, C.A., GOODWIN, R.G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. **J. Immunol.**, v. 147(12), p. 4229–4238. 1991.

WEE YONG, V.; POWER, C.; FORSYTH, P.; AND EDWARDS, D.R.. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nat. Rev.** v.2, p.502–511, 2001

WELTY, D. F.; SCHIELKE, G. P.; VARTANIAN, M. G.; TAYLOR, C. P. Gabapentin anticonvulsivant action in rats: disequilibrium with peak drug concentration in plasma and brain microdialysate. **Epilepsy Res.** v. 16, p. 175-118, 1993.

WERNER, M. U.; PERKINS, F. M.; HOLTE, K.; PEDERSEN, J. L.; KEHLET, H. Effects of gabapentin in acute inflammatory pain in humans. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 26, p. 322-328, 2001.

WIESENFELD, Z., LINDBLOM, U. Behavioral and electrophysiological effects of vearious types of peripheral nerve lesions in the rat: a comparison of possible models for chronic pain. **Pain**, v. 8, p. 285-298, 1980.

WOLFE, F.; SMYTHE, H. A.; YUNUS, M. B.; BENNETT, R. M.; BOMBARDIER, C.; GOLDENBERG, D. L.; TUGWELL, P.; CAMPBELL, S. M.; ABELES, M.; CLARK, P. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Athristis Rheum.**, v. 33, n. 2, p. 160-172, Feb. 1990.

WOOLF, C. J. Molecular Signals Responsible for the Reorganization of the Synaptic Circuitry of the Dorsal Horn after Peripheral Nerve Injury. *In*: BORSOOK, D. (Ed.). **Molecular neurobiology of pain**. Seattle: Iasp Press, p. 171-200. (Progress in Pain Research Management, v. 9). 1997

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanism, and management. **Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

WOOLF, C. J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R. E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. **Nature**, v. 355, p. 75-78, 1992.

WOOLF, C. J.; SLATER, M. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

WU, W. P.; HAO, J. X.; ONGINI, E.; IMPAGNATIELLO, F.; PRESOTTO, C.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; XU, X. J. A nitric oxide (NO)-releasing derivative of gabapentin, NCX 8001, alleviates neuropathic pain-like behavior after spinal cord and Peripheral nerve injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 1, p. 65-74, Jan. 2004.

YAKSH, T. L.; CHAPLAN, S. R. Physiology and pharmacology of neuropathic pain. **Anesthesiol. Clin. N. Am.**, v. 15, p. 335-335, 1997.

YAN, P.; LIU, N.; KIM, G. M.; XU, J.; XU, J.; LI, Q.; HSU, C. Y.; XU, X. M. Expression of the type 1 and type 2 receptors for tumor necrosis factor after traumatic spinal cord injury in adult rats. **Exp. Neurol.**, v. 183, n. 2, p. 286-297, Oct. 2003.

YASHPAL, K; PITCHER G.M.; PARENT A.; QUIRION R.; CODERRE; T.J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in 3H-phorbol12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. *J. Neurosci.* v.15: p. 3263-72. 1995.

YIU, G. & ZHIGANG.H. Glial inhibition of CNS axon regeneration (sobre o RhoA). **Nature Reviews Neurocience**, v.7, p. 617-627. 2006.

YOLES E.; SCHWARTZ M.. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol.*, v. 116, p.906-910, 1998.

XIAO, W.-H.; BENNETT, G.J..Gabapentin has an antinociceptive effect mediated via a spinal site of action in a rat model of painful peripheral neuropathy. *Analgesia.*, v 2, p. 267-273.1996.

XIAO, W.-H.; BENNETT, G.J.; Gabapentin relieves abnormal pain sensations via a spinal site of action in rat model of painful peripheral neuropathy. 1997.

ZANELLA, J. M.; BURRIGHT, E. N.; HILDEBRAND, K.; HOBOT, C.; COX, M.; CHRISTOFERSON, L.; MCKAY, W. F. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. **Spine**, v. 33, n. 3, p. 227-234, Feb. 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, June 1983.

ZHAI Q; WANG J; KIM A; LIU Q; WATTS R; et al 2003. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. **Neuron**. v.39; p.217-25, 2003.

ZHONG J., DIETZEL ID, WAHLE P; KOPF M; HEUMANN R. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **J Neurosci** 19; 4305-4313, 1999.

ZHOU, Z., PENG, X.; INSOLERA R, FINK, D.J.; MATA, M.. Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. **Journal of Neurochemistry**. v. 110 (5), p. 1617-1627. 2009.

ZUCALI, J.R. DINARELLO, C.A.; OBLON, D.J.; GROSS, M.A.; ANDERSON, L.; WAINER, R.S.J. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. **Clin. Invest**. v. 77, 1857, 1986.

**ANEXOS**

**Anexo A: Tabela 3. Efeito do Tratamento crônico com GBP (30, 60, 120 e 240mg/kg) no tempo (segundos) dos comportamentos espontâneos de animais com CCNC. Observações realizadas antes da CCNC e cinco dias após. Resultados na forma de Delta (tempo das observações antes da CCNC – observações do 5º dia)**

Behaviour	Grupos: Sets	Média ± EPM dos animais com CCNC											Média ± EPM dos animais intactos						
		Sham (N=23)		Salina (N=20)		GBP30 (N=10)		GBP60 (N=14)		GBP120 (N=13)		GBP240 (N=5)		Salina (N=12)		GBP60 (N=12)		GBP120 (N=12)	
		MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM	MÉDIA	EPM
Scratch.D	antes	1,48	1,13	2,20	1,14	2,30	1,32	1,28	0,80	5,00	2,14	0,60	0,70	1,67	0,48	3,12	0,78	0,00	0,00
	5º dia	2,13	0,17	34,0#	10,20	4,5*	2,74	5,5*	4,44	6,77*	7,08	5,8*	2,59	6,92	3,44	1,33	0,49	3,50	1,09
	Delta	0,65	0,97	31,8#	6,65	2,2*	2,36	4,21*	4,51	1,77*	6,90	5,2*	2,59	5,25	5,81	-1,79	1,60	3,50	1,79
Biting D	antes	1,83	1,19	0,18	0,46	1,00	1,05	2,85	1,43	1,45	0,78	1,60	1,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5º dia	1,22	0,70	7,54#	2,82	3,30	1,88	0,71*	0,77	2,64	1,03	0,40*	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Delta	(-0,61)	1,44	6,72#	2,97	2,30	2,34	-2,14*	1,83	1,18	1,35	-1,20*	1,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rearing	antes	140,81	20,81	136,27	21,92	108,90	17,44	94,57	18,10	145,60	19,14	171,60	24,92	137,13	12,26	121,67	10,15	113,33	10,11
	5º dia	121,81	16,36	54,40	11,74	75,90	15,93	112,57	12,75	74,80	10,19	47,80	9,23	117,00	15,63	193,50	13,66	170,83	14,78
	Delta	-17,35	18,48	-81,86	26,31	-33,00	23,70	18,00*	26,72	-70,80	21,40	-123,80	29,53	-20,13	15,48	71,83*	15,22	57,5*	15,64
Climbing	antes	103,50	16,19	129,95	17,42	103,26	15,08	79,22	20,54	102,20	22,63	111,00	18,74	152,40	10,64	132,79	7,42	122,50	8,95
	5º dia	89,44	9,70	95,28	17,17	76,87	14,51	80,66	16,65	138,20	24,12	48,60	9,83	111,64	8,31	146,16	12,40	148,50	9,91
	Delta	-14,06	21,01	-35,05	22,02	-28,80	16,12	1,44	19,75	36,00	29,43	-62,40	26,86	-32,77	13,70	13,37	11,16	26,00	12,68
Walking	antes	74,56	10,19	64,35	8,45	64,60	6,63	34,55	10,37	56,54	9,40	62,20	8,90	138,00	7,45	119,20	8,64	132,25	12,42
	5º dia	51,26	7,10	47,75	7,29	64,10	11,50	66,33	13,26	49,69	7,90	42,20	9,60	119,33	8,58	160,66	12,48	127,75	7,23
	Delta	-23,30	11,73	-16,60	10,68	-0,50	15,24	31,77	17,69	-6,85	12,39	-20,00	19,24	-7,90	12,29	41,45	13,67	-4,50	15,57
Exploration	antes	318,87	15,73	330,57	15,93	276,76	13,05	208,34	16,34	304,34	17,06	344,80	17,52	427,53	10,12	373,66	8,74	368,08	10,49
	5º dia	262,51	11,05	197,43	12,07	216,87	13,98	248,99	14,22	262,69	14,07	138,60	9,55	347,97	10,84	500,32	12,85	447,08	10,64
	Delta	-54,71	17,07	-133,51	19,67	-62,30	18,35	40,63	19,23	-41,65	21,07	-206,20	25,21	-60,80	13,82	126,65	13,35	79,00	14,63
Sniffing	antes	748,95	31,54	725,95	43,47	783,40	26,68	821,90	56,93	839,21	32,56	738,80	33,34	710,29	18,34	748,87	12,13	742,95	28,95
	5º dia	823,86	23,84	692,95	51,99	626,80	108,55	686,10	69,24	632,92	39,26	884,2*	28,98	718,75	23,15	604,66	16,93	646,58	23,23*
	Delta	87,40	39,33	-33,00	56,23	-156,60	97,40	-135,80	62,76	-215,53	53,27*	145,40	53,96	20,54	23,78	-144,20	22,52*	-96,37	28,13*
Rest-sleep	antes	37,93	21,98	18,11	13,39	25,33	15,15	77,35	47,06	11,73	9,55	40,60	27,51	4,58	3,96	10,92	7,76	4,42	2,97
	5º dia	15,35	6,80	113,25	66,36	156,60	74,34	64,00	28,75	110,38	41,72	45,20	27,99	2,50	2,16	13,08	11,33	0,00	0,00
	Delta	-22,58	22,43	95,14	72,23	131,26	79,47	-13,35	53,87	88,00	46,43	4,60	44,29	-2,08	1,80	2,17	12,85	-4,42	2,97
Imobility	antes	788,36	39,70	705,17	33,52	796,47	30,10	830,16	28,06	860,40	31,35	779,40	33,16	714,87	18,34	759,79	12,13	747,37	28,95
	5º dia	842,00	20,00	838,04	25,95	820,53	42,99	757,21	29,40	810,87	26,75	929,40	16,98	721,25	23,15	617,74	16,93	646,58	23,23*
	Delta	53,64	42,48	132,87	43,32	24,07	60,64	-72,95	43,91	-49,53	31,93	150,00	44,83	6,38	23,78	-142,03	22,52*	-100,79	28,13*

Tabela 3. Todas as observações dos comportamentos espontâneos. Nota: O comp. exploration = rearing + climbing + walking. O comportamento immobility = rest-sleeping + sniffing. Delta (ou ganho) = observ. antes – obs. no 5º dia. # P < 0,05 em relação ao Sham. \* P < 0,05 em relação ao G. salina. Teste: Anova e Turkey

Anexo B: Artigo publicado durante o período de doutoramento:

Arq Neuropsiquiatr 2009;67(3-8):866-870

## **PAIN IN TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS/ HTLV-I ASSOCIATED MYELOPATHY PATIENTS**

*Carlos Mauricio de Castro-Costa<sup>1</sup>, Abelardo de Queiroz Campos Araujo<sup>2</sup>,  
Carlos C. Câmara<sup>1</sup>, Ayrton S. Ferreira<sup>1</sup>, Terezinha de Jesus T. Santos<sup>1</sup>,  
Samuel Bovy de Castro-Costa<sup>1</sup>, Raimundo Neudson M. Alcântara<sup>1</sup>, Graham P. Taylor<sup>3</sup>*

**Abstract** – Objective: Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I Associated Myelopathy (TSP/HAM) is a chronic myelopathy, and pain has been mentioned as a frequent sensory symptom in this condition. The authors aimed at analyzing this symptom in a TSP/HAM patients series. Method: For this, 46 patients were analyzed considering demographic and clinical characteristics and complaint of pain as to verbal description, time of onset and classification, correlated with the degree of motor disability and type of pain. Results: Among the 46 TSP/HAM patients, 28 (60.8%) complained of pain, predominant in the early phase of the disease. Most of the patients exhibited neuropathic characteristics of pain, correlated with increased motor disability. Conclusion: Pain in TSP/HAM patients is a frequent and early symptom, and the neuropathic type is predominant (57.1%) and paralleled with increased incapacitation. The pathogenic involvement of cytokines may possibly be involved in the meaning of this symptom in this condition.

KEY WORDS: TSP/HAM, HTLV-I, pain, inflammatory nociceptive and neuropathic, cytokines.

**Dor em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I**

Anexo C: Artigo Submetido à publicação:

**Minor and Major Motor Behavioral Abnormalities and Histopathological Analysis of Wistar Rats Inoculated with HTLV-1-Infected MT2 Cells**

**Behavioral Changes in Rats with HTLV-1-Infected MT2 Cells**

C.C. Câmara<sup>1</sup>, C.M. de Castro-Costa<sup>1,2</sup>, T.C. Felismino<sup>1</sup>, A.P. da Silva<sup>1</sup>, M.A.M. da Silva<sup>1</sup>, J.V. de Araújo<sup>1</sup>, S.B.C. Costa<sup>1,2</sup>, T.J. Teixeira-Santos<sup>1,2</sup> and R.B. Oriá<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurologia Experimental e Neurofisiologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro, Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fortaleza, Ceará, Brasil

**Address for Correspondence**

C.C. Câmara, DFF, UFC / Rua Cel. Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo / 60430-270 – Fortaleza-CE – Brasil / +55 85 3366-8202 (UFC) / 3366-8333 (FAX) / [mcastro@ufc.br](mailto:mcastro@ufc.br)

Anexo D: Artigo Submetido à publicação:

To: mcastro@ufc.br  
Subject: [BJMBR]118-Minor and Major Motor Behavioral Abnormalities and Histopathological Analysis of Wistar Rats Inoculated with  
Date: Wed, 30 Sep 2009 16:03:44 -0300  
From: bjnbr@terra.com.br

Minor and Major Motor Behavioral Abnormalities and Histopathological Analysis of Wistar Rats Inoculated with HTLV-1-Infected MT2 Cells

Prezado Dr. Carlos Maurício de Castro Costa,

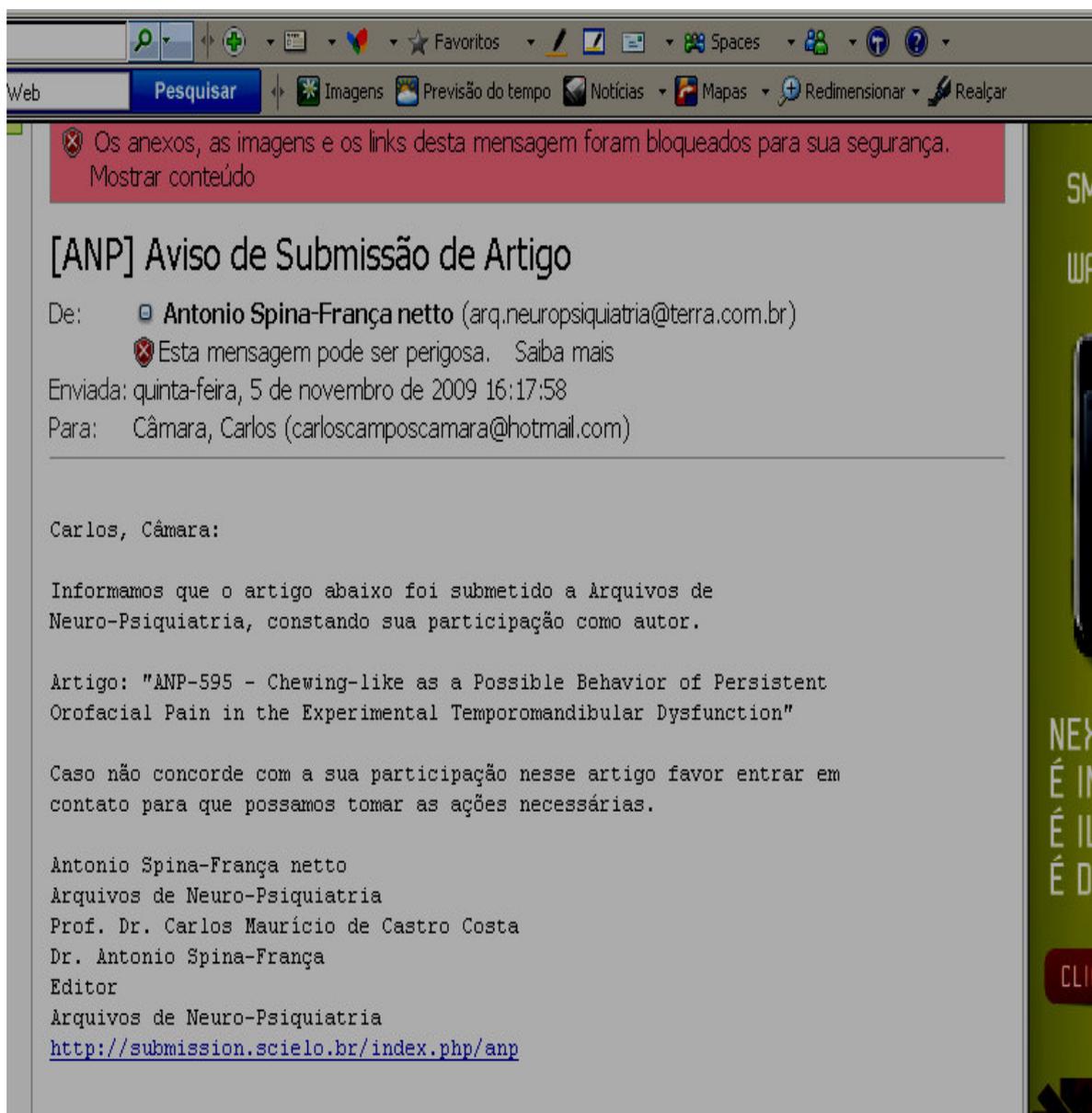
Recebemos seu trabalho acima referido e ao prepará-lo para enviar ao Editor Seccional verificamos que é necessário que V.Sa. nos remeta arquivos com novas figuras: 6 e 7, com 300 dpi de resolução, com extensão "tif" as figuras devem ter barra de magnificação com as unidades equivalentes em micrometers. Infelizmente precisamos ter o tamanho da barra de magnificação e seu valor em micrometros e não a magnificação de 400x ou 100x. Lamentamos mas esta informação não é suficiente. A barra permite qualquer amplificação ou redução após ser aplicada. Se nós reduzimos sua figura sua magnificação não é mais válida. Favor levar este problema para o morfologista que o auxiliou. Anexo segue arquivo com explanação que poderá auxiliar V.Sa.

O senhor poderá enviar um arquivo rar ou zip com todas as figuras ou pode enviar uma a uma se ficarem muito pesadas.

Instruções sobre submissão de figuras pode ser encontrado na homepage ([bjournal.com.br](http://bjournal.com.br)).

Contamos com sua colaboração e informamos que o processo ficará parado aguardando o recebimento do material solicitado. Por favor, acuse o recebimento deste email.

## Anexo D: Artigo Submetido à publicação:



## Anexo E: Artigo Submetido à publicação:

De:  **Antonio Spina-França netto** (arq.neuropsiquiatria@terra.com.br)

 Esta mensagem pode ser perigosa. Saiba mais

Enviada: quinta-feira, 5 de novembro de 2009 15:04:11

Para: Câmara, Carlos (carloscamposcamara@hotmail.com)

---

Carlos, Câmara:

Informamos que o artigo abaixo foi submetido a Arquivos de Neuro-Psiquiatria, constando sua participação como autor.

Artigo: "ANP-594 - Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy in Husband and Wife of the Same Family: a report of two cases"

Caso não concorde com a sua participação nesse artigo favor entrar em contato para que possamos tomar as ações necessárias.

Antonio Spina-França netto  
Arquivos de Neuro-Psiquiatria  
Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa  
Dr. Antonio Spina-França  
Editor  
Arquivos de Neuro-Psiquiatria  
<http://submission.scielo.br/index.php/anp>

Anexo F: Artigo Submetido à publicação:

## [ANP] Revisión editorial de artículo - Revisões requeridas

De:  Luis dos Ramos Machado (luisrmachado@globo.com)

Enviada: quinta-feira, 22 de outubro de 2009 13:15:48

Para: Carlos Maurício de Castro Costa (mcastro@ufc.br)

Cc: ayrton-ferreira@ig.com.br; mcastro@ufc.br; irna74@uol.com.br;  
tjteixerasantos@hotmail.com; sambovy@gmail.com; carloscamposcamara@hotmail.com;  
oria@ufc.br

@ 1 anexo

ANP- 349-...doc (38,5 KB)

{ \$AuthorName }:

Acabamos de finalizar a revisão de seu envio "ANP-349 - Sphincter Alteration in Polytransfused Patient Due to Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Initial Manifestation of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (TSP/HAM)."

A decisão da Junta Editorial, de acordo com o parecer dos avaliadores, é solicitar que o manuscrito seja revisto, levando em conta as sugestões e críticas apresentadas.

Comentários adicionais sobre o manuscrito, baseados na avaliação editorial e pelos pares, estão disponíveis acessando o sistema:

URL da Submissão:

<http://submission.scielo.br/index.php/anp/author/submission/14545>

Login: carlos\_costa

## Anexo G: Artigo Submetido à publicação:

**[ANP] Revisión editorial de artículo - Revisões requeridas**

De:  **Luis dos Ramos Machado** (luisrmachado@globo.com)

 Você pode não conhecer este remetente. [Marcar como confiável](#) | [Marcar como lixo](#)

Enviada: quinta-feira, 10 de setembro de 2009 14:13:49

Para: Carlos Maurício de Castro Costa (mcastro@ufc.br)

Cc: ayrton-ferreira@ig.com.br; mcastro@ufc.br; irna74@uol.com.br;  
tjteixeirasantos@hotmail.com; sambovy@gmail.com; carloscamposcamara@hotmail.com;  
oria@ufc.br; gondimfranc@yahoo.com

@ 1 anexo

ANP- 355-...doc (36,0 KB)

{ \$AuthorName }:

Acabamos de finalizar a revisão de seu envio "ANP-355 - Polymyositis in Childhood as Primary Clinical Manifestation Associated with HTLV-1: A Case Report."

A decisão da Junta Editorial, de acordo com o parecer dos avaliadores, é solicitar que o manuscrito seja revisto, levando em conta as sugestões e críticas apresentadas.

Comentários adicionais sobre o manuscrito, baseados na avaliação editorial e pelos pares, estão disponíveis acessando o sistema:

URL da Submissão:

<http://submission.scielo.org/index.php/anp/author/submission/14615>

Login: carlos\_costa

# 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](#)