

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO, POR MEIO DOS REFLEXOS DE
AUTO-LIMPEZA E RETIRADA DA CAUDA, EM MODELO DE ATIVAÇÃO PERIFÉRICA E
SISTÊMICA DE VIAS TRIGEMINAIS**

Alexandre da Silveira Perla

Julho de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO, POR MEIO DOS REFLEXOS DE
AUTO-LIMPEZA E RETIRADA DA CAUDA, EM MODELO DE ATIVAÇÃO PERIFÉRICA E
SISTÊMICA DE VIAS TRIGEMINAIS**

ALEXANDRE DA SILVEIRA PERLA

Orientação: PROFA. DRA. MARIA BEATRIZ CARDOSO FERREIRA

Co-orientação: PROFA. DRA. MATILDE ACHAVAL ELENA

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre na referida área.**

Julho de 2007

Dedico esta Dissertação a minha esposa Débora e aos meus amados filhos Gabriel e Rafael.

Na vida, não existe o caminho certo, nem o errado. Há sempre dois caminhos a seguir, o mais simples e o mais complexo. Depende do que se queira aprender. O final é sempre o mesmo!

AGRADECIMENTOS

Ao Pai maior, que me proporcionou mais uma opção de aprendizado nessa existência.

À minha eterna companheira, Débora Fortes Meirelles, pelo amor incondicional, companheira de todas as horas, que sempre me incentivou e participou da minha vida em todos os momentos.

Aos meus filhos amados, Gabriel e Rafael, meus anjos, por existirem e serem minha fonte de inspiração.

Aos meus pais Carlos e Francisca, por terem me ensinado o verdadeiro significado das palavras trabalho, respeito, dignidade e ética e que tudo é possível quando se tem um sonho.

À minha querida amiga e orientadora Professora Maria Beatriz, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, incentivo, confiança, por ter me ensinado que um caminho difícil pode ser percorrido sem sofrimento.

À querida Professora Matilde Achaval, minha co-orientadora, pela amizade e ensinamentos despendidos.

Aos meus queridos amigos Dr. Nelson Aspese e Cassandra Borges, pelo apoio e amizade nas horas mais difíceis.

À Professora Liselotte Menke Barea, além de agradecimento, meu mais profundo respeito por minha formação de qualidade na área de estudo das cefaléias.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia da Dor, especialmente a Joana, Luciane, Giovana e Lauren, pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada, especialmente a Jocemar, Patrícia e Rafaela, Paula e Érica pela amizade e auxílio nos experimentos.

Aos meus colegas médicos e pacientes, pela paciência e compreensão pelas vezes que deixei de lado o exercício da medicina para fazer os experimentos dessa dissertação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de excelência que me foi oferecido durante a graduação e a pós-graduação.

Ao Serviço de Neurologia do Complexo Hospitalar Santa Casa e FFFCMPA, na pessoa do Professor Luis Nelson Fernandes, por minha formação em Neurologia.

Ao Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que me acolheu e me proporcionou coordenar o Ambulatório de Cefaléias.

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente à Ieda e à Cláudia.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela formação proporcionada.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	09
Lista de tabelas	11
Lista de figuras	12
Resumo	16
<i>Abstract</i>	17
Introdução	18
1. Nociceção	20
2. Modulação da dor	24
3. Dores cefálicas	29
4. Processo inflamatório vascular neurogênico	31
5. Fisiopatogenia das dores cefálicas	32
6. Dor cefálica e óxido nítrico	38
7. Tratamento das dores cefálicas	41
8. Modelos experimentais para o estudo das cefaléias	42
8.1. Modelos vasculares <i>in vivo</i> para estudos farmacológicos	44
8.2. Modelos vasculares <i>in vitro</i> para estudos farmacológicos	46
8.3. Modelos neurovasculares para estudos farmacológicos	46
9. Modelo neurovascular de ativação trigeminal por administração de nitroglicerina, por via sistêmica	47
10. Dor orofacial induzida por formalina subcutânea	48
Objetivos	52
1. Objetivo geral	53
2. Objetivos específicos	53
Material e métodos	54

1. Animais experimentais	55
2. Avaliações comportamentais	55
2.1. Observação em campo aberto	55
2.2. Avaliação do reflexo de retirada da cauda (<i>tail-flick</i>)	57
2.3. Nociceção orofacial induzida pela administração subcutânea de formalina	59
2.4. Modelo neurovascular de ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina	60
3. Tratamentos farmacológicos	61
4. Análise estatística	61
5. Aspectos éticos	62
Resultados	63
Experimento 1: Avaliação de parâmetros comportamentais e resposta nociceptiva em ratos submetidos a modelo de dor orofacial induzida por formalina subcutânea.	64
Experimento 2: Avaliação do padrão temporal do reflexo de auto-limpeza (<i>grooming</i>) como medida indicativa de nociceção em ratos submetidos a modelo de dor orofacial induzida por formalina subcutânea.	71
Experimento 3: Perfil do reflexo de retirada da cauda (<i>tail-flick latency</i>) e do reflexo de auto-limpeza (<i>grooming</i>) após a administração sistêmica de nitroglicerina como modelo experimental de cefaléia.	78
Experimento 4: Avaliação do modelo de dor orofacial induzida pela formalina associado ao modelo experimental de cefaléia, induzido pelo uso sistêmico de nitroglicerina.	83
Discussão	104
Conclusões	135

Perspectivas	139
Referências Bibliográficas	142

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAV: anastomoses arteriovenosas cranianas
- Ach: acetilcolina
- ANOVA: análise de variância
- ATP: adenosina trifosfato
- CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CIOMS: Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (*Council for International Organizations of Medical Sciences* em inglês)
- Cl⁻: cloro
- cm: centímetro(s)
- COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CREAL: Centro de Reprodução de Animais de Laboratório
- DPM: desvio padrão da média
- g: grama(s)
- GABA: ácido gama-aminobutírico
- GMPc: guanosina monofosfatada cíclica
- GTP: guanosina trifosfatada
- h: hora(s)
- 5-HT: serotonina
- IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain* em inglês)
- IHS: *International Headache Society*
- ILAR: Instituto de Pesquisas em Animais de Laboratório (*Institute of Laboratory Animal Resources* em inglês)
- i.p.: intraperitoneal

- kg: quilograma
- mA: miliampére(s)
- mg: miligrama(s)
- min: minuto(s)
- ml: mililitro(s)
- mm: milímetro(s)
- NA: noradrenalina
- NaCl: cloreto de sódio
- NANC: *nonadrenergic, noncholinergic neurotransmitters*
- NCT: núcleo caudal do trigêmeo
- NKA: neuroquinina A
- NMDA: *N*-metil-D-aspartato
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* ou NOS, em inglês)
- NPY: neuropeptídeo Y
- NTG: nitroglicerina
- PACAP: *pituitare adenylate cyclase activating peptide*
- s: segundo(s)
- s.c.: subcutâneo(a)
- SP: substância P
- STV: sistema trigeminovascular
- TFL: latência de retirada da cauda (*tail-flick latency* em inglês)
- VIP: peptídeo intestinal vasoativo (*vasoactive intestinal peptide* em inglês)
- WDR: neurônio de ampla faixa dinâmica (*wide dynamic range* em inglês)
- µl: microlitro(s)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de cefaléias primárias, segundo critérios de <i>International Headache Society</i> .	30
Tabela 2. Achados clínicos observados em crises de enxaqueca e suas possíveis correlações biológicas.	43
Tabela 3. Modelos em animais para estudo de dores cefálicas.	45
Tabela 4. Medidas dos parâmetros comportamentais em estudo, obtidas imediatamente antes da administração subcutânea de solução de formalina a 5% ou solução salina na vibrissa direita dos ratos, em teste de <i>tail-flick</i> e durante a observação em campo aberto.	66
Tabela 5. Latência de retirada da cauda e tempo gasto em auto-limpeza em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita de ratos.	72
Tabela 6. Latência de retirada da cauda e tempo gasto em reflexo de auto-limpeza em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração intraperitoneal de nitroglicerina 0,05% (10 mg/ml) ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água) em ratos.	80
Tabela 7. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza e latência de retirada da cauda em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração subcutânea de solução de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita e da administração intraperitoneal de nitroglicerina 0,05% (10 mg/ml) ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água), no primeiro dia da primeira semana de experimento.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias ascendentes nociceptivas de cabeça, região cervical alta (C1, C2), tronco e membros até córtex somestésico.	23
Figura 2. Vias do sistema central descendente de modulação da dor	25
Figura 3. Relações entre vias aferentes e eferentes dos mecanismos desencadeadores e neuromoduladores de dores cefálicas.	33
Figura 4. Vias neuronais envolvendo a ativação trigeminovascular e o processo da dor	34
Figura 5. Inflamação Neurogênica.	36
Figura 6. Síntese de NO endotelial.	39
Figura 7. Caixa de madeira para observação em campo aberto, recoberta por fórmica (interna e externamente), medindo 50 x 60 x 40 cm de profundidade, com face anterior de vidro e assoalho dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras.	56
Figura 8. Padrões comportamentais observados em campo aberto.	57
Figura 9. Aparelho de medida de reflexo de retirada da cauda (<i>tail-flick</i>).	58
Figura 10. Região orofacial de administração de formalina 5% subcutânea no rato	59
Figura 11. Organização geral do experimento 1. Esquema de administração do tratamento proposto (agente irritante ou solução controle) e tempos de medidas dos parâmetros comportamentais em estudo.	65
Figura 12. Latência de retirada da cauda imediatamente antes (basal) e após (30 min ou 24 h) a administração subcutânea de solução de formalina a 5% (50 µl) ou salina (50 µl), na vibrissa direita dos ratos.	66
Figura 13. Número de cruzamentos em campo aberto antes (basal), imediatamente após (0 min) e depois de 15 min e 24 h da administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos.	68
Figura 14. Número de respostas de orientação em campo aberto antes (basal) e após (0	69

min, 15 min ou 24 h) a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos.

Figura 15. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto antes (basal) e após (0 min, 15 min ou 24 h) a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos. 70

Figura 16. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza no campo aberto, durante observação realizada nas primeiras 4 horas após a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos. 74

Figura 17. Tempo gasto no comportamento de auto-limpeza em campo aberto, medido antes (basal) e após 24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias da administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos. 75

Figura 18. Latência do reflexo de retirada da cauda (*tail-flick latency*) imediatamente antes (basal) e em diferentes momentos durante as primeiras 4 horas seguintes à administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita dos ratos. 76

Figura 19. Latência de reflexo de retirada da cauda imediatamente antes (basal), 24 h, 48 h, 7 e 14 dias após a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µl) ou solução salina (50 µl) na vibrissa direita de ratos. 77

Figura 20. Organização geral do experimento 3. Esquema de administração do tratamento proposto (nitroglicerina ou veículo) e mensuração dos parâmetros comportamentais em estudo. 79

Figura 21. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) no campo aberto, imediatamente antes (basal) e após 5 min, 30 min, 1 h, 2 h e 4 h da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo. 81

Figura 22. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) no campo aberto, imediatamente antes (basal) e após período mais prolongado de observação 81

(24 h e 48 h), a partir da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo.

Figura 23. Latência de retirada da cauda (*tail-flick latency*) imediatamente antes (basal), depois de 30 min e após período mais prolongado de observação (24 h e 48 h), a partir da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo em ratos. 82

Figura 24. Organização geral do experimento 4. Esquema de administração dos tratamentos propostos e aferição dos parâmetros comportamentais em estudo. 86

Figura 25. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, nos períodos basais de avaliação, durante as três semanas de experimento. 88

Figura 26. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 90

Figura 27. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 30 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 91

Figura 28. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 120 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 92

Figura 29. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 93

Figura 30. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 24 horas após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 94

Figura 31. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo 95

aberto, 48 horas após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento.

Figura 32. Latência de retirada da cauda (*tail-flick*) no período prévio à administração dos tratamentos propostos (basal), durante as três semanas de experimento. 96

Figura 33. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 97

Figura 34. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 30 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 98

Figura 35. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 120 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 99

Figura 36. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 100

Figura 37. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 24 h após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 101

Figura 38. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 48 h após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. 102

Figura 39. Peso corporal dos animais durante as três semanas de experimento. 103

Figura 40. Ativação do Sistema Trigeminovascular durante dor de cabeça e sua interação com tálamo, hipotálamo, tronco e Sistema Nervoso Vegetativo 105

Figura 41. Vias nociceptivas da região da cabeça e cervical alta 116

Figura 42. Vias nociceptivas da região do tronco e membros 117

RESUMO

As regiões orofacial e craniana são densamente inervadas pelo nervo trigêmeo e suas ramificações. Condições patológicas, como cefaléias e dores orofaciais, têm sua fisiopatogenia relacionada ao funcionamento do sistema trigeminal. Existem poucos modelos experimentais de avaliação comportamental para estudo da nocicepção mediada pelo nervo trigêmeo. Essa dissertação teve por objetivo realizar estudos comportamentais sobre a modulação da nocicepção mediada por vias trigeminais, em modelo animal correlacionável com os quadros de dores orofaciais e cefálicas em seres humanos. Para tal, foi promovida a ativação do sistema trigeminovascular de modos periférico (dor orofacial induzida por formalina) e sistêmico (modelo neurovascular de ativação sistêmica por administração de nitroglicerina). Após essa ativação, avaliaram-se comportamentos de auto-limpeza, motricidade e orientação espacial, em campo aberto, e resposta reflexa a estímulo nociceptivo, por meio da medida de latência de retirada da cauda. Entre as respostas comportamentais avaliadas, o tempo despendido em reflexo de auto-limpeza foi considerado o parâmetro representativo da resposta nociceptiva no modelo de dor orofacial induzida pela formalina. A administração de nitroglicerina, por si só, não foi capaz de promover alterações comportamentais sugestivas de atividade nociceptiva. A medida de latência de retirada da cauda não foi capaz de aferir alterações nociceptivas potencialmente desencadeadas pelos dois modelos empregados nessa Dissertação. Na associação desses dois modelos, observou-se que a nitroglicerina foi capaz de promover redução do tempo gasto no reflexo de auto-limpeza desencadeado pela formalina administrada por via subcutânea. É possível que a nitroglicerina participe modulando e/ou ativando os mecanismos envolvidos na nocicepção trigeminal, porém mais estudos necessitam ser realizados para delinear melhor sua ação nesse processo.

ABSTRACT

The orofacial and cranium regions are densely innervated by the trigeminal nerve and their branches. Pathological states as headache and orofacial pain have their pathogenesis related to the trigeminal functions. There are few experimental models for behavioral evaluation of the nociception mediated by the trigeminal nerve. The present work aimed to study the behavioral parameters related to the modulation of trigeminal system, using an animal model capable of simulating orofacial and cephalic pain in human beings. Afterwards, it was performed the activation of trigeminovascular system using regional (through the orofacial formalin test) and/or systemic models (through intraperitoneal administration of nitroglycerine). In open field, it was evaluated grooming, crossing, and rearing behaviors. In tail-flick test, it was evaluated the nociceptive response to the noxious stimulus. In the present study, grooming was considered the representative behavior of the nociceptive response in the orofacial pain model (induced by formalin). Nitroglycerine was not capable to determine behavioral changes that suggest nociception reaction in the open field. The tail-flick latency did not detect potential nociceptive effects occurred in the evaluated models. In the association of the two models of regional and systemic trigeminal activation, nitroglycerine reversed the increase of grooming induced by the subcutaneous administration of formalin. The result suggests that nitroglycerine could act modulating and/or activating mechanisms involved in the trigeminal nociception. However, more studies are needed.

Introdução

Dor é uma das grandes preocupações da humanidade. Desde tempos mais remotos, o homem busca esclarecer sua ocorrência, bem como estabelecer medidas eficazes destinadas ao seu controle. É definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos deste tipo de dano (Turk e Okifuji, 2001). Existem, assim, dois componentes a serem considerados: a sensação dolorosa propriamente dita ou nocicepção e a reatividade à dor.

Nocicepção é a resposta neural a estímulos traumáticos ou lesivos. Refere-se à atividade do sistema nervoso aferente induzida por estímulos nocivos, tanto exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos), quanto endógenos (inflamação, aumento de peristaltismo, isquemia tecidual). Compreende a recepção dos estímulos por estruturas periféricas específicas, sua condução até o sistema nervoso central, através de vias nervosas sensitivas, e a integração da sensação dolorosa em níveis talâmico e cortical (Byers e Bonica, 2001; Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

A reação à dor compreende uma série de comportamentos defensivos - desde a retirada reflexa da área afetada, para longe do fator agressor, até as respostas emocionais complexas, expressas por padrões de comportamento inatos e aprendidos e sensações subjetivas de desconforto e sofrimento. A reatividade emocional corresponde à interpretação afetiva da dor, de caráter individual e influenciada por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e fatores culturais, sociais e ambientais (Jones, 1993; Taenzer *et al.*, 1986; Wall e Melzack, 1994). Esses fatores são capazes de filtrar, modular ou distorcer a sensação dolorosa, de modo que a resposta à dor pode variar marcadamente de um indivíduo para o outro, assim como em um mesmo indivíduo, em momentos diferentes, apesar de a nocicepção ser igual (Chapman e Turner, 2001; LeResche, 2001).

A dor é chamada de crônica quando perdura por longo período de tempo, comumente por três meses ou mais, embora tal ponto de corte seja arbitrário (Jacobson e Mariano, 2001; Morgan e Mikhail, 1996; Turk e Okifuji, 2001). Outra definição encontrada na literatura,

também ambígua, caracteriza a dor crônica como aquela cuja duração se estende além do período esperado de resolução do insulto nociceptivo (Ferreira e Perla, 2007).

Dor crônica causada por injúria ou doença é uma das principais causas de sofrimento humano. Postula-se que mudanças de longa duração nas sinapses sensoriais, em vários níveis do sistema nervoso central, estejam envolvidas na sua gênese (Ko e Zhuo, 2004).

A dor crônica representa por si só uma doença, com etiologia, mecanismos, sintomatologia, condutas diagnóstica e terapêutica diferentes da dor aguda (Ferreira e Perla, 2007). Nos dias de hoje, é crescente sua ocorrência, possivelmente relacionada a hábitos de vida atuais, longevidade, prolongamento da sobrevivência dos indivíduos com doenças naturalmente fatais e modificações ambientais. Além disso, há maior reconhecimento de novas patologias dolorosas, bem como aplicação de novos conceitos que traduzam seu significado (Mailis e Papagapiou, 1993).

Dor crônica, além de representar estressor físico e emocional significativo, tanto para o paciente, quanto para seus familiares, determina alto custo econômico e social. Com frequência, está associada a transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão, embora relação causal não esteja estabelecida. Em cerca de 5% dos indivíduos, há pobre resposta ao tratamento, em quadro de grande importância devido às suas graves repercussões individuais e sociais (Dray e Urban, 1996).

1. NOCICEPÇÃO

A percepção de estímulos nocivos acontece pela ativação de receptores sensoriais especializados - os nociceptores - localizados em quase todo o organismo (Basbaum e Jessell, 2000). Os nociceptores constituem a porção terminal periférica de fibras que conduzem os potenciais de ação propagados até o corno dorsal da medula espinhal e porção caudal do nervo trigêmeo. Tais fibras são os axônios de células sensoriais primárias, conhecidas como neurônios aferentes primários, localizadas em gânglio dorsal da medula espinhal e no gânglio

trigeminal (Gânglio de Gasser). Cada neurônio tem um único axônio que se bifurca, de modo que uma extremidade termina em tecidos periféricos e a outra, dentro do corno posterior (dorsal) da medula espinhal ou na porção cervical do núcleo sensitivo do nervo trigêmeo. Assim, o impulso doloroso captado na periferia dirige-se inicialmente para o corpo celular e, após, vai ao corno dorsal da medula espinhal, ou ao seu correspondente núcleo sensitivo caudal trigeminal (Basbaum e Jessell, 2000; Byers e Bonica, 2001; Morgan e Mikhail, 1996; Messlinger *et al.*, 2006).

As fibras que transmitem o estímulo nocivo são de dois tipos - A δ e C. As primeiras, mielinizadas e com maior velocidade de condução, contribuem para a percepção da dor de forma rápida, enquanto as fibras C, não-mielinizadas e com menor velocidade de condução, relacionam-se principalmente com a dor de caráter dolente (Basbaum e Jessell, 2000; Byers e Bonica, 2001; Morgan e Mikhail, 1996).

No corno dorsal da medula espinhal e no núcleo sensitivo caudal trigeminal, as fibras nervosas dos neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios secundários, que dão origem às vias ascendentes de condução da dor. Os axônios dos neurônios secundários cruzam a linha média e ascendem pelo trato espinotalâmico contralateral. As fibras trigeminais ascendem por meio do trato trigeminotalâmico (Messlinger *et al.*, 2006). Além das sinapses com neurônios de segunda ordem, os neurônios aferentes primários podem fazer sinapse com interneurônios, neurônios simpáticos e neurônios do corno ventral motor (Morgan e Mikhail, 1996; Terman e Bonica, 2001).

Os neurônios secundários podem ser de dois tipos - especificamente nociceptivos ou de faixa ampla (*wide dynamic range* ou WDR em inglês). Os primeiros relacionam-se apenas a estímulos nocivos, enquanto os segundos também recebem aferência não-nociceptiva de fibras A β , A δ e C. Os neurônios especificamente nociceptivos estão arranjados somatotopicamente na lâmina I do corno dorsal, são normalmente silentes e respondem apenas à estimulação nociva de alto limiar. Os neurônios de ampla faixa constituem o tipo

celular predominante no corno dorsal, sendo mais abundantes na lâmina V. Em condições de injúria grave ou persistente, as fibras C disparam repetidamente, e a resposta dos neurônios do corno dorsal aumenta progressivamente, de forma gradual, em um fenômeno conhecido como *wind-up* (Chudler e Bonica, 2001; Morgan e Mikhail, 1996; Terman e Bonica, 2001).

Há duas vias principais de condução da dor. Contidas no trato espinotalâmico, ambas partem da medula espinhal, cruzam a linha média (ao nível da comissura anterior) e chegam ao tálamo. O trato espinotalâmico lateral (ou via neoespinotalâmica), de aparecimento mais recente no curso da evolução biológica, tem poucas estações sinápticas e se projeta no núcleo ventral pósterolateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários. O trato trigeminotalâmico, de maneira análoga ao trato espinotalâmico, parte do núcleo sensitivo do trigêmeo, atravessa a linha média e ascende até o tálamo (núcleo ventral pósteromedial (Messlinger *et al.*, 2006). A partir do tálamo, as projeções dirigem-se para o córtex somatossensorial primário, onde ocorre a percepção da dor (Figura 1). Esses tratos relacionam-se com os aspectos discriminativos da dor, como localização, intensidade e duração. Observa-se estreita relação topográfica entre a área estimulada na periferia e as regiões talâmicas e corticais ativadas, ou seja, há somatotopia. Isto contribui para que o indivíduo saiba precisar com exatidão o ponto de origem da dor em um trauma (Bear *et al.*, 1996; Chudler e Bonica, 2001; Morgan e Mikhail, 1996; Terman e Bonica, 2001).

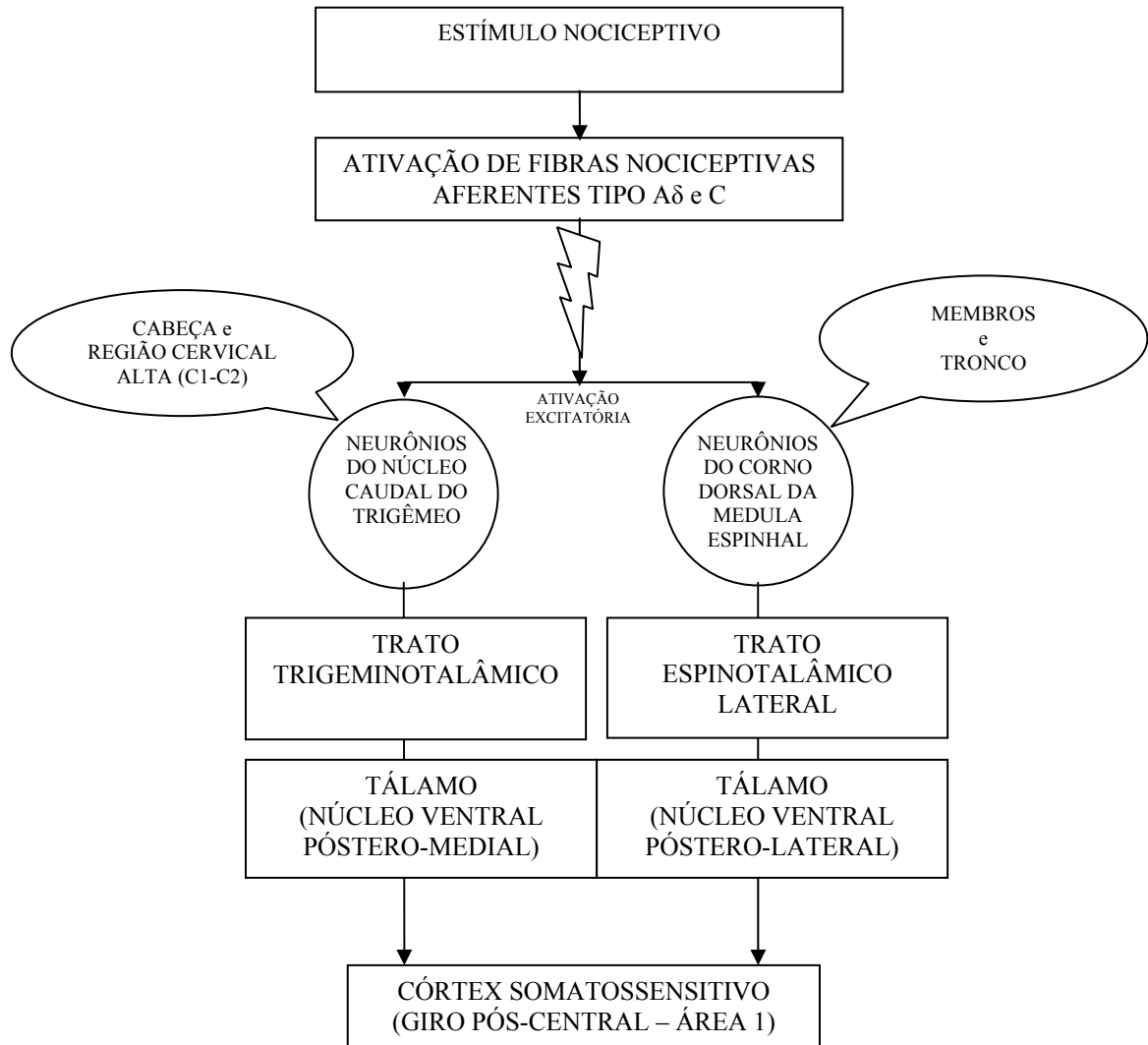


Figura 1. Principais vias ascendentes nociceptivas de cabeça, região cervical alta (C1, C2), tronco e membros até córtex somestésico (Pacák & Palkovits, 2001; Messlinger, 2006).

O trato espinotalâmico medial (ou via paleoespinotalâmica) é mais antigo na escala de evolução. Ao contrário do trato lateral, tem várias estações sinápticas. A partir da medula espinhal, projeta-se para o tálamo medial e, daí, difusamente para o córtex cerebral de ambos os hemisférios cerebrais. Perde-se, assim, a somatotopia dos estímulos percebidos. Projeta-se também para a substância cinzenta periaquedutal, o que pode representar importante ligação entre vias ascendentes e descendentes da dor. Fibras colaterais do trato medial alcançam o sistema reticular ativador e hipotálamo, sendo responsáveis pela resposta de alerta observada

em associação à presença de dor. Sua projeção para estruturas do chamado sistema límbico explica o aparecimento das respostas emocionais desagradáveis (Bear *et al.*, 1996; Chudler e Bonica, 2001; Morgan e Mikhail, 1996; Terman e Bonica, 2001). Devido às múltiplas estações sinápticas, a via paleoespinal é a que mais se presta à influência moduladora de outros sistemas centrais (Bear *et al.*, 1996; Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

2. MODULAÇÃO DA DOR

A transmissão de estímulos nocivos desde a periferia até os centros cerebrais não é um processo linear. Circuitos em diferentes níveis têm a capacidade de alterar marcadamente a passagem dos impulsos e, portanto, a resposta à estimulação nociva. O balanço da atividade entre circuitos excitatórios e inibitórios determinará quais serão as informações que chegarão ao cérebro. A modulação da dor pode ocorrer periféricamente, em medula espinhal e estruturas supra-espinhais. Esta modulação pode ser inibitória ou facilitatória (Figura 2)(Chudler e Bonica, 2001; Millan, 2002; Morgan e Mikhail, 1996; Terman e Bonica, 2001).

A modulação periférica se expressa por meio do fenômeno de sensibilização. Após estimulação repetida, os nociceptores podem apresentar resposta aumentada a estímulos nocivos ou adquirir responsividade maior a quaisquer estímulos, incluindo os não-nocivos.

A diminuição do limiar de dor, chamada de hiperalgisia, pode ser gerada por sensibilização periférica, com ativação de nociceptores (Basbaum e Jessell, 2000; Levine *et al.*, 1986, 1984, 1993; Markenson, 1996) ou de segundos mensageiros (Taiwo e Levine, 1989, 1991). Mediadores liberados pelo tecido lesado, como prostaglandina E₂, prostaciclina, adenosina, bradicinina, potássio e serotonina (5-HT), podem atuar diretamente no nociceptor, ativando-o e produzindo hiperalgisia primária (Basbaum e Jessell, 2000; Cesare e McNaughton, 1997).

O nociceptor produz substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina). A substância P liberada age em mastócitos, liberando histamina. Esta, por sua vez,

excita diretamente o nociceptor e provoca extravasamento de CGRP para o plasma. Há vasodilatação, edema e liberação adicional de bradicinina, sensibilizando ainda mais o nociceptor. Isto caracteriza a hiperalgesia secundária (Basbaum e Jessell, 2000; Cesare e McNaughton, 1997).

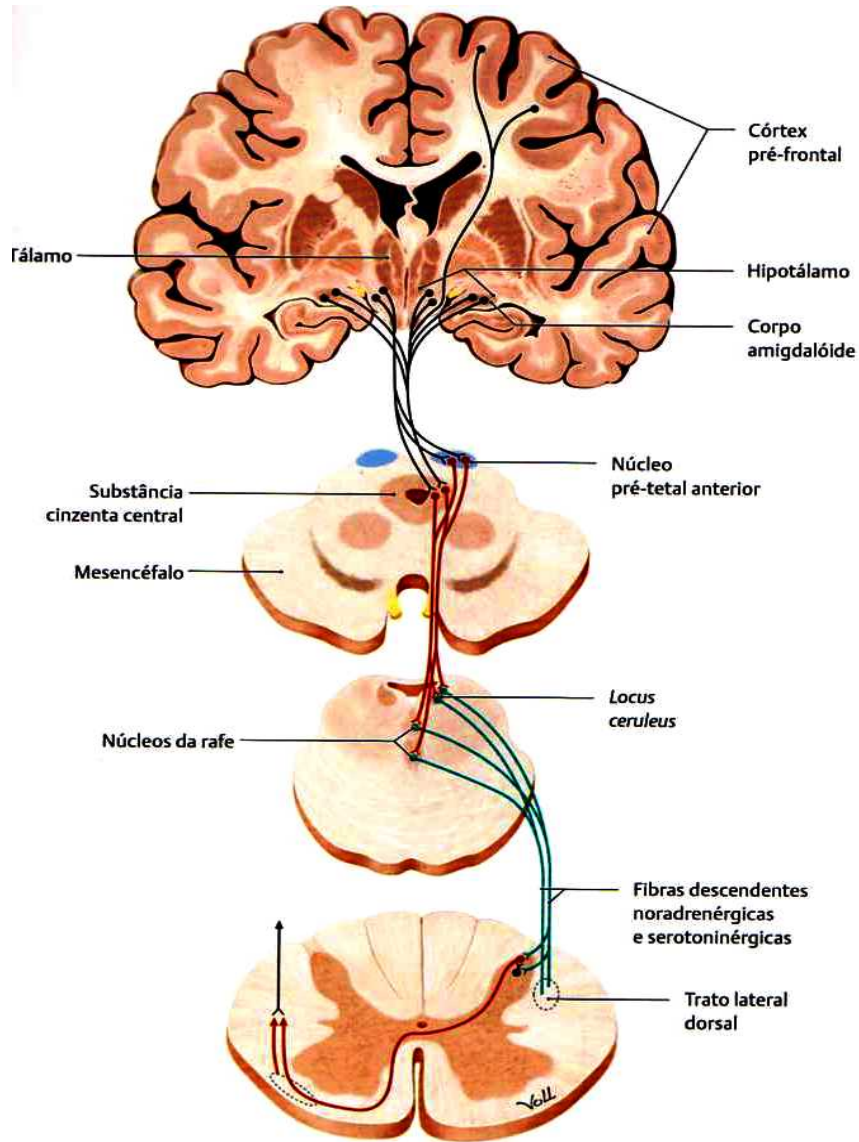


Figura 2. Vias do sistema central descendente de modulação da dor. O ponto central das sinapses é a substância cinzenta periaquedutal. É ativada por aferências hipotalâmicas, córtex frontal e sistema límbico. Também recebe aferências medulares. Neurônios glutamatérgicos excitatórios da substância cinzenta (vermelhos) fazem conexão com os neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe e noradrenérgicos do *locus coeruleus* (ambos em azul). Seus axônios seque pelo trato dorsolateral e terminam direta ou indiretamente nos neurônios de projeção que conduzem a dor, bloqueando a transmissão do impulso nociceptivo. (Adaptado de Schünke *et al.*, 2007)

Após estimulação prolongada, a hiperalgesia pode persistir, mesmo quando cessam a resposta inflamatória e a dor. Neste caso, diante de um estímulo, mesmo leve, se restabelece o estado hiperalgésico anterior, fenômeno denominado de “memória periférica da dor”. Estados hiperalgésicos também podem ser causados por sensibilização central, fenômeno em que os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal têm sua sensibilidade aumentada à estimulação sensorial (Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

No que se referem à modulação central, diversos mecanismos contribuem para o fenômeno de sensibilização em medula espinhal, sendo, portanto, facilitadores da dor. Estudos têm demonstrado que dano tecidual pode causar expansão dos campos receptivos e diminuição no limiar de excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula, fazendo com que pequenos estímulos passem a desencadear respostas exageradas (alodinia), dor com estímulos subliminares (hiperalgesia) ou até mesmo dor espontânea (Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001). Tal mecanismo contribuiria para dores crônicas, como a do membro fantasma, em que, mesmo após amputação, o paciente se queixa de dor com localização e intensidade similares às apresentadas antes da cirurgia (Chudler e Bonica, 2001; Marbach, 1996; Terman e Bonica, 2001). Os mediadores neuroquímicos envolvidos com o fenômeno de sensibilização central incluem substância P, VIP, colecistocinina, angiotensina, galanina, glutamato e aspartato.

A modulação central inibitória da dor pode se ocorrer por meio de mecanismos existentes no próprio segmento medular que recebe os impulsos ou da atividade de vias descendentes (com origem supra-espinhal) (figura 2). O sistema modulador supra-espinhal provavelmente mais conhecido tem origem na substância cinzenta periaquedutal (região ventro-lateral), onde mecanismos inibitórios encefalinérgicos e adrenérgicos contribuem para a modulação central da dor. Estimulação elétrica e administração local de morfina naquela estrutura produzem marcada analgesia, tanto em animais quanto em seres humanos (Chudler

e Bonica, 2001; Pleuvry e Lauretti, 1996; Terman e Bonica, 2001). Da substância cinzenta periaquedutal partem fibras para o bulbo, especificamente para o núcleo magno da rafe e a formação reticular bulbar, e daí originam-se fibras descendentes que percorrem o funículo dorsolateral da medula, terminando na lâmina II do corno dorsal da medula (Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001). As vias inibitórias adrenérgicas partem primariamente de substância cinzenta periaquedutal e formação reticular. Vias serotoninérgicas partem do núcleo magno da rafe e dirigem-se para o corno dorsal através do funículo dorsolateral. O sistema opióide endógeno tem origem primariamente em formação reticular e núcleo magno da rafe, com liberação de encefalinas, que atuam pré-sinápticamente, hiperpolarizando neurônios aferentes primários na medula espinhal e inibindo a liberação de substância P. Também parece haver inibição pós-sináptica por opióides (figura 2)(Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

A inibição segmentar de estímulos nociceptivos teve como base a teoria do portão de Melzack e Wall (1965). Estes autores propuseram a existência de um sistema de controle em medula espinhal que modularia os impulsos vindos da pele, antes que houvesse percepção e resposta à dor. Nesse contexto, os neurônios encefalinérgicos encontrados na lâmina II da medula espinhal (interneurônios) seriam o equivalente neuro-humoral do conceito neurofisiológico da comporta espinhal da dor proposto por aqueles autores (Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

Neurônios encefalinérgicos exercem papel fisiológico inibitório, modulando a informação em nível de primeira sinapse central. A inibição da atividade de neurônios medulares de segunda ordem e do trato espinotalâmico, por meio da ativação de fibras aferentes de maior diâmetro relacionadas à sensação epicrítica, segue o modelo da teoria do portão e explica como a estimulação mecânica pode aliviar a dor. Friccionar, por exemplo, o cotovelo imediatamente após um traumatismo leve reduz a dor. De forma similar, a estimulação nociva em áreas não contíguas do organismo inibe neurônios de segunda ordem

em vários níveis da medula, de modo que a presença de dor em uma região do organismo tende a inibir o seu aparecimento em outras regiões (Chudler e Bonica, 2001; Terman e Bonica, 2001).

Os aminoácidos glicina e ácido gama-aminobutírico (GABA), que atuam como neurotransmissores inibitórios, parecem exercer importante papel na inibição segmentar da dor. O GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Em nível de medula espinhal, sua atuação se faz por meio de receptores GABA_A e GABA_B. O canal iônico associado ao receptor GABA_A é seletivo para íon cloreto. Quando GABA se liga ao seu receptor, o influxo de Cl⁻ faz com que a célula se hiperpolarize (Waxham, 1999). Picrotoxina, um potente antagonista GABA_A, parece se ligar dentro do canal, impedindo o fluxo de Cl⁻ para dentro da célula (Waxham, 1999). Quanto aos receptores metabotrópicos GABA_B, sua ativação aumenta a condutância da membrana celular ao potássio, tornando a despolarização mais difícil. A ativação de receptores de glicina, por sua vez, aumenta a condutância da membrana ao cloro. A ação da glicina é mais complexa que a do GABA por também ter efeito facilitatório sobre receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato) (Bormann, 1988).

Outro importante sistema de neurotransmissores envolvido na modulação inibitória da dor é o sistema opióide. Os opióides endógenos, que compreendem endorfinas, dinorfinas e encefalinas, se ligam com grande afinidade a receptores específicos. Estes podem ser de três tipos: mu, delta e kappa. Em neurônios da medula espinhal, seu efeito predominante é diminuir o disparo neuronal. A ligação em receptores pré-sinápticos faz com que a liberação de neurotransmissores envolvidos nas vias da dor seja reduzida. A estimulação de receptores pós-sinápticos inibe a neurotransmissão por produzir hiperpolarização e reduzir, assim, a atividade evocada. Um terceiro mecanismo envolve a inibição de determinado neurônio, que, por sua vez, inibe um neurônio inibitório. Uma vez que a inibição do neurônio inibitório não está

ocorrendo, este pode ser ativado e exercer seu papel na circuitaria neuronal (Chudler e Bonica, 2001; Gutstein e Akil, 2001; Marsh *et al.*, 1997; Terman e Bonica, 2001).

3. DORES CEFÁLICAS

As dores cefálicas (cefaléias ou dores de cabeça) constituem entidade clínica conhecida há muito séculos. Já eram referidas nas culturas mais antigas. Egípcios, conforme os manuscritos médicos do *Papiro de Ebers* (encontrado em Tebas e datado de 1550 a.C.), Hipócrates, Galeno e manuscritos gregos já faziam referência a essa queixa extremamente comum na população (Waeber e Moskowitz, 2003).

O termo cefaléia engloba dores de diferentes tipos, a maioria de caráter benigno. O sistema de classificação e definição proposto por *International Headache Society* (IHS), em sua segunda edição (Headache Classification Subcommittee of the IHS, 2004), embora não seja perfeito, é atualmente o mais aceito, pelo menos para propósitos de pesquisa (Welch, 2001). Dentre as dores de cabeça, são mais freqüentes as do tipo tensional, mas enxaquecas são mais dolorosas e mais vezes condicionam a procura por atendimento médico (Ferreira e Perla, 2007).

A importância do estudo das cefaléias relaciona-se ao considerável impacto que traz nos âmbitos pessoal, sociocultural e econômico (Waeber e Moskowitz, 2003).

Na tabela 1, são apresentados tipos e subtipos de cefaléias primárias (Headache Classification Subcommittee of the IHS, 2004).

Tabela 1. Classificação de cefaléias primárias, segundo critérios de *International Headache Society* (Headache Classification Subcommittee of the IHS, 2004).

-
1. Migrânea (enxaqueca)
 - 1.1. Migrânea sem aura (comum ou hemicrania simples)
 - 1.2. Migrânea com aura (clássica)
 - 1.2.1. Aura típica com cefaléia migranosa
 - 1.2.2. Aura típica com cefaléia não-migranosa
 - 1.2.3. Aura típica sem cefaléia
 - 1.2.4. Migrânea hemiplégica familiar
 - 1.2.5. Migrânea hemiplégica esporádica
 - 1.2.6. Migrânea do tipo basilar
 - 1.3. Síndromes periódicas da infância que são precursoras freqüentes de migrânea
 - 1.3.1. Vômito cíclico
 - 1.3.2. Migrânea abdominal
 - 1.3.3. Vertigem paroxística benigna da infância
 - 1.4. Migrânea retiniana
 - 1.5. Complicações da migrânea
 - 1.5.1. Migrânea crônica
 - 1.5.2. Estado migranosa (enxaquecoso)
 - 1.5.3. Aura persistente sem infarto
 - 1.5.4. Infarto migranoso (enxaquecoso)
 - 1.5.5. Crises desencadeadas por migrânea
 - 1.6. Provável migrânea
 - 1.6.1. Provável migrânea sem aura
 - 1.6.2. Provável migrânea com aura
 - 1.6.3. Provável migrânea crônica
 2. Cefaléia tipo tensional
 3. Cefaléia em salvas e outras trigeminalgias autonômicas
 4. Outras cefaléias primárias
-

Dentre as dores de cabeça de etiopatogenia vascular, a migrânea (ou enxaqueca) não é apenas um dos tipos mais comuns de cefaléia, mas, também, uma síndrome neurológica. Caracteriza-se pela presença de dores de cabeça recorrentes, unilaterais ou bilaterais, geralmente de caráter pulsátil, com intensidade moderada a intensa, precedidas ou não por sinais neurológicos focais denominados de aura. Usualmente acompanham-se de náuseas, vômitos, fonofobia e fotofobia. As crises podem perdurar por 4 a 72 horas. Alguns sintomas premonitórios podem aparecer horas ou dias antes da cefaléia, incluindo anorexia, hiperatividade, depressão, irritabilidade, bocejos repetidos, dificuldades de memória, desejos por alimentos específicos e sonolência (Schoen, 1997; Silberstein *et al*, 1997, 2001).

Quando ocorrem crises em 15 ou mais dias do mês, durante mais de 3 meses, na ausência de abuso de medicação, a migrânea é denominada de crônica. Essa situação pode causar incapacitação pela dor e afetar a execução de atividades diárias e a qualidade de vida (Headache Classification Committee of the International Headache Society, 2004).

4. PROCESSO INFLAMATÓRIO VASCULAR NEUROGÊNICO

Há mais de um século, foi observado que a ativação de neurônios do gânglio da raiz dorsal resulta em sinais inflamatórios e vasodilatação, sugerindo que essas células não apenas conduzem informações aferentes à medula, como também podem apresentar função eferente: a fibra sensitiva conduz nos dois sentidos (Bayliss, 1901). Hoje, sabe-se que a ativação sensitiva axonal reflexa leva à liberação de neurotransmissores (*nonadrenergic, noncholinergic neurotransmitters* – NANC) na periferia, contribuindo para aquelas manifestações inflamatórias e vasculares (Lundberg, 1996).

Neurônios do corno da raiz dorsal da medula podem apresentar atividade ortodrômica e antidrômica. Não só conduzem estímulos aferentes (atividade ortodrômica), como também são capazes de apresentar funções eferentes (atividade antidrômica). A ativação de terminais periféricos de nervos sensoriais, por meio de despolarização local, é capaz de liberar

substâncias bioativas, por meio de reflexo axonal ou reflexo da raiz dorsal. Essas substâncias, por sua vez, atuam na periferia, em células-alvo como mastócitos, células imunes e células vasculares de músculos lisos, produzindo inflamação. O processo é caracterizado por hiperemia local (secundária à vasodilatação local), edema (secundário ao extravasamento plasmático) e hipersensibilidade (secundária a alterações na excitabilidade de neurônios sensoriais). Esse fenômeno é denominado de “inflamação neurogênica”, que resulta da liberação de substâncias de terminais nervosos sensoriais primários (Bayliss, 1901; Durnett e Vasko, 2002).

5. FISIOPATOGENIA DAS DORES CEFÁLICAS

O mesmo fenômeno de ativação antidrômico observado em gânglio da raiz dorsal da medula espinhal pode ser evidenciado em meninges e seus vasos. A relação funcional das fibras trigeminais com os vasos deu origem à expressão “sistema trigeminovascular” (Moskowitz, 1984). A fisiopatogenia das dores cefálicas de etiologia vascular, como enxaqueca e cefaléia em salvas, está associada à ativação de fibras aferentes primárias que inervam vasos sanguíneos cefálicos ou meníngeos do cérebro, relacionados ao sistema trigeminovascular (STV) (Moskowitz, 1984) (Figuras 3, 4).

Existem três tipos de fibras nervosas na parede dos vasos cranianos, sobretudo entre as camadas adventícia e média e na própria camada adventícia. Estas fibras apresentam, na porção pré-sináptica, compostos vasoativos, que são liberados pelo estímulo nervoso. São fibras simpáticas (oriundas principalmente do gânglio cervical superior), parassimpáticas (projeções nervosas aferentes do gânglio esfenopalatino) e sensoriais de tipos A δ e C (primeiro neurônio do sistema trigeminovascular) (Edvinsson e Uddman, 2005; Pietrobon e Striessing, 2003)(Figura 4). Aqueles compostos interagem com substâncias vasorreguladoras presentes na corrente sanguínea e/ou no vaso, contribuindo para a regulação do tono vascular, além de serem também responsáveis pelo desencadeamento da chamada reação inflamatória

neurogênica, principalmente em vasos durais, que se caracteriza pelo extravasamento de proteínas, mastócitos e plaquetas (Edvinsson e Uddman, 2005; Uddman e Edvinsson, 1989).

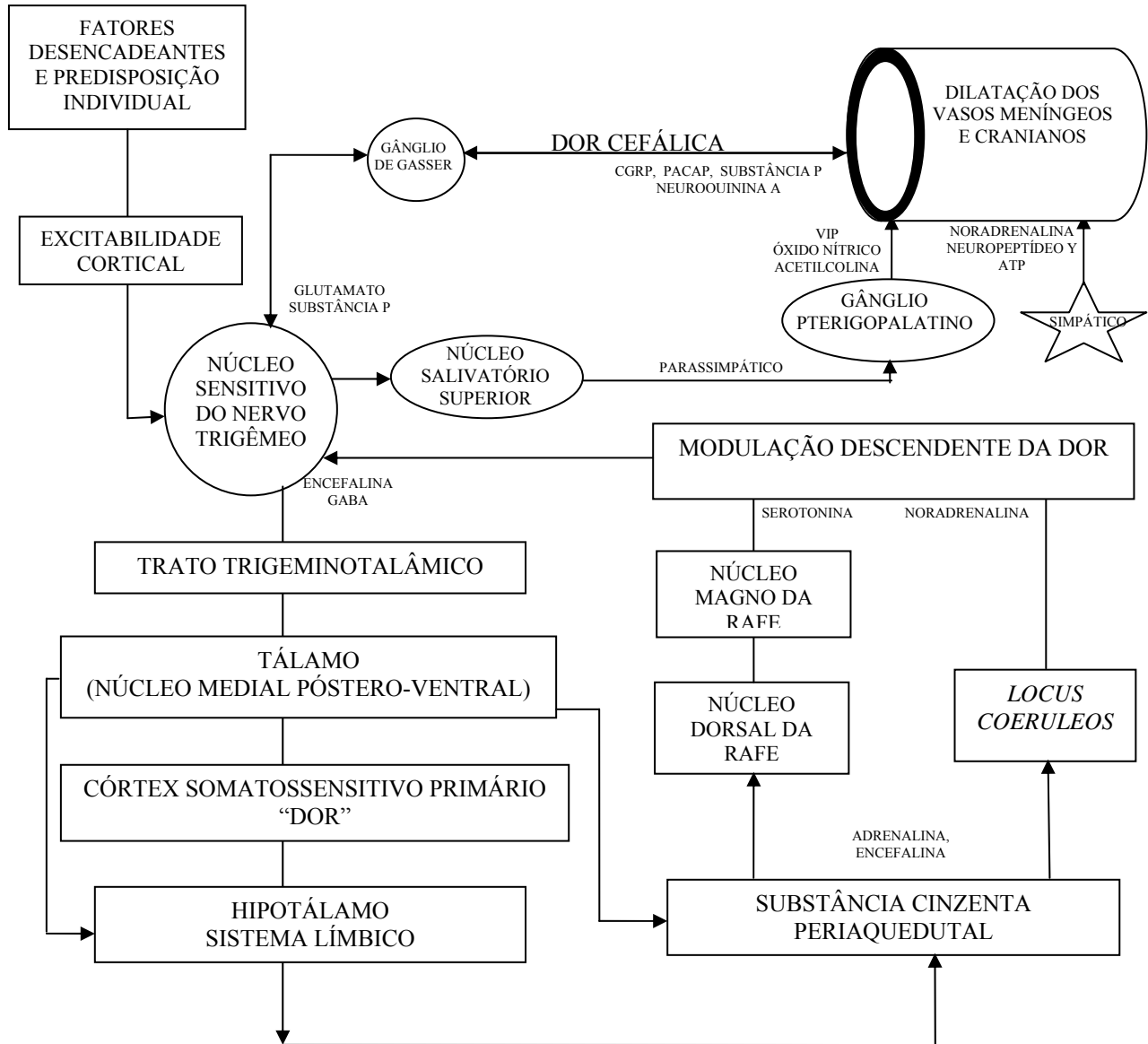


Figura 3. Relações entre vias aferentes e eferentes dos mecanismos desencadeadores e neuromoduladores de dores cefálicas (Moskowitz, 1984; Uddman, 1989; Vincent, 1998; Pietrobon, 2003; Edvinsson, 2005).

CGRP (peptídeo liberador do gene da calcitonina), GABA (ácido gama-aminobutírico), VIP (peptídeo intestinal vasoativo), PACAP (*pituitare adenylate cyclase activating peptide*).

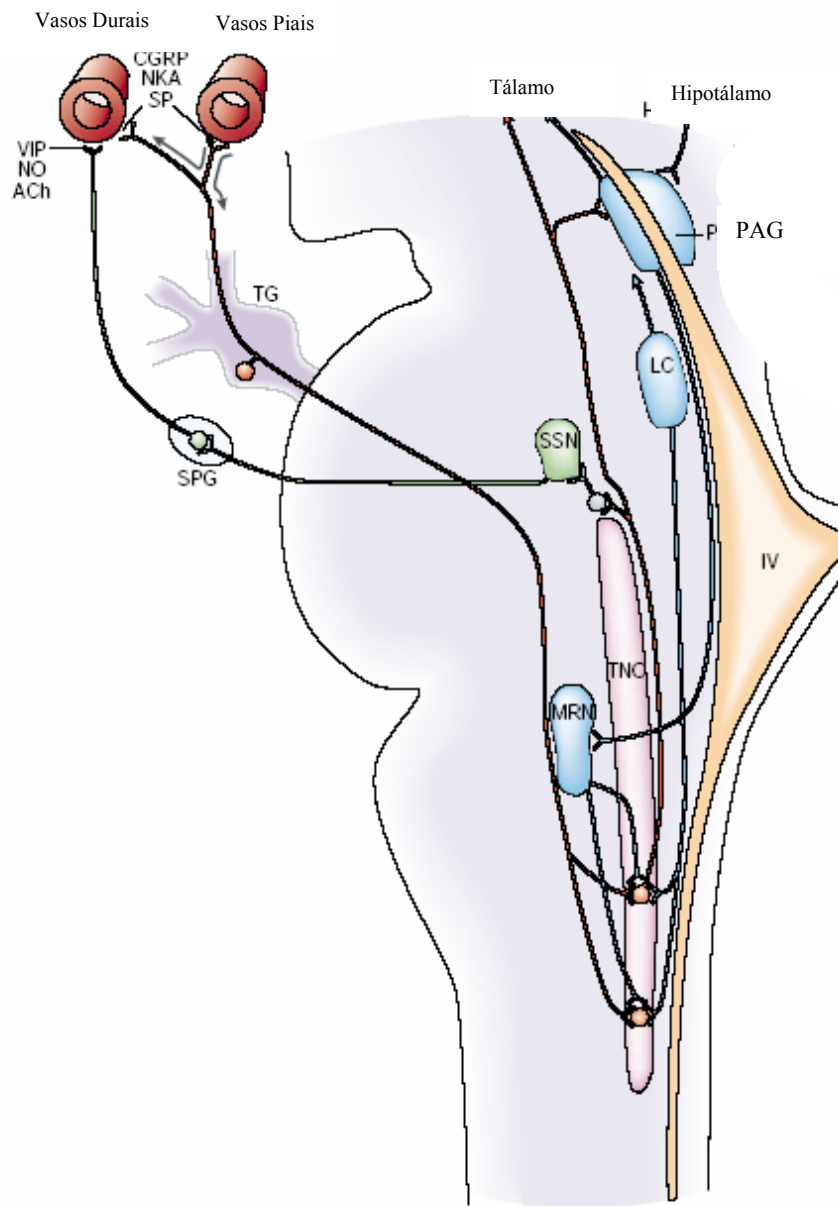


Figura 4- Vias neuronais envolvendo a ativação trigeminovascular e o processo da dor (IV, quarto ventrículo; ACh, acetilcolina; CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; LC, locus coeruleus; PAG, substância cinzenta periaquedutal; MRN, núcleo magno da rafe; NKA, neuroquinina A; NO, óxido nítrico; SP, substância P; SPG, gânglio esfenopalatino; SSN, núcleo salivatório superior; TG, gânglio trigeminal; TNC, núcleo caudal do trigêmeo; VIP, peptídeo vasoativo intestinal)(Adaptado de Pietrobo e Striessnig, 2003).

No que se refere à regulação do tono vascular pelo sistema nervoso vegetativo, as fibras simpáticas, originadas do gânglio cervical superior, contêm, além de noradrenalina (NA), o neuropeptídeo Y (NPY), que apresenta atividade vasoconstritora (Uddman e Edvinsson, 1989). As fibras parassimpáticas, originadas no gânglio esfenopalatino, contêm acetilcolina (Ach), um convencional vasodilatador dependente do endotélio, e outros compostos, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Estas fibras também são capazes de liberar óxido nítrico (NO) (Lundberg, 1996).

Fibras sensitivas também funcionam nesse caso como fibras eferentes do sistema nervoso vegetativo. Assim como outros neurônios sensoriais primários, os nervos trigeminais são iniciadores críticos e promotores de inflamação tecidual. Sua ativação libera de seus terminais aferentes substâncias vasoativas, como CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), substância P (SP) e neuroquinina A (NKA), que atuam como potentes vasodilatadores, por meio da via de NO. O evento final é o desencadeamento de uma reação inflamatória no tecido alvo, sendo, nesse caso, os vasos sangüíneos cerebrais (Figura 5) (Lizasoain e Leira, 2003; Moskowitz, 1984).

Fibras trigeminais não-mielínicas do tipo C, além da função ortodrômica, liberam distintos neurotransmissores na periferia por estimulação antidrômica: substância P (SP), CGRP, dinorfina B, *pituitare adenylate cyclase activating peptide* (PACAP), além de outras taquiquininas, como neuroquinina A (NKA) (Vincent, 1998; Edvinsson e Uddman, 2005).

Dependendo do sítio de ação, a substância P pode provocar vasodilatação menos intensa e de mais curta duração, podendo atuar como neuromodulador do tono vascular. O CGRP, potente vasodilatador presente em grande quantidade na divisão oftálmica do nervo trigêmeo, também pode ter efeito neuromodulador. Embora não determine extravasamento de proteínas, ele pode aumentá-lo por meio da facilitação da ação de SP (Vincent *et al.*, 1992; Le Greves *et al.*, 1985).

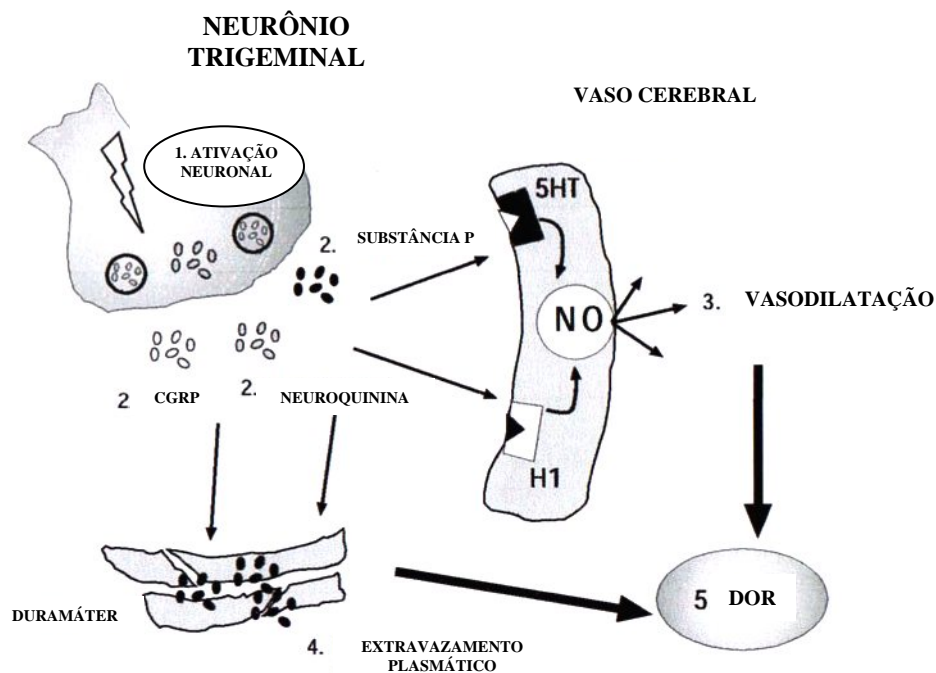


Figura 5. Inflamação Neurogênica. A ativação neuronal resulta em liberação de substâncias vasoativas, que levam a vasodilatação, extravasamento plasmático e sensibilização de terminais nervosos nociceptivos, resultando em dor (Adaptado de Lizasoain e Leira, 2003; Moskowitz, 1984).

Experimentos de Furchgott e Zawadzki (1980) demonstraram que a vasodilatação induzida por acetilcolina só ocorria com a influência de fatores endoteliais, especialmente por meio da liberação de NO, sintetizado a partir de L-arginina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* ou NOS, em inglês). Além de vasodilatador, o óxido nítrico apresenta atividade neurotransmissora, havendo evidências da presença de NOS em fibras nervosas, inclusive perivasculares (Furchgott e Zawadzki, 1980; Moncada *et al.*, 1991; Goadsby *et al.*, 1996).

Estudos de Olesen e colaboradores (1995) demonstraram que os principais neuropeptídeos relacionados à inflamação neurogênica não causam dor *per se*. Contudo, cogitaram a hipótese do NO ser molécula algógena na enxaqueca. Assim, a ativação da via NO

e a conseqüente estimulação de GMPc podem causar crises de cefaléias. Paralelamente, fármacos que atuam inibindo as etapas da via NO-GMPc ou antagonizando os efeitos de metabólitos gerados por esta via podem agir como anti-enxaquecosos (Silberstein *et al*, 1997; Schoen, 1997; Zuckerman, 2000).

Acredita-se que sistemas endógenos de analgesia também estariam alterados na presença de enxaqueca, pela depleção de monoaminas e opióides endógenos. Possivelmente, tais alterações seriam facilitadas por predisposição hereditária (Silberstein *et al*, 1997; Schoen, 1997; Zuckerman, 2000).

Além disso, observam-se inúmeras variações bioquímicas, tanto na crise, quanto no período intercrítico, em indivíduos que apresentam enxaqueca, como, por exemplo, as que envolvem serotonina, glutamato e magnésio (Zuckerman, 2000). Receptores serotoninérgicos (5HT_{1B/1D}) parecem estar envolvidos na regulação desse processo, pois o mesmo é inibido pelo uso de agonistas, como o sumatriptano (clássico fármaco anti-enxaquecoso) (Lizasoain e Leira, 2003).

O extravasamento plasmático em dura-máter pode estar envolvido na gênese da dor relacionada às dores cefálicas do tipo enxaqueca (Lizasoain e Leira, 2003). Esse mecanismo é similar ao descrito no reflexo axonal (Bayliss, 1901).

Tais achados suportam a teoria de que as cefaléias vasculares seriam resultantes de uma alteração neurobiológica que refletiria distúrbios na interação entre o nervo trigêmeo e o órgão alvo (vasos sangüíneos cerebrais) (Lizasoain e Leira, 2003; Moskowitz, 1984).

Sendo assim, o desenvolvimento do quadro de cefaléia poderia ser resumido na seqüência de eventos a seguir, que ocorrem posteriormente à estimulação do sistema trigeminovascular (Figura 1). Ocorreria síntese e transporte de mediadores nociceptivos (como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina), por meio do sistema circulatório, até receptores específicos, localizados em fibras sensoriais perivasculares. A ativação destas fibras desencadearia despolarização e liberação de substâncias neuroativas em grandes vasos

sangüíneos durais. Paralelamente, estímulos nociceptivos também seriam transmitidos ao núcleo caudal do trigêmeo (NCT) e, dele, para estruturas nervosas superiores (Moskowitz, 1984; Uddman, 1989; Vincent, 1998; Pietrobon, 2003; Edvinsson, 2005).

6. DOR CEFÁLICA E ÓXIDO NÍTRICO

Óxido nítrico (NO) é gás endógeno, com alta taxa de difusão. É sintetizado a partir do nitrogênio do terminal guanidino da molécula de L-arginina, por meio de sua conversão em citrulina, por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Thomsen e Olesen, 1997).

A enzima óxido nítrico sintase é descrita em várias estruturas: endotélio vascular, neurônios de Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico, fibras musculares lisas de vasos sangüíneos, fibras musculares miocárdicas, macrófagos, neutrófilos e células gliais, como as micróglias (Thomsen e Olesen, 1997). Ela existe em três isoformas: duas (neuronal e endotelial) são denominadas “constitutivas” e uma, “induzida”.

As formas “constitutivas” de NOS são dependentes de Ca^{+2} /Calmodulina e liberam NO de endotélio (eNOS) e neurônios (nNOS). Essa liberação é potencializada por estimulação de vários receptores específicos ligados à membrana celular, como aqueles ligados a glutamato, bradicinina, serotonina, acetilcolina, histamina, substância P e CGRP (Figura 6) (Thomsen e Olesen, 1997).

O óxido nítrico endotelial é um dos maiores responsáveis pela dilatação vascular. A forma neuronal pode atuar como efetor em neurônios capazes de induzir vasodilatação, de modo que o NO produzido age como neurotransmissor ou como parte de um sistema de segundo mensageiro (Kerin *et al.*, 2001; Olesen e Thonsen, 2001; Myers, 1999).

A forma “induzida” (iNOS) funciona independentemente de cálcio. É capaz de gerar NO, por período prolongado de tempo e em grandes quantidades, em resposta a endotoxinas e citocinas. Muitas ações fisiológicas são mediadas por meio da ativação dessa via. Além de estar envolvida na regulação cerebrovascular (vasodilatação neurogênica dependente do

endotélio), também participa da neurotransmissão nociceptiva (Thomsen e Olesen, 1997; Myers, 1999; Kerin *et al.*, 2001; Olesen e Thomsen, 2001).

A vasodilatação dependente do endotélio é importante para a regulação das atividades cerebrovasculares e para a vasodilatação neurogênica mediada por fibras perivasculares. Estas últimas fibras são reguladas pelo NO, por meio da ativação de neurônios não-adrenérgicos e não-colinérgicos (*nonadrenergic, noncholinergic neurotransmitters – NANC*) (Lundberg, 1996; Thomsen e Olesen, 1997).

A neurotransmissão envolvendo óxido nítrico no SNC é importante para percepção da dor (hiperalgesia), podendo também contribuir para a transmissão sensorial de nervos periféricos (Thomsen e Olesen, 1997). NO pode estimular a liberação de CGRP de terminais nervosos perivasculares, atuando na reação inflamatória neurogênica (Wei *et al.*, 1994).

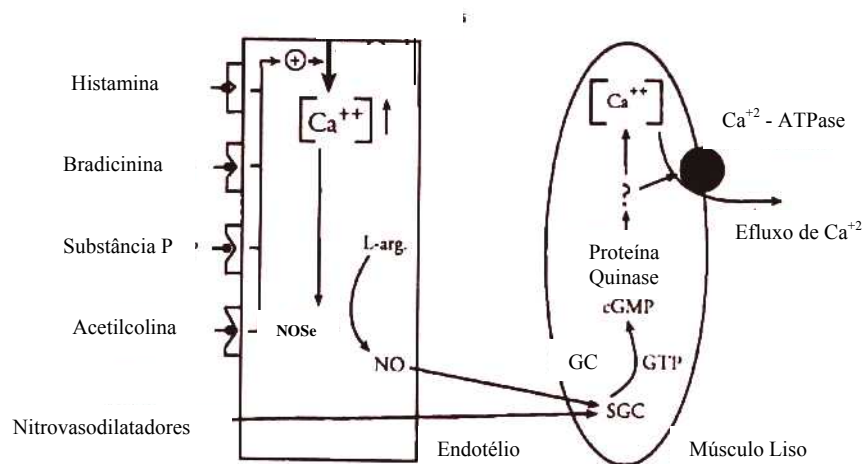


Figura 6. Síntese de NO endotelial. NOS endotelial é estimulada pelo cálcio intracelular a produzir NO, que se difunde para músculo liso e ativa a guanilato ciclase (GC). Esta enzima catalisa a produção de GMPc e a ativação de proteínas quinases . O resultado é a estimulação da bomba de cálcio, que transportará este íon para fora da fibra muscular, gerando relaxamento muscular e vasodilatação. Compostos nitrosos agem como doadores de NO e atuam por essa mesma via para gerar vasodilatação (Thomsen e Olesen, 1997).

NO não atua diretamente em músculo liso vascular, mas, sim, por meio de um segundo mensageiro purínico, a guanosina monofosfatada cíclica ou GMPc. NO ativa a guanilato ciclase solúvel, promovendo a transformação de guanosina trifosfatada (GTP) em GMPc e a redução nos níveis de Ca^{+2} intracelular. Esse segundo mensageiro gera alterações bioquímicas que culminarão na abertura de canais iônicos (de cálcio e potássio) dependentes de adenosina trifosfato (ATP). Assim, ocorre relaxamento da musculatura lisa vascular e conseqüente vasodilatação (Figura 6) (Thomsen e Olesen, 1997; Myers, 1999).

Diferentemente da maioria dos neurotransmissores, NO não é desativado por recaptação, nem por degradação enzimática. Possui meia-vida de cerca de 5 a 30 segundos. Depois de sintetizado, é prontamente convertido em dióxido de nitrogênio (NO_2), que, por sua vez, é rapidamente convertido em suas formas mais estáveis: nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), por meio de vias oxidativas mediadas por oxigênio ou superóxidos. Vários compostos nitrosos orgânicos (nitroglicerina) e inorgânicos (nitrato/nitrito – amil-nitrito) podem originar NO por catalisação enzimática (Myers, 1999). A biotransformação dos nitratos orgânicos é resultado da hidrólise redutiva catalisada pela enzima hepática glutatona redutase. Duas moléculas desta enzima, na forma reduzida, reagem com uma de nitroglicerina, oxidando-se e formando 1,3 ou 1,2-gliceril-dinitrato.

A ocorrência de cefaléia como reação adversa ao uso de nitratos foi primeiramente observada Ascânio Sobrero na metade do século XIX. Este pesquisador, ao sintetizar nitroglicerina, observou que tal composto era capaz de desencadear cefaléia quando administrado por via oral (Marsh e March, 2000). Os clássicos estudos de Wolff (1929) também demonstraram esse efeito adverso. Com base nesses dados, Olesen e colaboradores (1993) e Iversen e colaboradores (1993) propuseram que a patofisiologia da enxaqueca poderia estar relacionada a uma hipersensibilidade à ação de NO. Eles demonstraram que a cefaléia induzida por nitroglicerina (NTG) é mais grave em pacientes enxaquecosos, sendo que a mesma melhora, de maneira consistente, após a administração de inibidores de NOS. Durante

episódios de cefaléia induzida por NTG, existe aumento na concentração plasmática de CGRP, efeito que também é observado em várias cefaléias primárias, como enxaqueca, cefaléia em salvas e cefaléia hemicrânia paroxística (Myers, 1999). Além disso, estudo experimental em ratos demonstrou maior expressão de *c-fos* no núcleo trigeminal caudal após a administração sistêmica de nitroglicerina, em comparação com o controle (Tassorelli e Joseph, 1995).

7. TRATAMENTO DAS DORES CEFÁLICAS

O tratamento de dores crônicas é complexo, obtendo-se mais sucesso com ações multidisciplinares (Ferreira e Perla, 2007). A abordagem é direcionada para reabilitação e manejo sintomático do quadro, mais do que para a cura (Hans e Hansen, 1999). Deve ser iniciada precocemente, já que estímulos nociceptivos prolongados e generalizados aumentam a excitabilidade em sistema nervoso central, e dores persistentes podem induzir danos orgânicos e emocionais (Mailis e Papagapiou, 1993). Seu manejo farmacológico centra-se na interrupção de mecanismos que a induzem ou exacerbam (Ferreira e Perla, 2007).

As cefaléias primárias (enxaquecas e cefaléias trigeminálgicas autonômicas), junto com as neuralgias (de trigêmeo e pós-herpética), são possivelmente os processos álgicos orofaciais com maior dificuldade de manejo. Este fato deve-se à complexidade do fenômeno doloroso, bem como à existência de conhecimentos inadequados com relação a diagnóstico e tratamento (Temenbaum *et al.*, 2001).

O tratamento farmacológico da enxaqueca, assim como dos demais tipos de dores cefálicas, pode ser agudo, para as crises de dor (abortivo), ou preventivo (profilático). O tratamento agudo tem por objetivo abolir a progressão das crises de dor de cabeça, enquanto o preventivo visa reduzir a frequência e a gravidade das mesmas (Silberstein *et al.*, 2001).

No passado, o tratamento agudo da enxaqueca era feito com agentes antiinflamatórios ou derivados ergotamínicos. Os primeiros, na maioria das vezes, eram pouco eficazes, e os últimos apresentavam muitos efeitos adversos, principalmente devido à falta de

seletividade desses agonistas serotoninérgicos. Atualmente, com o advento dos triptanos - agonistas serotoninérgicos mais específicos, a terapêutica tornou-se mais eficaz e segura (Silberstein *et al.*, 2001; Silberstein, 2000; Ferreira e Perla, 2007).

Com o decorrer dos anos, o tratamento preventivo também se modernizou e se tornou mais efetivo. Vários fármacos podem ser utilizados na profilaxia da enxaqueca - antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, antagonistas dos canais de cálcio e antagonistas serotoninérgicos. O avanço dos estudos referentes à fisiopatogenia das dores de cabeça tem levado à busca de novos fármacos, vitaminas ou minerais que possam ser utilizados como agentes profiláticos, como é o caso de riboflavina e magnésio (Morey, 2000a, 2000b, 2000c; Schoen, 1997; Zuckerman, 2000; Silberstein *et al.*, 2001).

8. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DAS CEFALÉIAS

Com o desenvolvimento neurofarmacológico das últimas décadas, surgiu a necessidade da criação de modelos animais que contribuam de maneira significativa para o melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatogênicos das cefaléias, particularmente da enxaqueca. Na maioria das vezes, esses modelos constituem valiosas ferramentas para a exploração de eventos que compõem o complexo mecanismo neuroquímico e fisiológico desse processo neurológico, bem como para o estudo de sua correlação com achados clínicos (Tabela 2) (Goadsby e Kaube, 2000).

Geralmente, os modelos experimentais são construídos com base na avaliação da resposta nociceptiva, atendo-se ao estudo do tratamento agudo das crises e de estratégias de manejo preventivo. Na maioria das vezes, eles negligenciam o mecanismo fisiopatológico e as possíveis alterações comportamentais envolvidas no processo.

Tabela 2. Achados clínicos observados em crises de enxaqueca e suas possíveis correlações biológicas (Adaptado de Goadsby e Kaube, 2000).

<i>Achados clínicos</i>	<i>Possíveis explicações biológicas (mecanismos e/ou localizações)</i>
Distribuição unilateral da dor	Envolvimento trigeminal Envolvimento nervoso Envolvimento nuclear
Característica pulsátil da dor	Inervação vascular
Agravamento pelo movimento	Inflamação neurogênica
Náuseas / Vômitos	Ativação do Núcleo do Trato Solitário
Fotofobia / Fonofobia	Envolvimento de <i>Locus coeruleus</i> Hiper-excitabilidade cortical
Natureza episódica	Canalopatia (?)
Comprometimento global	Sistema de controle sensorial aminérgico Ativação de <i>Locus coeruleus</i> Envolvimento de Núcleo Dorsal da Rafe Envolvimento de Substância Cinzenta Periaquedutal

Os modelos animais para o estudo das cefaléias podem ser divididos em dois grupos: simples e complexos. Os primeiros são mais bem aplicados em pesquisas farmacológicas, destacando-se os modelos de vasos isolados, de receptores clonados e de cultivo celular. Os modelos complexos são empregados para a avaliação dos mecanismos envolvidos na teoria da inflamação neurogênica vascular. Podem ser utilizados para a investigação dos componentes fisiológicos da enxaqueca, como sistemas nociceptivos, mecanismos inflamatórios e reações vasculares (Lizasoain e Leira, 2003).

Não há modelo ideal que mimetize uma crise de enxaqueca. Os existentes apresentam vantagens e desvantagens. Modelos complexos, assumindo a hipótese de que há integração neurogênica e vascular no processo fisiopatogênico das cefaléias, seriam aqueles que melhor refletiriam a realidade (Lizasoain e Leira, 2003). Nesse grupo, destacam-se os modelos a seguir (Tabela 3).

8.1 Modelos vasculares *in vivo* para estudos farmacológicos

Os modelos em animais foram desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a vasodilatação extracraniana relacionada a cefaléias vasculares, como a enxaqueca. Embora muitos deles sejam essencialmente vasculares, também exploram componentes neurogênicos, como aqueles nos quais é administrada, por via intravenosa, capsaicina e investigada a liberação subsequente de CGRP (Kapoor *et al.*, 2003; Bergerot *et al.*, 2006).

Baseiam-se na teoria de que a vasodilatação extra-cerebral exerce papel importante na fisiopatologia da enxaqueca. Fundamentam-se no fato de que fármacos ergóticos e sumatriptano, apesar de efetivos para o tratamento das crises de cefaléia, não ultrapassam a barreira hemato-encefálica, apresentando efeito vasoconstritor periférico (Lizasoain e Leira, 2003).

Existem dois modelos fundamentais. Um deles – o modelo de anastomose arteriovenosa – parte da hipótese de que a vasodilatação afeta fundamentalmente anastomoses arteriovenosas cranianas (AAV), que são comunicações pré-capilares entre artérias e veias (Heyck, 1969). A vasodilatação de AAV determinaria aumento de fluxo em veias, sem passar pelos capilares. Esse modelo foi muito importante para o avanço do conhecimento da fisiopatologia da enxaqueca, pois, nele, observou-se que a serotonina produz dilatação arteriolar e vasoconstrição de AAV. Também se mostrou relevante para o estudo de fármacos anti-enxaquecosos, principalmente aqueles com ação em receptores específicos. Nele, têm sido estudados fármacos capazes de contrair vasos cranianos dilatados, independentemente do mecanismo, como agentes ergóticos, triptanos e inibidores de NO (Lizasoain e Leira, 2003; Bergerot *et al.*, 2006).

Tabela 3. Modelos em animais para estudo de dores cefálicas (Bergerot *et al.*, 2006).

Tipo de Modelo	Função/Estrutura	Metodologia
Vascular		
(vasoconstrição ou vasodilatação)		
<i>In vitro</i>	Veias e artérias isoladas	Efeito de fármacos e modulação de estimulação elétrica
<i>In vivo</i>	Leito arterial carotídeo Anastomoses arteriovenosas Artérias piais	Avaliação de resistência e diâmetro vasculares
Neurovascular		
Inflamatório (extravasamento plasmático - EP)	Sistema Trigeminovascular	Indução ou inibição de EP por estimulação química ou elétrica de nervos e gânglio trigeminais e avaliação com traçadores radiomarcados ou corantes vitais
Ativação do Núcleo Trigeminal Caudal (NTC)	Sistema Trigeminovascular Vias nociceptivas centrais	Estimulação meníngea ou estimulação mecânica/elétrica de estruturas inervadas pelo trigêmeo
Depressão Cortical Alastrante	Vasodilatação e ativação de neurônios trigeminais por depressão alastrante	Aplicação cortical de cloreto de potássio (KCl), expressão de <i>c-fos</i> no NTC
Efeitos de doadores de óxido nítrico	Sistema Trigeminovascular Vias nociceptivas centrais Interação nociceptiva-autônômica	Respostas nociceptivas, cerebrovasculares e neuroquímicas decorrentes de administração central ou sistêmica de nitroglicerina

8.2 Modelos vasculares *in vitro* para estudos farmacológicos

Nesses modelos são utilizados diferentes tipos de vasos sanguíneos, incluindo os de seres humanos, para o estudo de fármacos empregados no tratamento de dores de cabeça. É método razoavelmente sensível e, apresentando fácil reprodutibilidade, permite o estudo de muitos compostos em curto período de tempo, utilizando-se a mesma preparação. Também permite o estudo dos receptores e neurotransmissores envolvidos (Lizasoain e Leira, 2003, Bergerot *et al.*, 2006).

8.3 Modelos neurovasculares para estudos farmacológicos

Em modelos neurovasculares, é feita a ativação do sistema trigeminovascular (STV) por meio de estimulação elétrica, química ou imunológica do gânglio trigeminal, ou mesmo de seus nervos mais periféricos (Lizasoain e Leira, 2003; Bergerot *et al.*, 2006).

Moskowitz e colaboradores (1984) foram os primeiros a descrever o fenômeno da inflamação neurogênica em meninges de ratos, após esse tipo de estimulação. Estímulo nociceptivo produz aumento da atividade neuronal, que pode ser evidenciado por meio da quantificação de neurônios que expressam *c-fos* nas lâminas I e II do núcleo caudal do nervo trigêmeo. Isso desencadeia a liberação de peptídeos neuro-inflamatórios, como CGRP, SP e NKA, que são potentes vasodilatadores, agindo de modo dependente do óxido nítrico. Esses mediadores, além de gerarem extravasamento plasmático em dura-máter, estão envolvidos no mecanismo de dor durante o episódio de cefaléia (Lizasoain e Leira, 2003; Bergerot *et al.*, 2006).

Em modelos experimentais de cefaléia, antes da estimulação do STV, pode ser administrada, por via intravenosa, albumina ¹²⁵I ou azul de Evans, com a finalidade de verificar a ocorrência de extravasamento plasmático durante o processo, que seria resultante da

inflamação neurogênica. Para tal, é realizada a medida da quantidade dessas substâncias fora do espaço intravascular (Lizasoain e Leira, 2003; Spokes e Middlefell, 1995).

Entre os modelos neurovasculares, talvez o mais interessante sejam aqueles relacionados à administração sistêmica de nitratos orgânicos, que são potentes vasodilatadores.

9. MODELO NEUROVASCULAR DE ATIVAÇÃO TRIGEMINAL POR ADMINISTRAÇÃO DE NITROGLICERINA, POR VIA SISTÊMICA

O modelo animal de ativação do sistema trigeminovascular pela administração de nitroglicerina baseia-se na observação, em seres humanos, de que este fármaco é capaz de desencadear cefaléia similar àquelas apresentadas por indivíduos enxaquecosos, após várias horas de sua administração, além de reproduzir sintomas premonitórios associados a crises de enxaqueca (Iversen *et al.*, 1989). Este composto também é capaz de desencadear a expressão de *c-fos* no complexo trigeminocervical, indicando ativação deste sistema nociceptivo da região cervical alta e crânio (Tassorelli e Joseph, 1995).

A nitroglicerina (trinitrato de glicerina; NTG) é um nitrato orgânico, de curta meia-vida plasmática – cerca de 1 a 4 minutos, que pode ser prolongada em tecidos lipofílicos, incluindo o encéfalo. Este composto é rapidamente metabolizado intracelularmente em NO, que é importante mensageiro neuronal, com diversas funções sinalizadoras, tanto em SNC, quanto em Sistema Nervoso Periférico (Moncada *et al.*, 1991, Bergerot *et al.*, 2006). Sua metabolização é realizada pela enzima mitocondrial aldeído-D-hidrogenase (Michel, 2006).

Agindo em sistema cardiovascular, a nitroglicerina causa vasodilatação, acarretando diminuição da pressão diastólica e discreta redução em resistência vascular pulmonar e débito cardíaco. Em altas doses, é capaz de gerar estase venosa, aumento da resistência arteriolar e redução da pressão arterial (sistólica e diastólica) e débito cardíaco, podendo acionar mecanismos autonômicos regulatórios das funções cardiovasculares (Michel, 2006).

Repetida ou contínua exposição à nitroglicerina pode levar à atenuação da magnitude de seu efeito farmacológico. Essa tolerância é relacionada a dosagem e frequência de uso. Esse fenômeno pode ser resultante de: (a) redução da capacidade da musculatura lisa converter aquele composto em óxido nítrico (Figura 6), o que é chamado de “tolerância vascular verdadeira”, ou (b) de ativação de mecanismos extravasculares (pseudotolerância). Alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na “tolerância vascular” são: aumento de volume plasmático, ativação neuro-humoral, depleção celular de grupos sulfidrilas e geração de radicais livres. O estresse oxidativo também pode estar relacionado a esse fenômeno, pois ocorre inativação da enzima aldeído-D-hidrogenase mitocondrial nessa circunstância (Michel, 2006). Fenômeno interessante, associado à tolerância a nitratos, é o surgimento de cefaléia cerca de uma semana após as primeiras manifestações da exposição prolongada a esses compostos. É a chamada *Monday Disease* (Marsh e Marsh, 2000; Michel, 2006).

A maioria dos estudos que utilizam nitratos orgânicos para ativação sistêmica do sistema trigeminovascular não explora o padrão comportamental que os animais possam apresentar (Tabela 3). Alguns utilizam o reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*) como medida nociceptiva, mas outros parâmetros comportamentais pouco são explorados. Na maioria das vezes, os estudos se atêm a medidas imunoistoquímicas, como a expressão de *c-fos* (Tassorelli e Joseph, 1995), ou a parâmetros eletrofisiológicos e de fluxo vascular (Bergerot *et al.*, 2006).

10. DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA SUBCUTÂNEA

A região orofacial é área densamente inervada pelo nervo trigêmeo e, muitas vezes, é sítio freqüente de dores referida e crônica. Alterações clínicas no território trigeminal, como aumento da sensibilidade cutânea e hiperalgesia, observadas em cefaléias primárias e dores orofaciais em geral, são muito sugestivas de anormalidades no sistema nociceptivo trigeminal (Bartch *et al.*, 2003).

Existem poucos modelos comportamentais dedicados à avaliação de nocicepção nessa área, especialmente no que se refere à sua relação com cefaléias. A maioria deles se baseia nas medidas de limiares nociceptivos ou latências após estímulos nocivos na região orofacial ou em estruturas cranianas profundas, como seios venosos e grandes artérias durais (Le Bars *et al.*, 2001; Lizasoain *et al.*, 2003; Mitsikostas *et al.* 2001; Raboisson e Dallel, 2004).

Entre os modelos nociceptivos experimentais de dores orofaciais e cefálicas, o teste da formalina é um dos mais relevantes e o mais preditivo, em termos de aplicabilidade clínica, quando se estudam dores agudas. Ele avalia a nocicepção trigeminal por meio da aplicação de estímulo químico (administração subcutânea de formalina) na região orofacial. Esse modelo constitui uma adaptação do teste da formalina administrada na superfície plantar de animais (Clavelou *et al.*, 1989; Dubuisson *et al.*, 1977; Raboisson e Dallel, 2004; Raboisson *et al.*, 2004).

A injeção subcutânea de formalina na pata gera injúria tecidual, com conseqüentes alterações comportamentais e resposta eletrofisiológica que perduram por minutos até mais de uma hora. Os achados característicos da resposta comportamental à injeção de formalina (1 a 5%) em roedores é um padrão nociceptivo bifásico (Pacák e Palkovits, 2001). Imediatamente após a administração do estímulo químico, há uma fase aguda de nocicepção, expressa por resposta comportamental vigorosa (fase 1), que perdura por 3 a 5 minutos. Segue-se uma fase silente (sem comportamento sugestivo de nocicepção), que se inicia 5 a 15 minutos após a injeção e dura de 10 a 15 minutos. Na última etapa (fase 2), ocorre reação inflamatória no tecido periférico, caracterizada por intensa atividade nociceptiva, que perdura por 20 a 60 minutos (Clavelou *et al.*, 1989; Dickenson e Sullivan, 1987; Pacák e Palkovits, 2001).

As principais respostas comportamentais observadas nesse modelo são: (1) medida do número de reflexos de auto-limpeza (*grooming* em inglês), dirigidos ao local da injeção de formalina, (2) vocalização espontânea, (3) tremores vigorosos do corpo (*shaking* em inglês), associados ao ato de lamber as patas dianteiras e proteger vigorosamente o focinho, e (4)

trismo. Todos estes comportamentos são potencialmente indicativos de dor e disestesia grave (Anderson *et al.*, 2003).

Segundo Dubuisson e colaboradores (1977), a dor, no modelo nociceptivo trigeminal, seria inicialmente resultante da reação inflamatória gerada pela ligação da formalina às proteínas teciduais, por meio da formação de pontes primárias de carbono (propriedade fixadora do tecido). Tal reação inflamatória na área de injeção persiste por período relativamente longo. Edema de lábio superior, por exemplo, pode ser observado até 24 horas após. A resposta inicial (fase 1) possivelmente decorre da estimulação direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase deve-se a inflamação e sensibilização central (Ichinose *et al.*, 1999).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que os nociceptores das fibras periféricas A δ e C, bem como os neurônios nociceptivos convergentes do núcleo trigeminal espinhal, são excitados pela administração de formalina no campo nociceptivo correspondente (Anderson *et al.*, 2003; Raboisson *et al.*, 2004;).

Leong e colaboradores (2000) observaram que a injeção subcutânea de formalina na região da face inervada pelo segundo ramo do nervo trigêmeo induz a expressão do proto-oncogene *c-fos* (*c-fos*) nas lâminas I e II do núcleo sensitivo trigeminal. Esta expressão de *c-fos* possivelmente seja mediada por óxido nítrico (Leong *et al.*, 1999).

No modelo de injeção plantar de formalina, receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA (subtipo cainato GluR5) parecem mediar a resposta nociceptiva à formalina em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Simmons *et al.*, 1998). Não há dados quanto ao modelo de injeção orofacial desse composto.

Entre os principais parâmetros comportamentais medidos no modelo de administração de formalina na área facial, está o reflexo de auto-limpeza (*grooming*) (Raboisson e Dallel, 2004). O mesmo é dirigido para a região orofacial com o uso do membro (anterior ou posterior) ipsilateral ao do local da administração de formalina. Outras medidas comportamentais, como o número de cruzamentos (*crossings* em inglês – medida de

locomoção) e o número de respostas de orientação (*rearings* em inglês – medida de comportamento exploratório), e sua associação com medidas nociceptivas (*tail-flick latency* – latência do reflexo de retirada da cauda), são pouco exploradas.

Sendo assim, essa Dissertação teve como objetivo realizar estudos sobre a modulação da nocicepção mediada por vias trigeminais, em modelo animal correlacionável com os quadros de dores orofaciais e cefálicas em seres humanos. Para tal, foi promovida a ativação do sistema trigeminovascular de modos periférico (dor orofacial induzida por formalina) e sistêmico (modelo neurovascular de ativação sistêmica por administração de nitroglicerina). Pela facilidade técnica e resultados prévios, foram selecionados os modelos descritos por Clavelou e colaboradores (1989) e Tassorelli e colaboradores (1999) para emprego na presente Dissertação.

Objetivos

1. OBJETIVO GERAL

Essa Dissertação teve como objetivo geral avaliar parâmetros comportamentais e nociceptivos resultantes da associação de modelo de ativação periférica do sistema trigeminovascular, baseado na administração subcutânea de formalina na região orofacial, com modelo neurovascular de ativação sistêmica, baseado na administração intraperitoneal de nitroglicerina. Para tal, aqueles parâmetros foram previamente avaliados em cada um dos modelos propostos isoladamente. Procurou-se, assim, verificar a ocorrência de uma possível sensibilização de vias medulares nociceptivas, por meio da avaliação de respostas nociceptivas comportamentais geradas por estímulo periférico e sistêmico do sistema trigeminal.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1. Avaliar parâmetros comportamentais em campo aberto – número de cruzamentos (*crossing*), número de respostas de orientação (*rearing*) e tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*) – utilizando o modelo de dor orofacial induzida pela formalina, a fim de verificar qual deles poderia melhor representar a resposta nociceptiva nessa situação.
- 2.2. Avaliar, no modelo neurovascular de ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina, o padrão de resposta da medida comportamental previamente selecionada como representativa de nocicepção em campo aberto (objetivo 2.1).
- 2.3. Avaliar a resposta nociceptiva, por meio da medida do reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*), em experimento no qual se associam os modelos de dor orofacial induzida pela formalina e neurovascular de ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina.

Materiais e Métodos

1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados no estudo ratos Wistar, machos, com idade de 60 dias ao início dos experimentos, pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os animais foram mantidos em caixas-moradia confeccionadas em *plexiglass*, medindo 41 cm de altura, 34 cm de largura e 16 cm de profundidade, com fundo recoberto por serragem. Foram submetidos a ciclo claro-escuro de 12 horas (período de luz das 7 h às 19 h), recebendo ração padronizada e água *ad libitum*.

Os animais foram pesados e aleatoriamente distribuídos nos grupos propostos em cada experimento.

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico, sob os cuidados do CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

2. AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

2.1. OBSERVAÇÃO EM CAMPO ABERTO

Foi realizada em caixa de madeira recoberta por fórmica (interna e externamente), medindo 50 cm de altura, 60 cm de largura e 40 cm de profundidade, com face anterior de vidro. O assoalho estava dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras (Figura 7) (Netto *et al*, 1987; Spruijt *et al.*, 1992).



Figura 7. Caixa de madeira para observação em campo aberto, recoberta por fórmica (interna e externamente), medindo 50 x 60 x 40 cm de profundidade, com face anterior de vidro e assoalho dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras.

Cada animal foi gentilmente colocado no canto posterior esquerdo da caixa e deixado livre para explorar o ambiente por 5 minutos, durante os quais foram realizadas as medidas propostas. O registro do número de respostas de orientação (*rearings*), do número de cruzamentos (*crossings*) e do tempo gasto realizando reflexos de auto-limpeza (*groomings*) foi feito em diferentes períodos de tempo, de acordo com o experimento em questão (Spruijt *et al.*, 1992, Nahas, 1999)(Figura 8). Foram obtidas medidas imediatamente antes (basal) e após os animais serem submetidos ao tratamento estipulado.

O número de cruzamentos foi medido em função do número total de retângulos que o animal ultrapassou com as quatro patas. Na medida do número de reflexos de orientação, foi

considerado o número total de vezes que o animal se apoiou nas patas traseiras e assumiu a posição ortostática (Nahas, 1999). O tempo total (em segundos) em que o animal permaneceu realizando o reflexo de auto-limpeza (*grooming*) na região das vibrissas foi utilizado como medida de comportamento nociceptivo (Clavelou *et al.*, 1989).

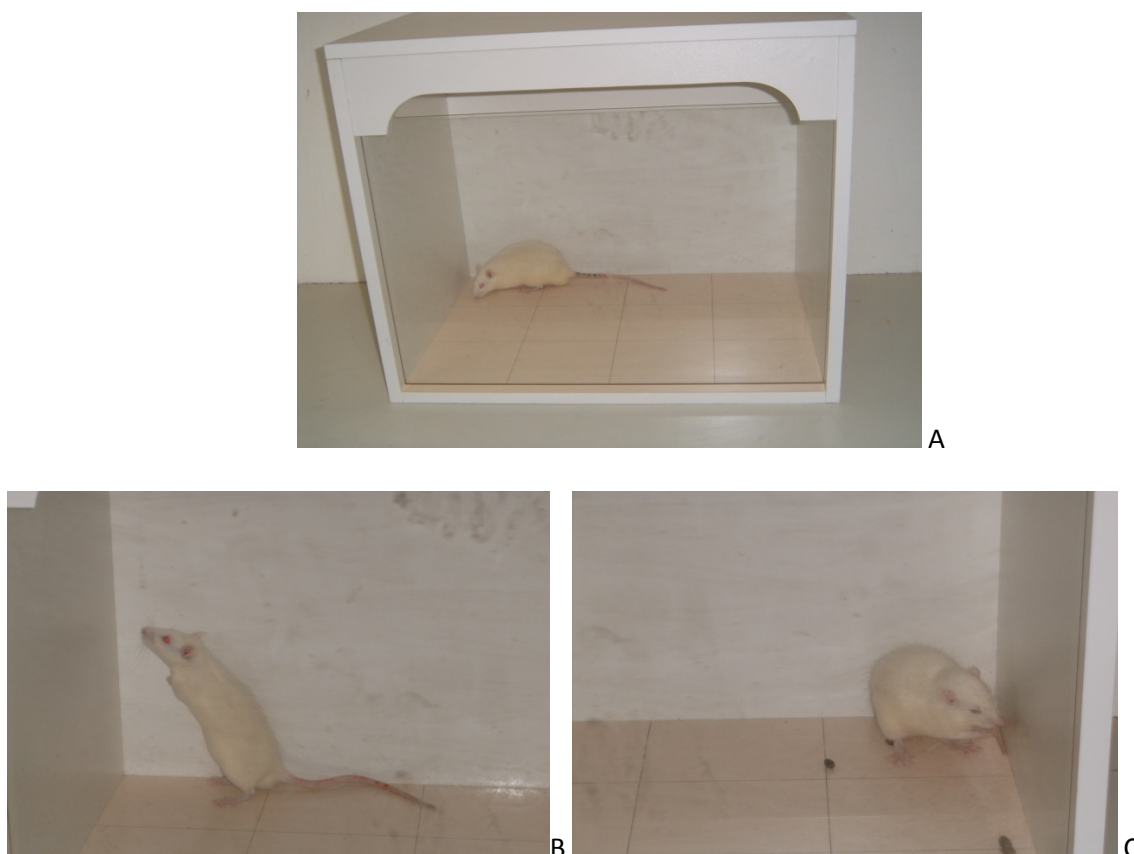


Figura 8. Padrões comportamentais observados em campo aberto. (A) Número de cruzamentos (*crossings*); (B) número de respostas de orientação (*rearings*), (C) reflexos de auto-limpeza (*groomings*).

2.2. AVALIAÇÃO DO REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA (*TAIL-FLICK*)

A resposta nociceptiva foi avaliada por meio do aparelho de *tail-flick*, conforme técnica descrita por D'Amour e Smith (1941). Cada animal foi contido, empregando-se uma toalha de tecido de algodão, e colocado no aparelho, com a cauda imobilizada sobre uma fenda delimitada por duas chapas de metal. Ligado o aparelho, feixe de luz fixa incidia 2-3 cm rostralmente à porção mais distal da cauda. O acionamento da fonte luminosa disparava

automaticamente um cronômetro digital. A deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado da fonte luminosa, interrompia sistema de fotocélula ligado ao feixe de luz, encerrando a medida (com travamento do cronômetro). A intensidade da luz foi ajustada em 0,35 mA, a fim de se obterem latências basais de retirada da cauda (*tail-flick latency* ou TFL em inglês) de 3 a 5 segundos no grupo controle. Limite de 10 segundos (teto) foi imposto às medidas para evitar danos teciduais (D'Amour e Smith, 1941; Netto *et al.*, 1987; Siegfried *et al.*, 1987)(Figura 9).

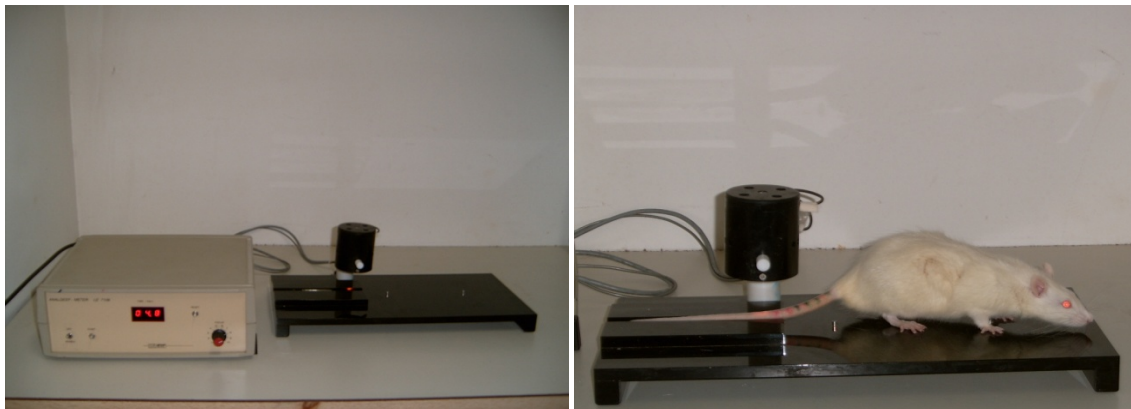


Figura 9. Aparelho de medida de reflexo de retirada da cauda (*tail-flick*). Após a cauda ser imobilizada sobre uma fenda, o aparelho foi acionado e feixe de luz fixa incidiu 2-3 cm rostralmente à porção mais distal da cauda. O acionamento da fonte luminosa disparou automaticamente um cronômetro digital. A deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado da fonte luminosa, interrompeu o sistema de fotocélula ligado ao feixe de luz e encerrou a medida (Basal: 3-6 s / Teto: 10 s).

Esse teste baseia-se no princípio de que o calor produzido pela incidência de luz sobre o animal provoca uma resposta nociceptiva, manifestada por meio do reflexo de retirada da cauda (D'Amour e Smith, 1941; Netto *et al.*, 1987; Siegfried *et al.*, 1987). A latência para retirada da cauda (TFL) representa o período de tempo (em segundos) que se estendeu desde o início da contagem até a deflexão da cauda.

O procedimento-padrão para obtenção dessas medidas constou das etapas a seguir.

(a) Vinte e quatro horas antes do experimento, os animais foram expostos ao aparelho, para familiarizarem-se com o mesmo e com o procedimento a ser realizado, uma vez que a novidade pode induzir antinocicepção (Netto *et al.*, 1987).

(b) No dia do experimento, foram obtidas medidas imediatamente antes (latência de base) e após cada animal receber o tratamento proposto, em tempos específicos, conforme o experimento em questão.

2.3. NOCICEPÇÃO OROFACIAL INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE FORMALINA

No teste de dor orofacial induzida por formalina (Clavelou *et al.*, 1989), foi realizada a administração de agente irritante – solução de formalina 5% (50 μ L) – ou de solução salina (NaCl a 0,9%; 50 μ L), por via subcutânea, no coxim direito das vibrissas de cada animal (figura 10)

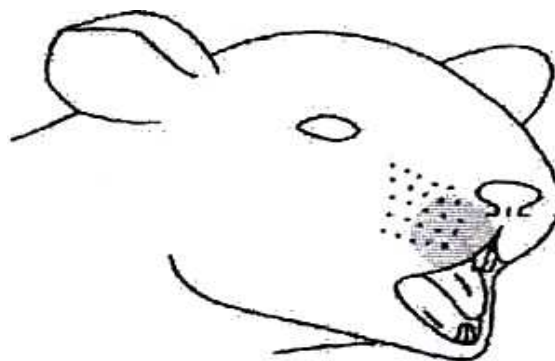


Figura 10. Região orofacial do rato em que é administrado formalina 5 % por via subcutânea (Adaptado de Raboisson e Dallel, 2004).

Nesse teste, foi observado o comportamento de auto-limpeza (*grooming*), por meio do ato de coçar com as patas dianteiras a região em que foi feita a injeção de formalina. Foi cronometrado o tempo gasto pelo animal nesse comportamento. Para tanto, antes do experimento, o animal foi colocado no campo aberto por período de 5 minutos (conforme descrito no item 2.1), para que fosse registrado o tempo total de reflexo de auto-limpeza na região das vibrissas, além do número total de cruzamentos e de reflexos de orientação espacial (medidas basais).

2.4. MODELO NEUROVASCULAR DE ATIVAÇÃO TRIGEMINAL POR ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE NITROGLICERINA

No modelo neurovascular de ativação trigeminal por nitroglicerina (Tassorelli, 1999), foi realizada a administração, por via intraperitoneal, de trinitrato de glicerina (TRIDIL®, solução de 5 mg/mL; dose de 10 mg/kg), veículo (propilenoglicol 30%, etanol 30%, água 40%) ou solução salina (NaCl a 0,9%) (Tassorelli *et al.*, 1999).

Uma vez que não há estudos na literatura avaliando padrões comportamentais relacionados a esse modelo, utilizou-se como base o delineamento experimental do modelo de dor orofacial induzida pela formalina (Clavelou *et al.*, 1989). Imediatamente antes (basal) e após a administração do tratamento proposto – trinitrato de glicerina, veículo ou solução salina, foi feita observação do animal por período de 5 minutos, durante o qual se registrou o número de segundos gastos na realização do reflexo de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto. Os registros pós-tratamento foram feitos em diferentes períodos de tempo, de acordo com o experimento em questão.

Também foram registradas as latências do reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail- flick latency*) antes (basal) e em distintos períodos após o animal receber a administração do tratamento proposto no modelo de ativação neurovascular de ativação trigeminal.

3. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Foram administrados os fármacos e soluções descritos a seguir.

(1) Solução salina (NaCl a 0,9%), administrada por via subcutânea, em volume de 50 μ L.

(2) Solução de formalina a 5% (Formol P.A.[®]; Laboratório Synth; diluído em solução salina), administrada por via subcutânea, em volume de 50 μ L.

(3) Veículo, constituído por 30% de propilenoglicol, 30% de etanol e 40% de água destilada, administrado por via intraperitoneal.

(4) Trinitrato de glicerina (TRITIL[®], Laboratório Cristália; em solução de 5 mg/mL, obtida a partir da diluição em veículo), na dose de 10 mg/kg, administrada por via intraperitoneal.

Foi utilizada solução salina para diluição e obtenção da solução desejada de formalina. Ambas as soluções foram administradas por via subcutânea, em volume de 50 μ L.

Para a diluição de trinitrato de glicerina, foi utilizado veículo. As soluções de glicerina e veículo foram preparadas de modo a se injetar volume de 1 ml/kg por animal, por via intraperitoneal.

As doses empregadas tiveram por base estudos prévios da literatura (Clavelou *et al.*, 1989; Tassorelli *et al.*, 1999).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM).

Teste *t* de Student para amostras independentes ou ANOVA de uma via, seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni quando indicado, foram utilizados para comparação das medidas basais das latências de retirada da cauda (TFL), do número de respostas de orientação e cruzamentos e do tempo gasto em comportamento de auto-limpeza, nos grupos experimentais propostos.

Para comparação dos grupos quanto às latências de retirada da cauda (TFL), ao número de respostas de orientação e cruzamentos e ao tempo gasto em comportamento de auto-limpeza, nos diferentes momentos de avaliação, foi utilizada ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni, quando indicado.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com probabilidades de erro alfa iguais ou inferiores a 5% ($P \leq 0,05$).

5. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União - 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação.

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados nas publicações *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - ILAR/EUA (1996) e Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil, 1996), estando de acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado por *International Association for the Study of Pain* (IASP). Tais procedimentos são de uso habitual por pesquisadores que trabalham e publicam na área e obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences* - CIOMS) (Goldim e Raymundo, 1997).

Todos os procedimentos foram planejados para minimizar dor e desconforto.

Resultados

EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E RESPOSTA NOCICEPTIVA EM RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA SUBCUTÂNEA

As regiões orofacial e craniana são ricamente innervadas pelo nervo trigêmeo. Processos dolorosos nessas regiões são muito sugestivos de anormalidades no sistema nociceptivo trigeminal (Bartch *et al.*, 2003).

Entre os modelos experimentais para o estudo de dores orofaciais, o teste da formalina é um dos mais relevantes (Raboisson e Dallel, 2004). O principal parâmetro comportamental medido nessa circunstância é o reflexo de auto-limpeza (*grooming*) (Raboisson e Dallel, 2004). Outras medidas comportamentais, como o número de cruzamentos (*crossings* – medida de locomoção) e o número de respostas de orientação (*rearings* – medida de comportamento exploratório), e sua associação com outras medidas nociceptivas (*tail-flick latency* – reflexo de retirada da cauda), são pouco exploradas.

Esse experimento teve por objetivo avaliar parâmetros comportamentais associados ao modelo de dor orofacial decorrente da administração subcutânea de formalina.

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com 200 a 300 g de peso corporal, divididos em dois grupos: SALINA e FORMALINA. Nos dias do experimento, foram obtidas as medidas basais dos parâmetros comportamentais em estudo. Após, foi feita a administração, por via subcutânea, de solução de formalina a 5% (50 µL) ou solução salina (NaCl 0,9%) (50 µL), por meio de agulha 30 x 0,5 mm, no centro da vibrissa direita. A seguir, foram mensuradas as respostas pós-tratamento.

Para a avaliação da resposta nociceptiva a um estímulo térmico nocivo (*tail-flick*), os animais foram submetidos a medidas do reflexo de retirada da cauda imediatamente antes (basal), 30 minutos e 24 horas após a administração subcutânea de formalina ou salina (Figura 11).

Para a avaliação das respostas motora (cruzamentos), de auto-limpeza (*grooming*) e de exploração de um novo ambiente (respostas de orientação), os animais foram colocados para observação em campo aberto por período 5 minutos. Aqueles parâmetros foram mensurados imediatamente antes (medidas basais), imediatamente após (0 minuto), 15 minutos e 24 horas após a administração, por via subcutânea, de formalina ou solução salina (Figura 8).

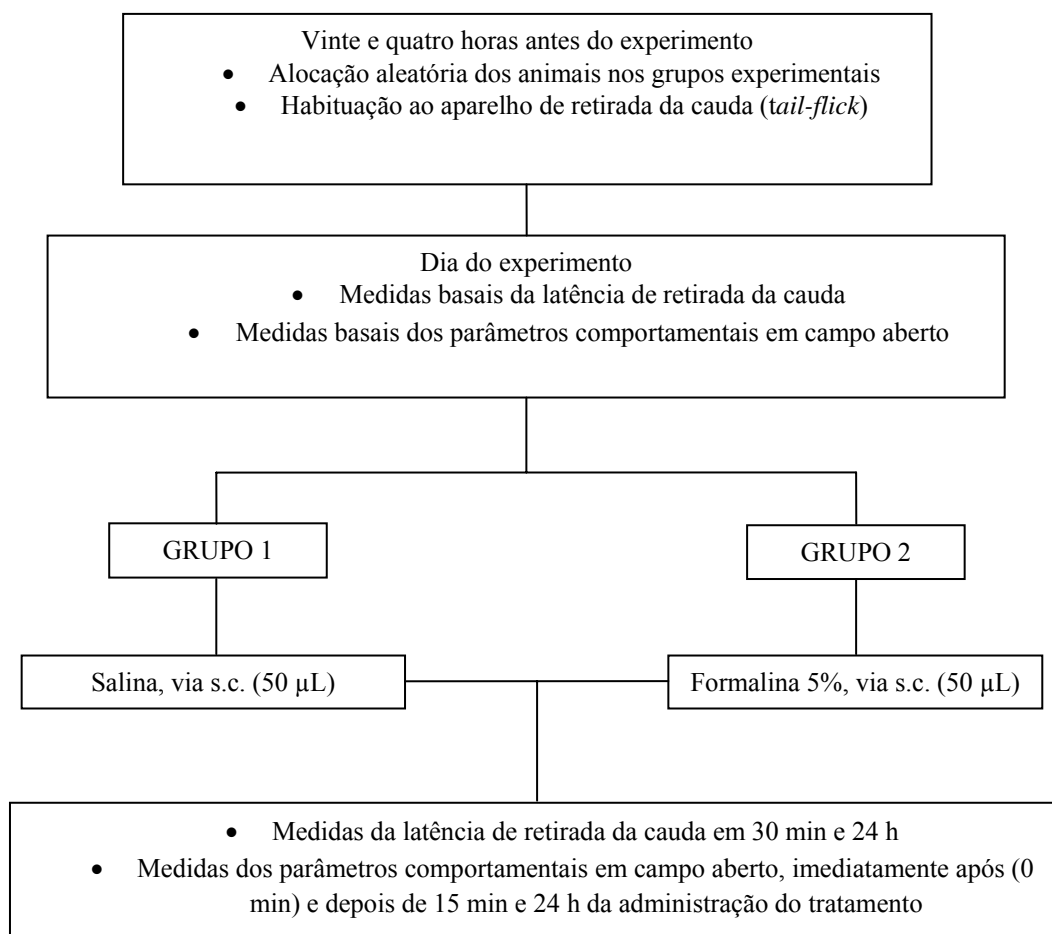


Figura 11. Organização geral do experimento 1. Esquema de administração do tratamento proposto (agente irritante ou solução controle) e tempos de medidas dos parâmetros comportamentais em estudo.

Nesse experimento, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos SALINA e FORMALINA quanto às medidas basais dos parâmetros comportamentais avaliados, seja no teste de *tail-flick*, seja na observação em campo aberto (Teste *t* de Student para amostras independentes, $P>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Medidas dos parâmetros comportamentais em estudo, obtidas imediatamente antes da administração subcutânea de solução de formalina a 5% (50 µL) ou solução salina (50 µL) na vibrissa direita dos ratos, em teste de *tail-flick* e durante a observação em campo aberto. Dados expressos como média ± DPM.

Grupos	Latência de retirada da cauda (s) ¹	Número de cruzamentos ¹	Número de respostas de orientação ¹	Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (s) ¹
Salina (n=10)	4,45 ± 1,20	39,60 ± 26,87	18,20 ± 9,61	29,09 ± 17,94
Formalina (n=10)	4,16 ± 0,99	46,10 ± 16,99	23,70 ± 9,12	38,12 ± 24,51

¹ Teste *t* de Student para amostras independentes, $P > 0,05$.

Para a análise da resposta nociceptiva ao longo do tempo, por meio da medida da latência do reflexo de retirada da cauda, utilizou-se ANOVA de medidas repetidas. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os tempos, entre os grupos ou na interação entre tempos e grupos ($F=0,09$ para os tempos, $P=0,77$; $F=0,99$ para os grupos, $P=0,33$; $F= 3,05$ para interação entre tempos e grupos, $P=0,09$) (Figura 12).

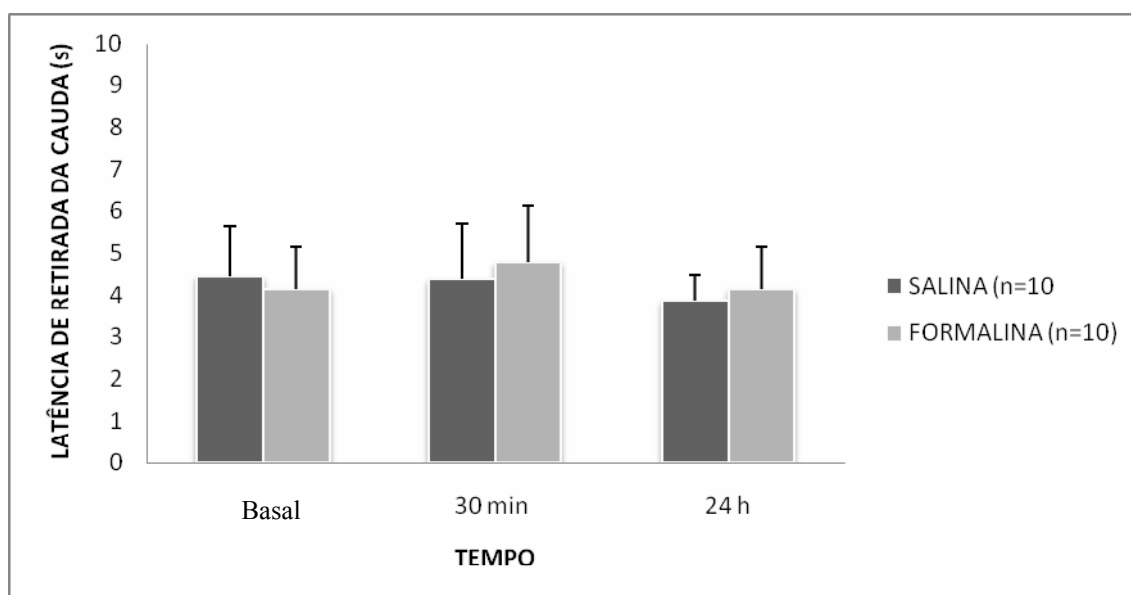


Figura 12. Latência de retirada da cauda imediatamente antes (basal) e após (30 min ou 24 h) a administração subcutânea de solução de formalina a 5% (50 µL) ou salina (50 µL), na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos como média ± DPM.

Ausência de diferenças significativas entre grupos, tempos ou interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,99$ para grupos, $P=0,33$; $F=0,09$ para tempos, $P=0,77$; $F= 3,05$ para interação tempos x grupos, $P=0,09$).

Para a análise de comportamentos em campo aberto ao longo do tempo, foi utilizada ANOVA de medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni quando indicado. Por meio daquela, observou-se redução significativa do número de cruzamentos com o decorrer do tempo, em comparação com a medida basal (ANOVA de medidas repetidas; $F=82,135$, $P=0,0001$). Não se observaram diferenças significativas na comparação entre os grupos ou quanto à interação entre os tempos e os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,09$ para grupos, $P=0,77$; $F=2,50$ para interação tempos x grupos, $P=0,13$). Verificou-se que, em todos os tempos obtidos após a administração do tratamento proposto, o número de cruzamentos mostrou-se diferente daquele considerado como basal (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,0001$). As medidas desse parâmetro, obtidas imediatamente após a administração dos tratamentos (0 minuto) e em 24 horas, não diferiram entre si (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,48$), mas ambas mostraram-se significativamente diferentes daquelas obtidas aos 15 minutos (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,001$ e $P=0,042$ respectivamente)(Figura 13). Observou-se, assim, redução gradual dos cruzamentos em campo aberto, após a administração de quaisquer dos tratamentos propostos, por pelo menos 24 horas, sendo mais acentuada aos 15 minutos.

Quanto ao número de orientações espaciais observadas em campo aberto, evidenciou-se que essas medidas variaram unicamente em função do tempo, não havendo diferenças significativas entre os grupos ou na interação entre tempos e grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=71,55$ para os tempos, $P=0,0001$; $F=0,99$ para os grupos, $P=0,33$; $F=2,16$ para interação tempos x grupos, $P=0,16$). Observou-se que as respostas de orientação espacial, em ambos os grupos, reduziram ao longo do tempo, diferindo significativamente, em todos os momentos avaliados, daquelas obtidas no tempo basal (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,0001$). Observou-se, ainda, que a medida desse parâmetro obtida 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos diferiu significativamente daquelas obtidas

nos tempos 0 minuto e 24 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,002$ e $P=0,01$ respectivamente)(Figura 14).

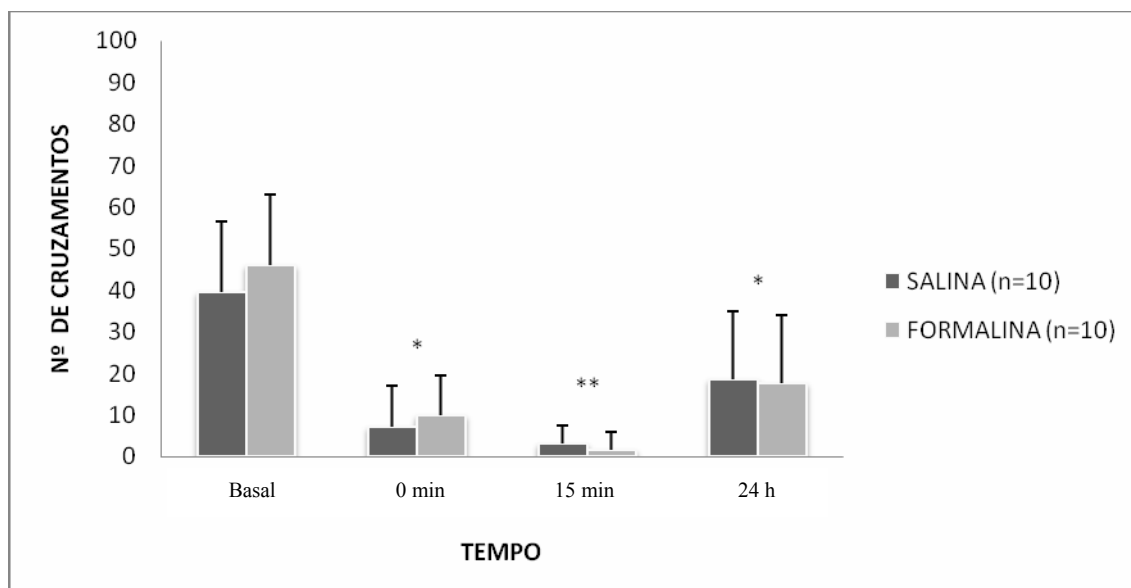


Figura 13. Número de cruzamentos em campo aberto antes (basal), imediatamente após (0 min) e depois de 15 min e 24 h da administração subcutânea de formalina a 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos como média \pm DPM.

Diferença significativa entre os tempos e ausência de diferença significativa entre grupos ou interação tempos x grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=82,135$ para tempos, $P=0,0001$; $F=0,09$ para grupos, $P=0,77$; $F=2,50$ para interação tempos x grupos, $P=0,13$).

*Diferença significativa em relação às medidas basais e àquelas obtidas aos 15 min (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,04$), independentemente do tratamento recebido. **Diferença significativa em relação a todas as demais medidas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,04$).

Também utilizando ANOVA de medidas repetidas para a avaliação do tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*), observou-se diferença significativa de comportamento entre os grupos salina e formalina, não se observando o mesmo na comparação entre os tempos ou na interação entre tempos e grupos ($F=22,29$ para os grupos, $P=0,0001$; $F=0,11$ para os tempos, $P=0,75$; $F=0,18$ para interação tempos x grupos, $P=0,67$). Logo após a administração subcutânea de formalina, o período gasto em auto-limpeza aumentou de modo significativo, permanecendo assim por pelo menos 15 minutos (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,0001$). As medidas obtidas nesses dois momentos (0 e 15 minutos) não

diferiram entre si (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P>0,05$). Em avaliação realizada após 24 horas, os valores do grupo formalina retornaram aos níveis das medidas basais e do grupo salina (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P>0,05$). As medidas de reflexo de auto-limpeza obtidas no grupo que recebeu solução salina não diferiram entre si ao longo do tempo (Figura 15).

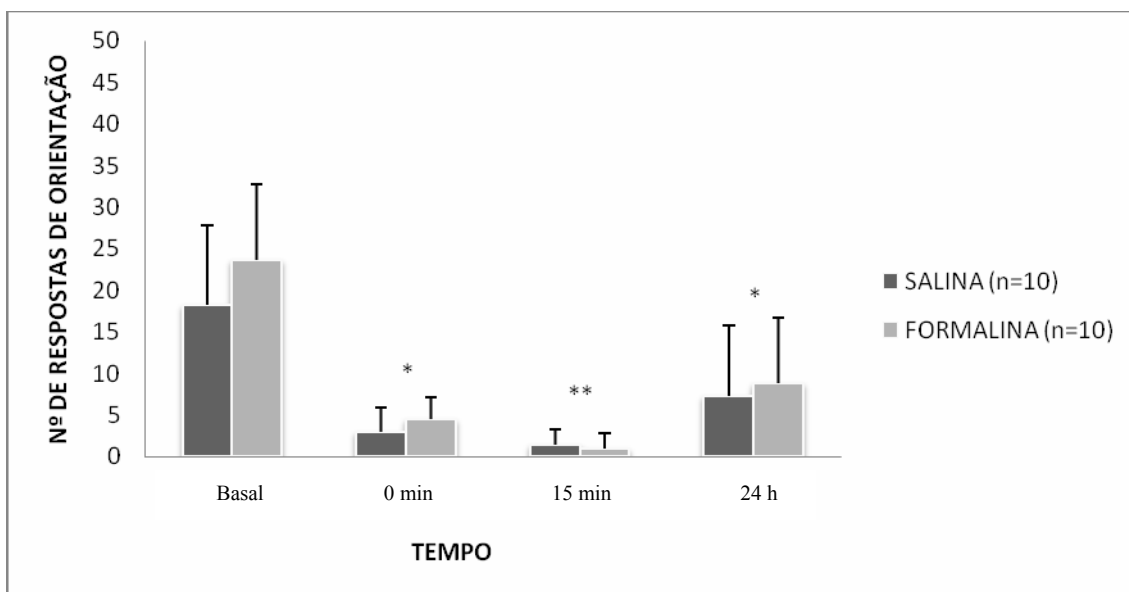


Figura 14. Número de respostas de orientação em campo aberto antes (basal) e após (0 min, 15 min ou 24 h) a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µL) ou solução salina (50 µL) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos como média \pm DPM.

Diferença significativa entre os tempos e ausência de diferença significativa entre grupos ou interação tempos x grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=71,55$ para os tempos, $P=0,0001$; $F=0,99$ para os grupos, $P=0,33$; $F=2,16$ para a interação tempos x grupos, $P=0,16$).

*Diferença significativa em relação às medidas basais e àquelas obtidas aos 15 min (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P\leq 0,01$), independentemente do tratamento recebido. **Diferença significativa em relação a todas as demais medidas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P\leq 0,01$).

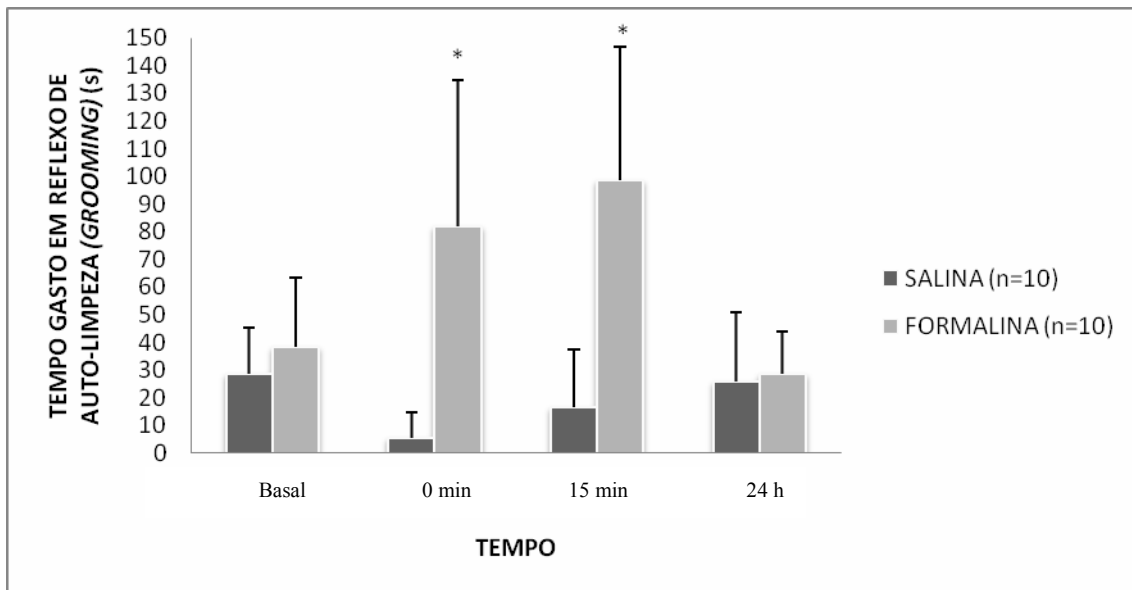


Figura 15. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto antes (basal) e após (0 min, 15 min ou 24 h) a administração subcutânea de formalina a 5% (50 µL) ou solução salina (50 µL) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos como média ± DPM.

Diferença significativa entre os grupos e ausência de diferença entre os tempos ou interação entre grupos e tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=22,29$ para os grupos, $P=0,0001$; $F=0,11$ para os tempos, $P=0,75$; $F=0,18$ para a interação tempos x grupos, $P=0,67$).

*Diferença significativa em relação ao grupo salina nos tempos assinalados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,0001$) e em relação aos grupos salina e formalina nos demais tempos (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P\leq 0,003$).

EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO PADRÃO TEMPORAL DO REFLEXO DE AUTO-LIMPEZA (*GROOMING*) COMO MEDIDA INDICATIVA DE NOCICEPÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE DOR OROFACIAL INDUZIDA POR FORMALINA SUBCUTÂNEA

No experimento 1, dentre os parâmetros comportamentais estudados, o tempo gasto no reflexo de auto-limpeza (*grooming*) foi aquele que se mostrou sensível à administração de formalina subcutânea. Sugere-se, assim, que este seja o parâmetro que melhor representa a atividade nociceptiva trigeminal no modelo de dor orofacial induzida por aquele agente.

No clássico estudo de Clavelou e colaboradores (1989), o reflexo de auto-limpeza desencadeado pela administração de formalina 5% na região do lábio superior foi avaliado por período de tempo de 45 minutos, em 15 blocos de 3 minutos cada um. A cada 6 minutos, realizou-se a aferição de *grooming* por período de tempo de 3 minutos. Aqueles autores demonstraram que essa resposta nociceptiva comporta-se de maneira bifásica. Os animais apresentaram exacerbação do reflexo de auto-limpeza durante os 3 primeiros minutos (fase 1) e no tempo compreendido entre 18 e 42 minutos (fase 2) após a administração do tratamento. No experimento 1 dessa Dissertação, as medidas foram obtidas em duas janelas de observação: uma entre 0 e 15 minutos e outra em 24 horas.

O presente experimento foi, então, delineado com a finalidade de estabelecer o período de tempo durante o qual o reflexo de auto-limpeza pode permanecer alterado, realizando avaliações em maior número de momentos, tanto logo após a administração, quanto em longo prazo, o que poderia refletir sensibilização de vias nociceptivas (Yaksh, 1999).

Para tal, utilizaram-se ratos *Wistar* adultos, com 200 a 300 g de peso corporal, divididos em 2 grupos: SALINA e FORMALINA. A metodologia utilizada foi a mesma adotada no experimento 1 (Figura 11). Nos dias do experimento, foram obtidas as medidas basais dos parâmetros comportamentais em estudo. Após, foi feita a administração, por via subcutânea,

de solução de formalina 5% (50 µL) ou solução salina (50 µL), no centro da vibrissa direita. A seguir, foram mensuradas as respostas pós-tratamento.

No campo aberto, foi avaliado apenas o tempo gasto com reflexos de auto-limpeza (*groomings*) durante observação por 5 minutos. Este parâmetro foi mensurado imediatamente antes (basal), 15 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 24 horas, 48 horas, 7 e 21 dias após a administração, por via subcutânea, de formalina ou solução salina.

Além de *grooming*, também foi feita a avaliação do padrão temporal do reflexo de retirada da cauda, com a finalidade de se verificar se o estímulo nociceptivo continuado, gerado pela administração de formalina, por via subcutânea, seria capaz de ativar vias medulares nociceptivas relacionadas à inervação trigeminal.

Para a avaliação da resposta nociceptiva a estímulo térmico nocivo, os animais foram submetidos a medidas do reflexo de retirada da cauda imediatamente antes, 15 e 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 24 e 48 horas, 7 e 21 dias após a administração dos tratamentos propostos.

Nesse experimento, não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos SALINA e FORMALINA quanto às medidas basais dos parâmetros comportamentais avaliados, seja na observação em campo aberto, seja no teste de *tail-flick* (Teste *t* de Student para amostras independentes, $P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Latência de retirada da cauda e tempo gasto em auto-limpeza em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração subcutânea de formalina 5% (50 µL) ou solução salina (50 µL) na vibrissa direita de ratos. Dados expressos como média ± DPM.

Grupos	Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (s) ¹	Latência para retirada da cauda (s) ¹
Salina (n=9)	14,03 ± 10,19	5,01 ± 1,09
Formalina (n=9)	13,67 ± 06,06	5,11 ± 1,23

¹ Teste *t* de Student para amostras independentes, $P>0,05$.

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, verificou-se que, nas observações realizadas nas primeiras 4 horas após a administração dos tratamentos em estudo, o comportamento de auto-limpeza apresentou diferenças significativas, ao se compararem os tempos e os grupos, não havendo interação entre ambos ($F=10,92$ para os tempos, $P=0,004$; $F=6,34$ para os grupos, $P=0,02$; $F=0,98$ para a interação tempos x grupos, $P=0,34$).

Na comparação dos grupos estudados, as medidas do tempo gasto em auto-limpeza 15 minutos após a administração de formalina mostraram-se estatisticamente significativas daquelas referentes aos períodos basal, 2 horas e 4 horas, nos animais que receberam esse tratamento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,001$, $P=0,001$ e $P=0,005$, respectivamente). As medidas obtidas aos 15 minutos no grupo que recebeu formalina também diferiram significativamente daquelas aferidas no grupo salina, em todos os períodos propostos – basal, 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 4 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,002$, $P=0,006$, $P=0,001$, $P=0,001$ e $P=0,001$, respectivamente). Sendo assim, 15 minutos após a administração do agente irritante, os animais despenderam mais tempo realizando comportamentos de auto-limpeza, em comparação com os controles (Figura 16).

Na comparação das medidas obtidas ao longo do tempo, independentemente do grupo estudado, constatou-se que os valores referentes aos 15 minutos diferiram significativamente daqueles referentes ao momento basal, às 2 horas e às 4 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,02$, $P=0,006$ e $P=0,02$, respectivamente)(Figura16).

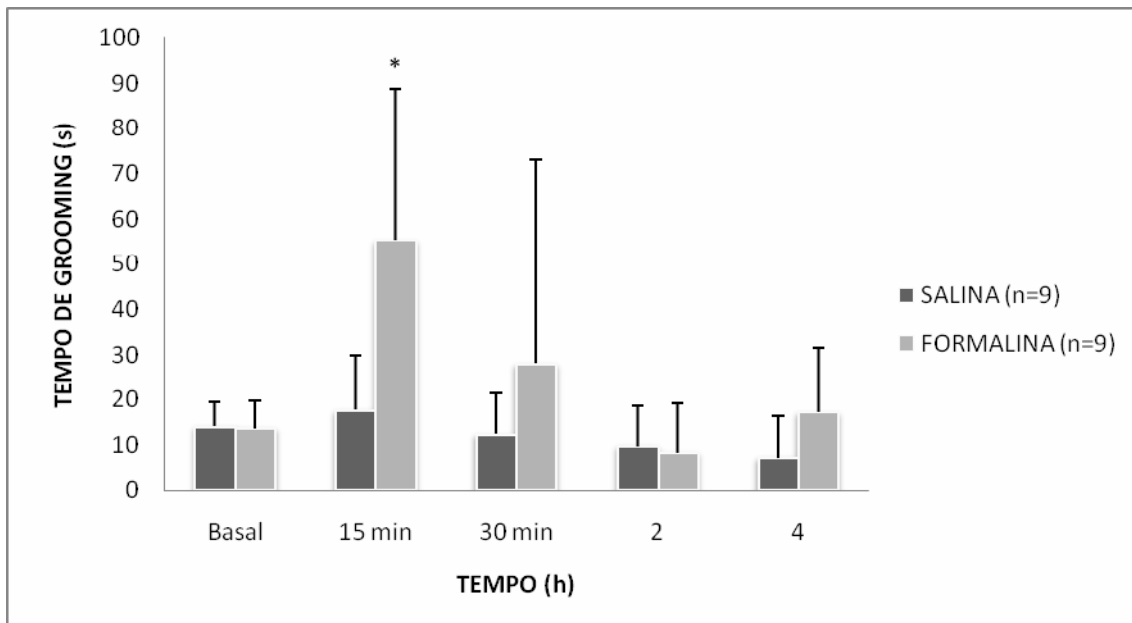


Figura 16. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza no campo aberto, durante observação realizada nas primeiras 4 horas após a administração subcutânea de formalina 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos em média \pm DPM.

Diferença significativa entre tempos e grupos e ausência de interação tempos x grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=10,92$ para tempos, $P=0,004$; $F=6,34$ para grupos, $P=0,02$; $F=0,98$ para a interação tempos x grupos, $P=0,34$).

*Diferença significativa em relação aos grupos salina, em todos os demais tempos avaliados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,006$), e em relação aos grupos formalina, nos tempos basal, 2 h e 4 h (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,006$).

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, verificou-se que, nas observações realizadas em período mais prolongado de tempo, estendendo-se de 1 dia (24 horas) a 14 dias, após a administração dos tratamentos em estudo, o comportamento de auto-limpeza não diferiu significativamente, ao se compararem os tempos e os grupos e se avaliar a interação entre ambos ($F=4,29$ para os tempos, $P=0,05$; $F=1,82$ para os grupos, $P=0,19$; $F=0,03$ para a interação tempos x grupos, $P=0,87$)(Figura 17).

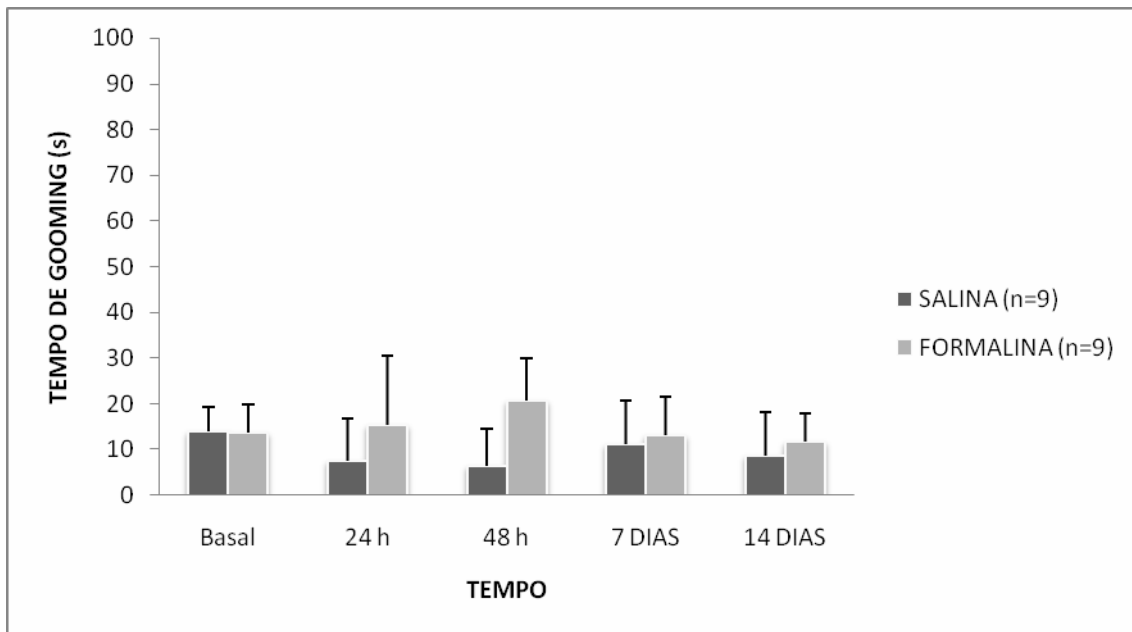


Figura 17. Tempo gasto no comportamento de auto-limpeza em campo aberto, medido antes (basal) e após 24 h, 48 h, 7 dias e 14 dias da administração subcutânea de formalina a 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos em média \pm DPM.

Ausência de diferença significativa entre tempos, entre grupos e na interação tempos x grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=4,29$ para tempos, $P=0,05$; $F=1,82$ para grupos, $P=0,19$; $F=0,03$ para a interação tempos x grupos, $P=0,87$).

Na análise das latências de retirada da cauda aferidas nas primeiras 4 horas após a administração de formalina ou solução salina, observaram-se diferenças entre os tempos, mas não entre os grupos ou na interação entre ambos (ANOVA de medidas repetidas; $F=8,74$ para os tempos, $P=0,009$; $F=0,16$ para os grupos, $P=0,70$; $F=0,07$ para a interação entre tempos e grupos, $P=0,80$) (Figura 18).

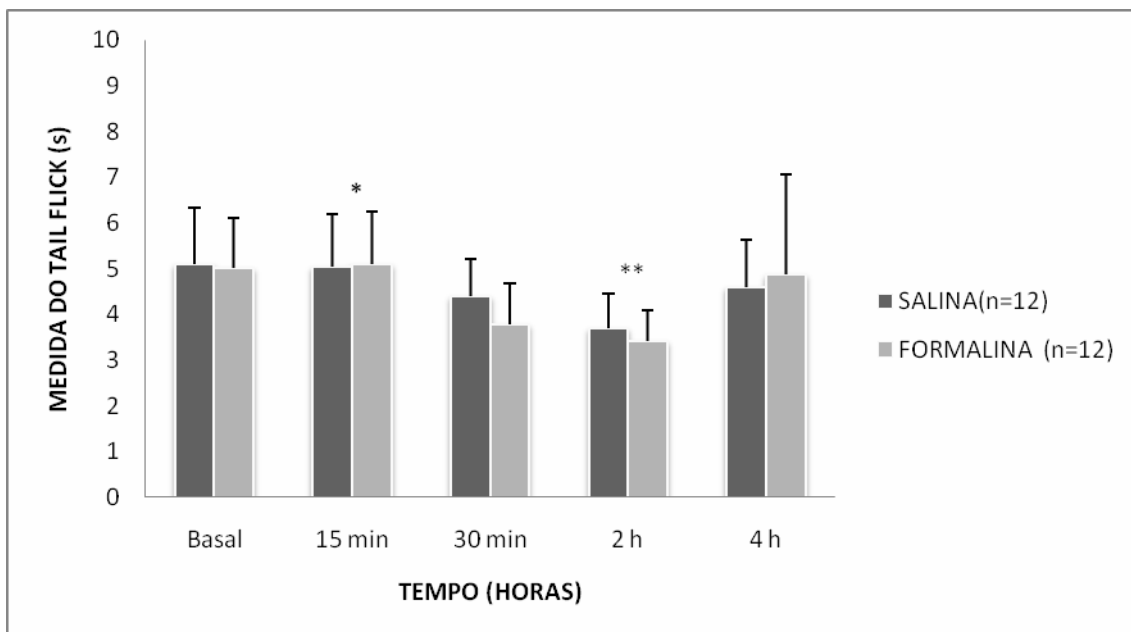


Figura 18. Latência do reflexo de retirada da cauda (*tail-flick latency*) imediatamente antes (basal) e em diferentes momentos durante as primeiras 4 horas seguintes à administração subcutânea de formalina a 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita dos ratos. Dados expressos em média \pm DPM.

Diferença significativa entre tempos, mas não entre grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=8,74$ para os tempos, $P=0,009$; $F=0,16$ para os grupos, $P=0,70$; $F=0,07$ para a interação entre tempos e grupos, $P=0,80$).

*Diferença significativa em relação aos tempos de 30 min e 2 h, independentemente dos grupos avaliados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,04$ e $P=0,01$, respectivamente)** Diferença significativa em relação ao basal, independentemente dos grupos avaliados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,004$).

Na comparação das medidas obtidas ao longo do tempo, independentemente do grupo estudado, constatou-se que as latências de retirada da cauda aos 15 minutos diferiram significativamente daquelas referentes aos 30 minutos e 2 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,038$ e $P=0,011$, respectivamente). As latências obtidas após 2 horas de tratamento mostraram-se estatisticamente diferentes daquelas consideradas basais (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,004$) (Figura 18).

Avaliando-se as medidas de latência de retirada da cauda em período de tempo para mais prolongado, estendendo-se de 1 dia (24 horas) a 14 dias após a administração subcutânea de formalina a 5% ou solução salina, não se observaram diferenças significativas

entre os tempos, entre os grupos ou na interação entre grupos e tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,05$ para tempos, $P=0,82$; $F=0,01$ para grupos, $P=0,94$; $F=0,33$ para a interação tempos x grupos, $P=0,58$)(Figura 19).

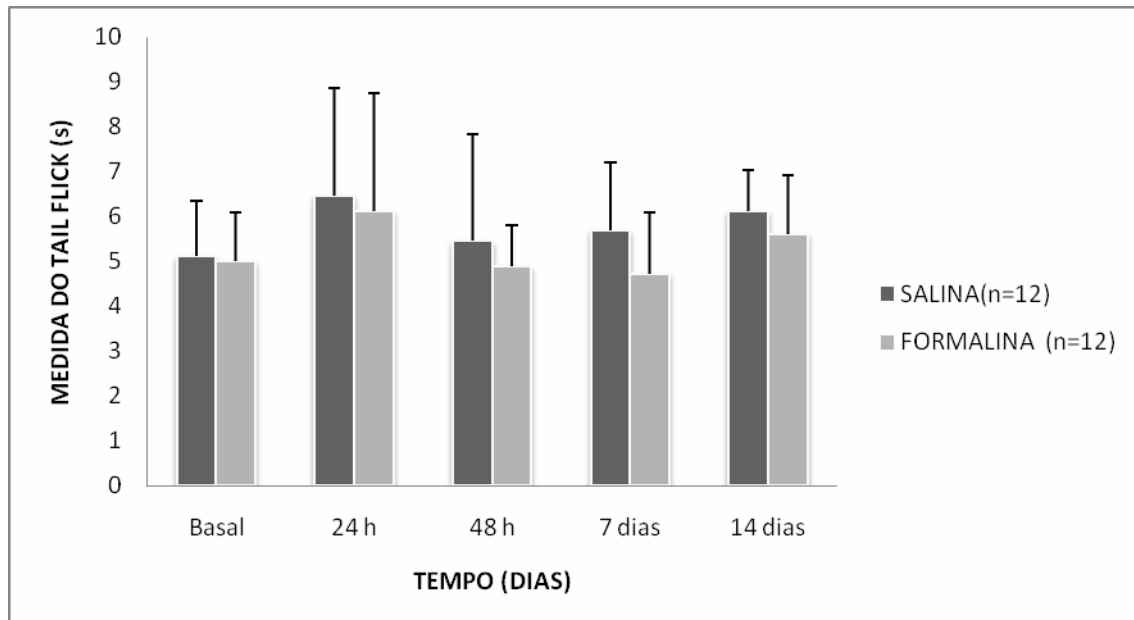


Figura 19. Latência de reflexo de retirada da cauda imediatamente antes (basal), 24 h, 48 h, 7 e 14 dias após a administração subcutânea de formalina 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita de ratos. Dados expressos como média \pm DPM.

Ausência de diferenças significativas entre grupos, tempos ou interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,05$ para tempos, $P=0,82$; $F=0,01$ para grupos, $P=0,94$; $F=0,33$ para a interação tempos x grupos, $P=0,58$).

EXPERIMENTO 3: PERFIL DO REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA (*TAIL-FLICK LATENCY*) E DO REFLEXO DE AUTO-LIMPEZA (*GROOMING*) APÓS A ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE NITROGLICERINA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE CEFALÉIA

Cefaléia vascular, um dos tipos de dores cranianas, é uma das principais reações adversas observadas com a administração de nitroglicerina, fármaco vasodilatador utilizado por pacientes no tratamento de cardiopatia isquêmica. A cefaléia induzida por esse agente possivelmente decorre de sua metabolização a óxido nítrico (Myers, 1999).

Estudos demonstram a existência de forte correlação entre os nitratos orgânicos, como nitroglicerina, e a fisiopatologia das dores de cabeça (Olesen *et al.*, 1993; Iversen *et al.*, 1993). Paralelamente, há evidências de que aquele potente vasodilatador pode ser ativador de vias nociceptivas trigeminais (Kerin *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 1999; Tassorelli e Joseph, 1995).

O reflexo de auto-limpeza é considerado como um dos melhores parâmetros comportamentais para a avaliação de nocicepção aguda orofacial após estímulo químico agudo (Anderson *et al.*, 2003). Com base nisso e na carência de estudos dedicados à avaliação de padrões de comportamento em modelos de ativação sistêmica do sistema trigeminovascular (STV), por meio do uso de nitratos orgânicos, delineou-se esse experimento com a finalidade de avaliar aspectos comportamentais relacionados aos mesmos.

Para tal, foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com 200 a 300 g de peso corporal, divididos em dois grupos: NITROGLICERINA (n=20) e VEÍCULO (n=20). Inicialmente, os animais foram pesados e aleatoriamente alocados em um dos dois grupos. Nos dias do experimento, foram obtidas as medidas basais dos parâmetros comportamentais em estudo – reflexo de auto-limpeza (*grooming*) e latência de retirada da cauda (*tail- flick latency*). Após, foi feita a administração, por via intraperitoneal (i.p.), de nitroglicerina a 0,05% (5 mg/ml), na dose de 10 mg/kg, ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água). A seguir, foram mensuradas as respostas pós-tratamento (Figura 20).

Para a avaliação da resposta de auto-limpeza (*grooming*), os animais foram colocados em campo aberto e aquele parâmetro foi mensurado imediatamente antes (basal) e em distintos períodos após a administração intraperitoneal de nitroglicerina ou veículo – 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 24 horas e 48 horas (Figura 20).

Para a avaliação da resposta nociceptiva ao estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*), os animais foram submetidos às medidas do reflexo de retirada da cauda imediatamente antes (basal), 30 minutos, 24 horas e 48 horas após a administração intraperitoneal de nitroglicerina ou veículo (Figura 20).

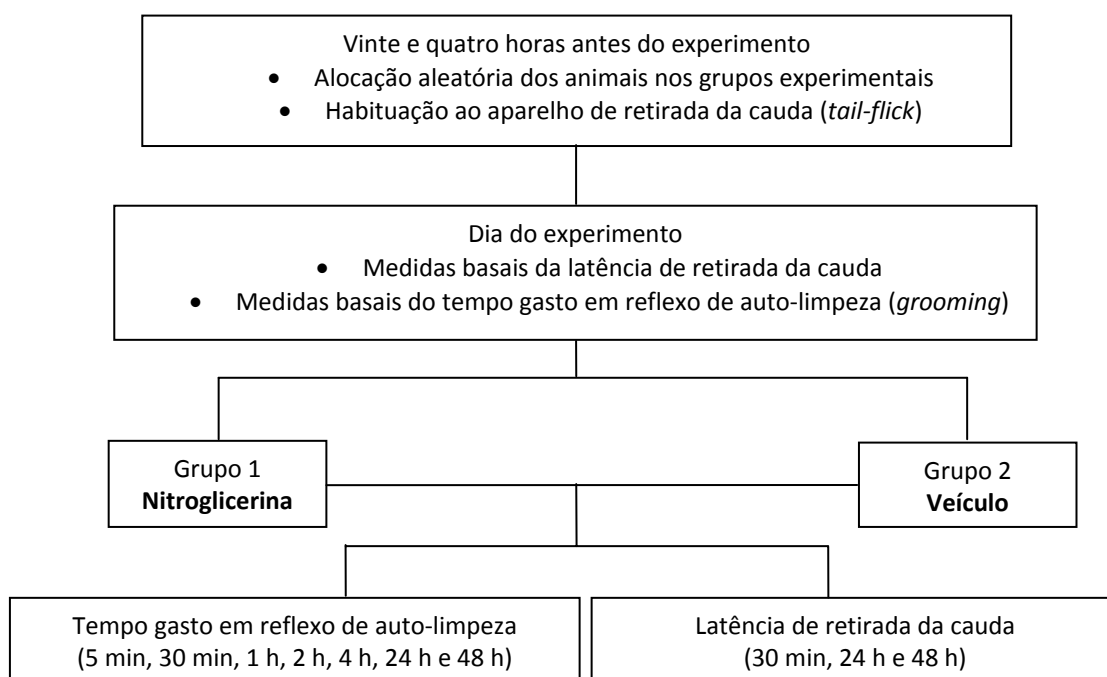


Figura 20. Organização geral do experimento 3. Esquema de administração do tratamento proposto (nitroglicerina ou veículo) e mensuração dos parâmetros comportamentais em estudo.

Não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos VEÍCULO e NITROGLICERINA quanto às medidas basais dos parâmetros comportamentais avaliados, seja na observação em campo aberto, seja no teste de *tail-flick* (Teste *t* de Student para amostras independentes, $P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Latência de retirada da cauda e tempo gasto em reflexo de auto-limpeza em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração intraperitoneal de nitroglicerina 0,05% (10 mg/mL) ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água) em ratos. Dados expressos como média \pm DPM.

Grupos	Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (s) ¹	Latência para retirada da cauda (s) ¹
Veículo (n=20)	13,76 \pm 05,54	5,07 \pm 1,58
Nitroglicerina (n=20)	14,05 \pm 13,00	4,72 \pm 1,72

¹Teste *t* de Student para amostras independentes, $P > 0,05$.

Na análise das medidas de tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*) durante as primeiras 4 horas após a administração de nitroglicerina ou veículo, observou-se a existência de diferenças significativas entre os tempos, não entre os grupos ou na interação destes com os tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=6,61$ para os tempos, $P=0,01$; $F=0,55$ para os grupos, $P=0,46$; $F=0,125$ para a interação tempos x grupos, $P=0,73$) (Figura 21).

Verificou-se que as medidas obtidas aos 5 minutos foram significativamente diferentes das basais (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,007$) e daquelas referentes aos tempos de 1 hora, 2 horas e 4 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,005$, $P=0,0001$ e $P=0,013$, respectivamente). O tempo gasto em reflexo de auto-limpeza na avaliação de 30 minutos foi significativamente diferente daquele mensurado em 2 horas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,014$) (Figura 21).

Estudando-se o tempo gasto no comportamento de auto-limpeza (*grooming*), tendo decorrido intervalo mais longo da administração de nitroglicerina ou veículo – 24 horas ou 48 horas, não se observou qualquer alteração significativa (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,11$ para os tempos, $P=0,74$; $F=1,66$ para os grupos, $P=0,21$; $F=0,07$ para a interação entre tempos e grupos, $P=0,80$) (Figura 22).

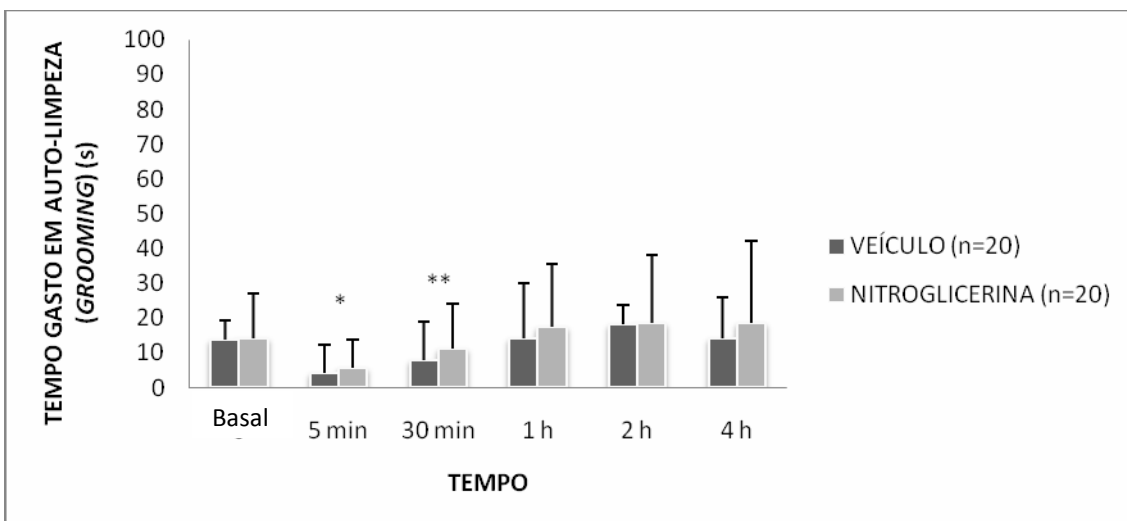


Figura 21. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) no campo aberto, imediatamente antes (basal) e após 5 min, 30 min, 1 h, 2 h e 4 h da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo. Dados expressos como média \pm DPM.

Diferença estatisticamente significativa na comparação entre os tempos, mas não entre os grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=6,61$ para os tempos, $P=0,01$; $F=0,55$ para os grupos, $P=0,46$; $F=0,12$ para a interação tempos x grupos, $P=0,73$).

*Diferença significativa em relação aos tempos basal, 1 h, 2 h e 4 h (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,013$). **Diferença significativa em relação ao tempo de 2 h (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,01$).

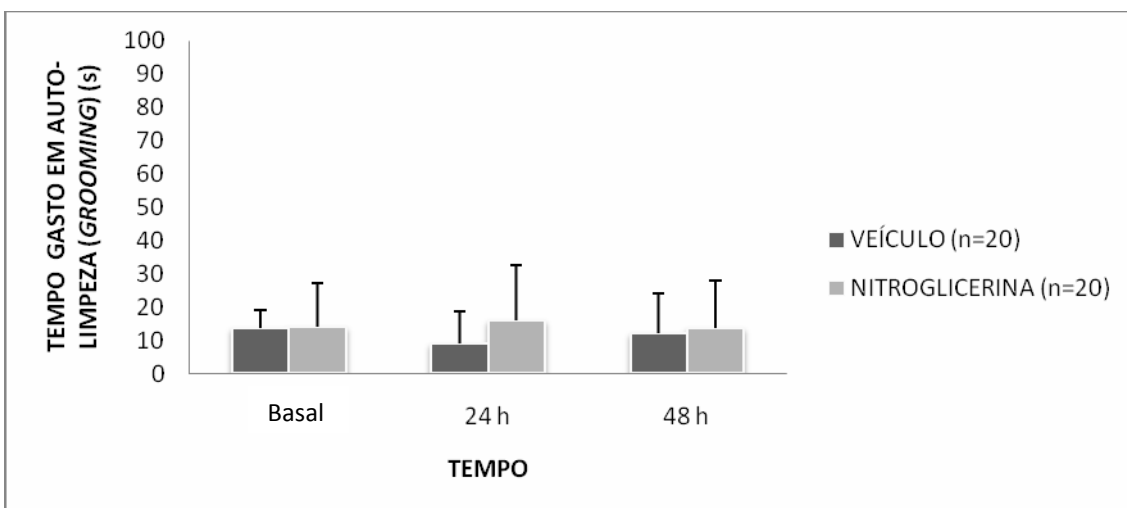


Figura 22. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) no campo aberto, imediatamente antes (basal) e após período mais prolongado de observação (24 h e 48 h), a partir da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo. Dados expressos como média \pm DPM.

Ausência de diferença estatisticamente significativa entre tempos, grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,11$ para tempos, $P=0,74$; $F=1,66$ para grupos, $P=0,21$; $F=0,07$ para a interação tempos x grupos, $P=0,80$).

Nesse experimento, as medidas das latências de retirada da cauda também não se mostraram diferentes entre si (ANOVA de medidas repetidas; $F=3,50$ para tempos, $P=0,07$; $F=1,45$ para grupos, $P=0,24$; $F=0,79$ para a interação tempos x grupos, $P=0,38$) (Figura 23).

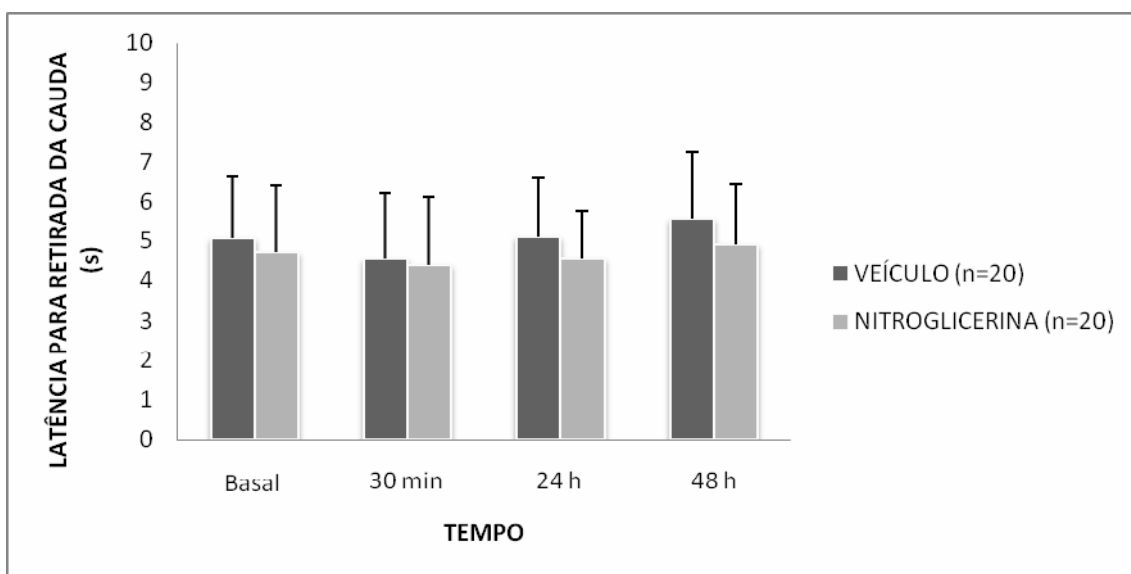


Figura 23. Latência de retirada da cauda (*tail-flick latency*) imediatamente antes (basal), depois de 30 min e após período mais prolongado de observação (24 h e 48 h), a partir da administração intraperitoneal de nitroglicerina a 0,05% (10 mg/kg) ou veículo em ratos. Dados expressos como média \pm DPM.

Ausência de diferença estatisticamente significativa entre tempos, grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=3,50$ para tempos, $P=0,07$; $F=1,45$ para grupos, $P=0,24$; $F=0,79$ para a interação tempos x grupos, $P=0,38$).

EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DO MODELO DE DOR OROFACIAL INDUZIDA PELA FORMALINA ASSOCIADO AO MODELO EXPERIMENTAL DE CEFALÉIA, INDUZIDO PELO USO SISTÊMICO DE NITROGLICERINA – PROPOSIÇÃO COMO MODELO COMPORTAMENTAL DE INTEGRAÇÃO NOCICEPTIVA CENTRAL E PERIFÉRICA DO SISTEMA TRIGEMINAL.

Nos dois primeiros experimentos dessa Dissertação, observou-se que o tempo em que os animais permaneceram realizando o comportamento de *grooming* foi o melhor padrão comportamental relacionado à atividade nociceptiva após estimulação dolorosa na região inervada pelo nervo trigêmeo.

Modelos experimentais com seres humanos demonstraram que compostos nitrosos, como a nitroglicerina, quando utilizados sistemicamente, são capazes de desencadear crises de cefaléia (Olesen *et al.*, 1993; Iversen *et al.*, 1993). Em animais de laboratório, a nitroglicerina é capaz de induzir alterações bioquímicas e histo-fisiológicas, como aumento da expressão de *c-fos* e aumento da atividade de GMPc, porém o padrão comportamental nociceptivo resultante destas alterações tem sido pouco explorado (Torfgard *et al.*, 1989; Torfgard e Ahnler, 1991; Tassorelli e Joseph, 1995a; Tassorelli *et al.*, 2004). No experimento 3 dessa Dissertação, não se observou padrão comportamental diferenciado após a administração de nitroglicerina (na dose estudada) ou veículo, tanto na avaliação de reflexo de auto-limpeza, quanto da latência de retirada da cauda.

Com base nesses dados, delineou-se um quarto experimento, com a finalidade de avaliar os reflexos de auto-limpeza e de retirada da cauda (como medidas de resposta nociceptiva) em novo modelo proposto pelos autores dessa Dissertação para estudo de dores orofaciais e cranianas. O mesmo foi constituído pela associação de um modelo de ativação periférica do sistema trigeminal (dor orofacial induzida pela administração subcutânea de formalina) com outro de ativação sistêmica (pela administração intraperitoneal de nitroglicerina).

Para tal, foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com 200 a 300 g de peso corporal, divididos em seis grupos, conforme descrito a seguir.

Vinte e quatro horas antes do início do experimento, os animais foram pesados e aleatoriamente alocados em cada um dos grupos. Foram, ainda, familiarizados com o aparelho de medida do reflexo de retirada da cauda, conforme descrito em material e métodos.

O procedimento experimental foi dividido em três semanas. No primeiro dia da primeira semana (Dia 1 – início do experimento), foram obtidas as medidas basais dos parâmetros comportamentais em estudo – reflexo de auto-limpeza (*grooming*) e latência de retirada da cauda (*tail- flick latency*). Logo após, foi feita a administração, por via subcutânea (s.c.), de solução de formalina 5% (50 µL) ou solução salina (NaCl 0,9%) (50 µL), no centro do coxim direito das vibrissas. A seguir, foi realizada a administração, por via intraperitoneal (i.p.), de nitroglicerina a 0,05% (5 mg/mL), na dose de 10 mg/kg, ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água). Foram mensuradas, então, as respostas pós-tratamento da primeira semana (Figura 24).

No primeiro dia de cada uma das duas semanas seguintes, correspondendo aos dias 8 e 15 do experimento, os animais receberam, por via intraperitoneal, nitroglicerina ou veículo, de igual modo ao da primeira semana e respeitando os mesmos grupos estabelecidos naquele momento (Figura 21). Obtiveram-se, assim, os grupos experimentais a seguir.

GRUPO 1 – SS – Os animais receberam solução salina, por via s.c., no dia 1 do experimento, e solução salina, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

GRUPO 2 – SV – Os animais receberam solução salina, por via s.c., no dia 1 do experimento, e veículo, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

GRUPO 3 – SN – Os animais receberam solução salina, por via s.c., no dia 1 do experimento, e nitroglicerina, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

GRUPO 4 – FS – Os animais receberam solução de formalina 5%, por via s.c., no dia 1 do experimento, e solução salina, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

GRUPO 5 – FV – Os animais receberam solução de formalina 5%, por via s.c., no dia 1 do experimento, e veículo, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

GRUPO 6 – FN – Os animais receberam solução de formalina a 5%, por via s.c., no dia 1 do experimento, e nitroglicerina, por via i.p., nos dias 1, 8 e 15.

Em todas as três semanas, antes de iniciar o experimento daquele período de tempo, aferiu-se o peso de cada animal, assim como as medidas basais dos reflexos de retirada da cauda e de auto-limpeza.

Para a avaliação da resposta nociceptiva a um estímulo térmico nocivo (*tail-flick*), os animais foram submetidos a medidas do reflexo de retirada da cauda imediatamente antes (basal), 15 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 24 horas e 48 horas após a administração dos tratamentos propostos (Figura 24).

Para a avaliação do comportamento de auto-limpeza (*grooming*), os animais foram colocados para observação em campo aberto por período 5 minutos. Aquele parâmetro foi mensurado imediatamente antes (basal), 15 minutos, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 24 horas e 48 horas após a administração dos tratamentos propostos (Figura 24).

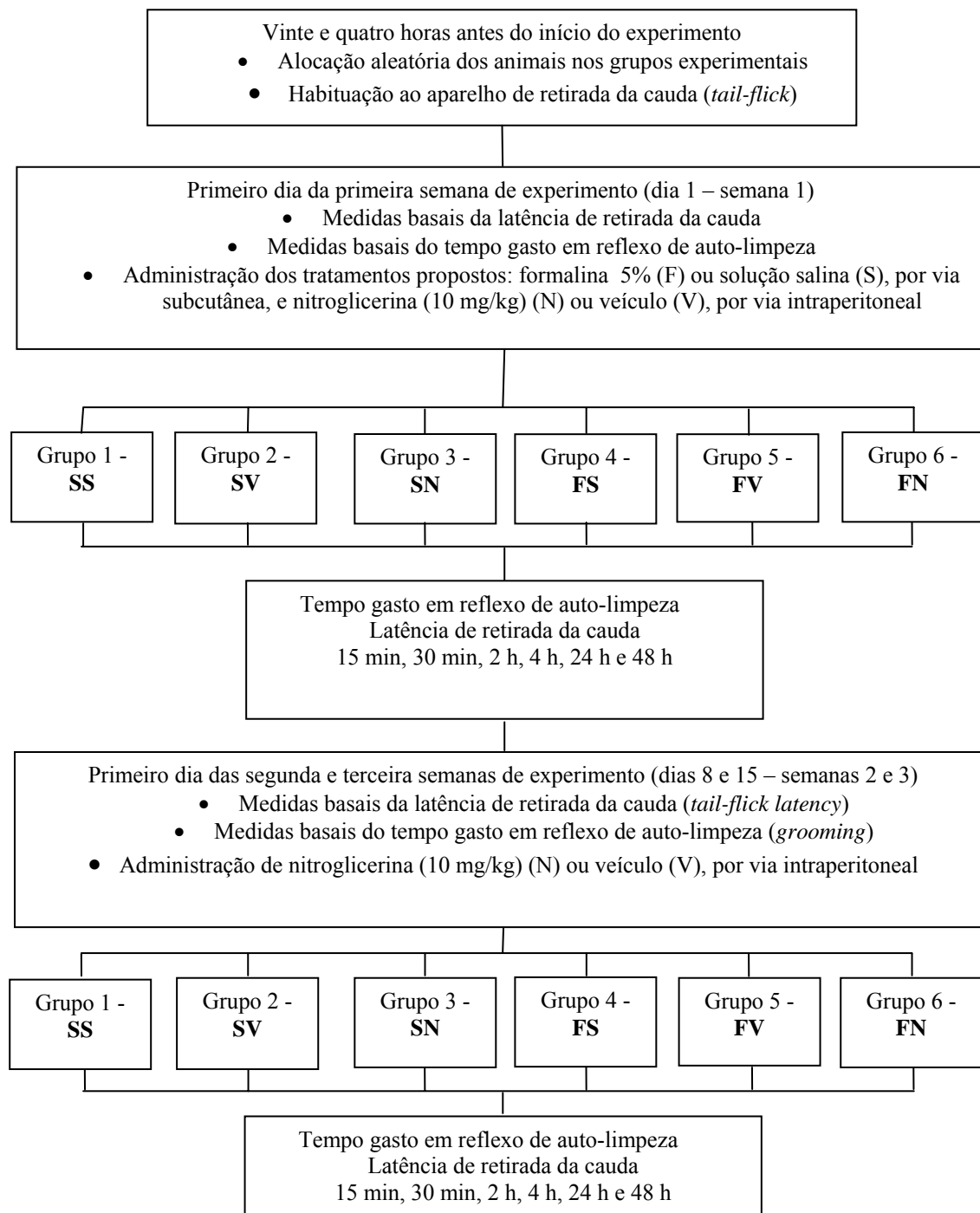


Figura 24. Organização geral do experimento 4. Esquema de administração dos tratamentos propostos e aferição dos parâmetros comportamentais em estudo.

Não foi observada qualquer diferença estatisticamente significativa entre os seis grupos quanto às medidas basais do comportamento de auto-limpeza, na avaliação realizada no primeiro dia da primeira semana de experimento (ANOVA de uma via; $F=0,40$, $P=0,85$).

Idêntico resultado foi observado na avaliação das medidas basais da latência de retirada da cauda no teste de retirada da cauda (ANOVA de uma via; $F=1,38$, $P=0,24$) (Tabela 7).

Tabela 7. Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza e latência de retirada da cauda em campo aberto, imediatamente antes (basal) da administração subcutânea de solução de formalina 5% (50 μ L) ou solução salina (50 μ L) na vibrissa direita e da administração intraperitoneal de nitroglicerina 0,05% (10 mg/mL) ou veículo (30% de etanol, 30% de propilenoglicol, 40% de água), no primeiro dia da primeira semana de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

Grupos	Tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (s) ¹	Latência para retirada da cauda (s) ²
Salina / Salina (n=12)	18,37 \pm 13,79	4,86 \pm 1,18
Salina / Veículo (n=12)	19,60 \pm 11,81	4,95 \pm 1,01
Salina / Nitroglicerina (n=12)	14,30 \pm 14,39	5,80 \pm 2,06
Formalina / Salina (n=12)	17,78 \pm 09,78	5,16 \pm 1,04
Formalina / Veículo (n=16)	15,79 \pm 07,05	4,75 \pm 0,94
Formalina / Nitroglicerina (n=15)	16,91 \pm 05,33	5,59 \pm 1,43

¹ ANOVA de uma via; $F=0,40$, $P=0,85$.

² ANOVA de uma via; $F=1,38$, $P=0,24$.

Na análise das medidas de tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*), obtidas nos períodos basais de cada uma das três semanas de experimento, observou-se a existência de diferenças significativas entre as semanas de tratamento (tempos), mas não entre os grupos ou na interação destes com os tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=9,83$ para os tempos, $P=0,002$; $F=0,73$ para os grupos, $P=0,60$; $F=0,65$ para a interação tempos x grupos, $P=0,66$) (Figura 25).

Os tempos despendidos no comportamento de auto-limpeza, no período basal da segunda e da terceira semanas, mostraram-se similares entre si (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,20$), mas foram significativamente diferentes daqueles observados na primeira semana de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,002$ e $P=0,007$, respectivamente) (Figura 25).

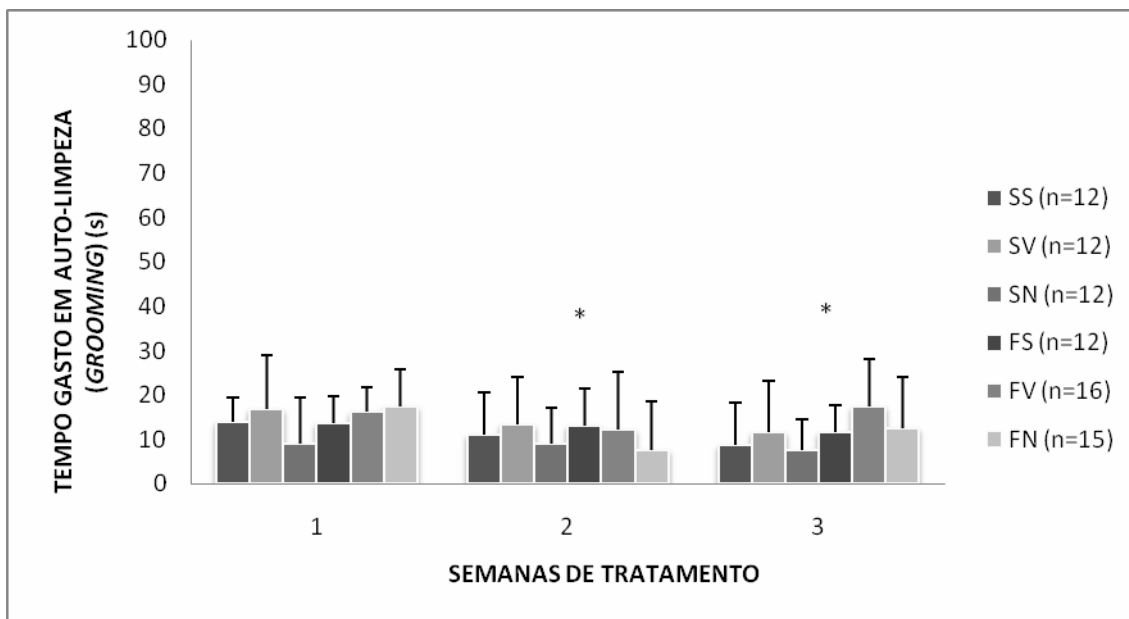


Figura 25. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, nos períodos basais de avaliação, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença estatisticamente significativa na comparação entre as semanas (tempos), mas não entre grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=9,83$ para tempos, $P=0,002$; $F=0,73$ para grupos, $P=0,60$; $F=0,65$ para interação tempos x grupos, $P=0,66$).

*Diferença significativa em relação à primeira semana, independentemente dos grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,007$).

Utilizando-se ANOVA de medidas repetidas para a análise do tempo despendido em comportamento de auto-limpeza, 15 minutos após a administração dos tratamentos estipulados, observaram-se diferenças significativas entre as semanas estudadas (tempos), entre os grupos e na interação entre estes e os tempos ($F=15,82$ para os tempos, $P=0,0001$; $F=4,90$ para os grupos, $P=0,001$; $F=3,43$ para a interação entre tempos e grupos, $P=0,009$) (Figura 26).

Na comparação entre as semanas, independentemente dos grupos testados, houve redução significativa do tempo gasto em auto-limpeza na segunda e na terceira semanas de experimento, em relação à primeira (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,0001$

e $P=0,001$, respectivamente). Não se observou diferença naquele parâmetro comportamental ao se compararem as medidas das segunda e terceira semanas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,10$) (Figura 26).

Na comparação entre os grupos testados, independentemente das semanas de experimento, os animais que receberam formalina, por via subcutânea, e solução salina por via intraperitoneal (Grupo 4 – FS), despenderam mais tempo realizando comportamento de auto-limpeza, em relação àqueles que receberam os seguintes tratamentos: (a) solução salina, por via subcutânea, e veículo, por via intraperitoneal (Grupo 2 – SV) (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,012$); (b) solução salina, por via subcutânea, e nitroglicerina, por via intraperitoneal (Grupo 3 – SN) (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,002$); (c) formalina, por via subcutânea, e nitroglicerina, por via intraperitoneal (Grupo 6 – FN) (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,03$) (Figura 26).

Na comparação no período de 15 minutos da administração, em que se levaram em conta os grupos e as semanas de experimento (interação entre essas duas variáveis), observou-se que, na primeira semana, os animais que receberam formalina, por via subcutânea, e solução salina, por via intraperitoneal (Grupo 4 – FS), despenderam significativamente mais tempo realizando comportamento de auto-limpeza, em relação àqueles alocados em todos os demais grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P \leq 0,02$), exceto os do grupo que recebeu formalina, por via subcutânea, e veículo, por via intraperitoneal (Grupo 5 – FV) (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,06$). Nas segunda e terceira semanas, todos os grupos diferiram significativamente apenas do grupo que recebeu formalina, por via subcutânea, e solução salina, por via intraperitoneal (Grupo 4 – FS) na primeira semana (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,0001$) (Figura 26).

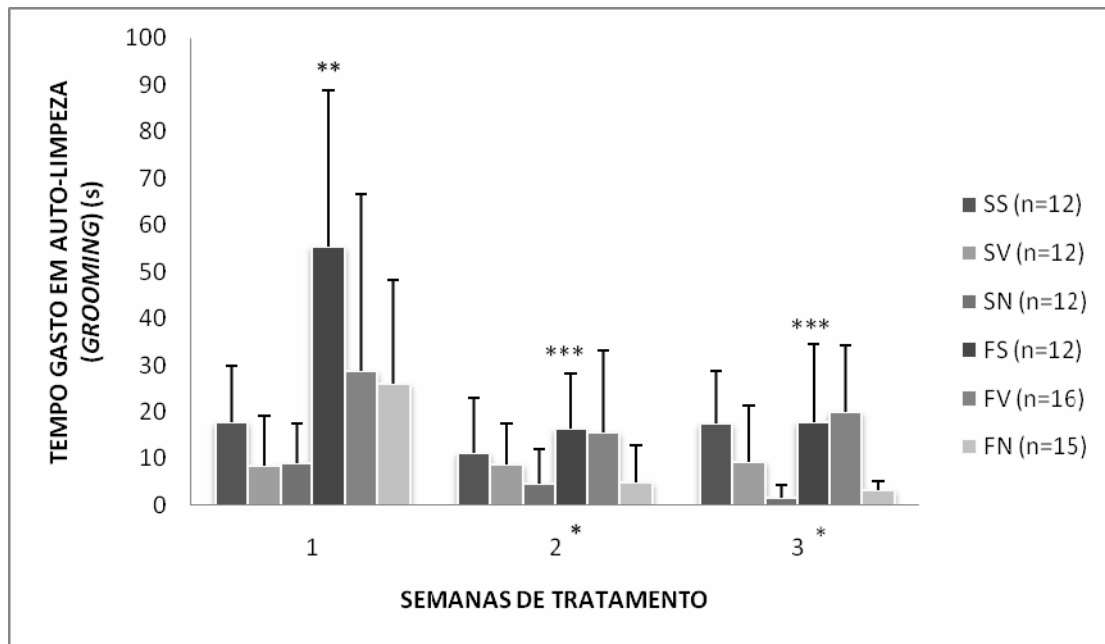


Figura 26. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença estatisticamente significativa na comparação entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=15,82$ para tempos, $P=0,0001$; $F=4,90$ para grupos, $P=0,001$; $F=3,43$ para interação tempos x grupos, $P=0,009$).

*Diferença significativa das 2ª e 3ª semanas em relação à 1ª, independentemente dos grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,001$); diferença significativa de todos os grupos, nas semanas assinaladas, em relação ao grupo FS da 1ª semana de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,0001$).

**Diferença significativa do grupo assinalado (FS) em relação aos grupos SV, SN e FN, independentemente das semanas avaliadas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,03$); diferença significativa daquele grupo (FS) em relação aos grupos SS, SV, SN e FN, na 1ª semana do experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,02$).

***Diferença significativa do grupo assinalado (FS) em relação aos grupos SV, SN e FN, independentemente das semanas avaliadas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,03$).

A análise do tempo gasto no comportamento de auto-limpeza, no período de 30 minutos da administração, mostrou diferença significativa entre os grupos, mas não entre as semanas de experimento (tempos) ou na interação entre os tempos e os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,34$ para os tempos, $P=0,56$; $F=2,99$ para os grupos, $P=0,02$; $F=2,01$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,09$). Independentemente da semana avaliada, o

grupo que recebeu salina, por via subcutânea, e nitroglicerina, por via intraperitoneal (Grupo 3 – SN), diferiu daquele que recebeu formalina, por via subcutânea, e veículo, por via intraperitoneal (Grupo 5 – FV) (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,043$), embora essa diferença não apresente significado biológico de interesse (Figura 27).

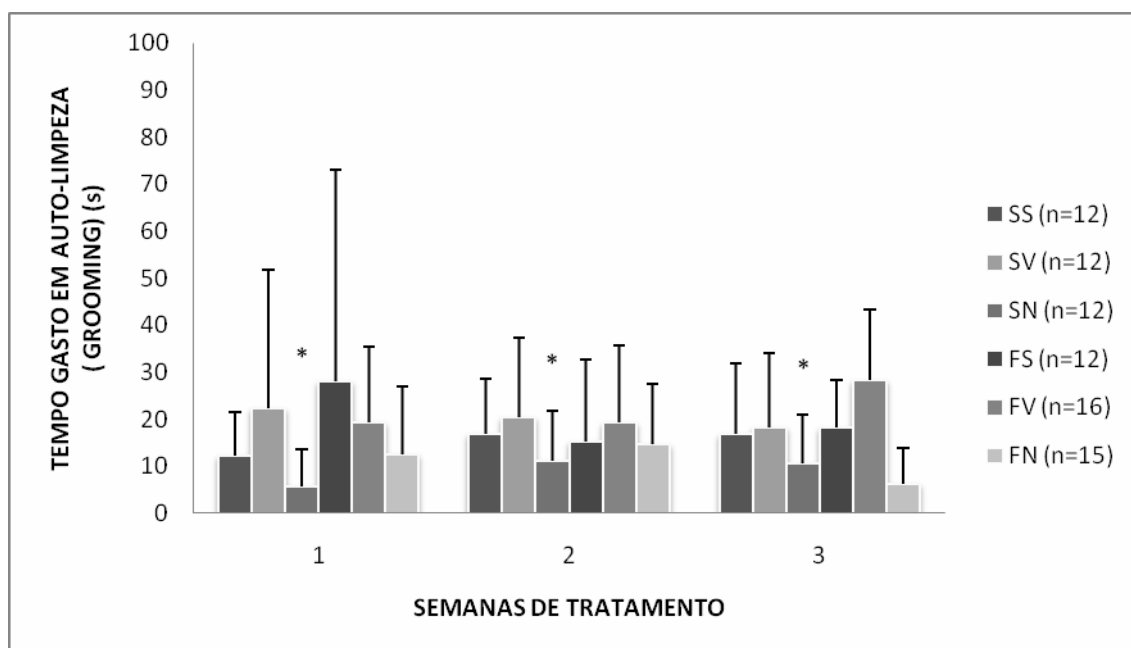


Figura 27. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 30 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença estatisticamente significativa entre grupos, mas não entre semanas (tempos) ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,34$ para tempos, $P=0,56$; $F=2,99$ para grupos, $P=0,02$; $F=2,01$ para interação tempos x grupos, $P=0,09$).

*Diferença significativa do grupo assinalado (SN) em relação ao grupo FV, independentemente da semana de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,043$).

Na análise do comportamento de auto-limpeza após 120 minutos da administração dos tratamentos propostos, não se observaram diferenças entre os grupos, semanas de experimento (tempos) ou na interação entre grupos e tempos (ANOVA de medidas repetidas;

F=0,62 para os tempos, $P=0,44$; F= 0,75 para os grupos, $P=0,59$; F=1,13 para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,35$) (Figura 28).

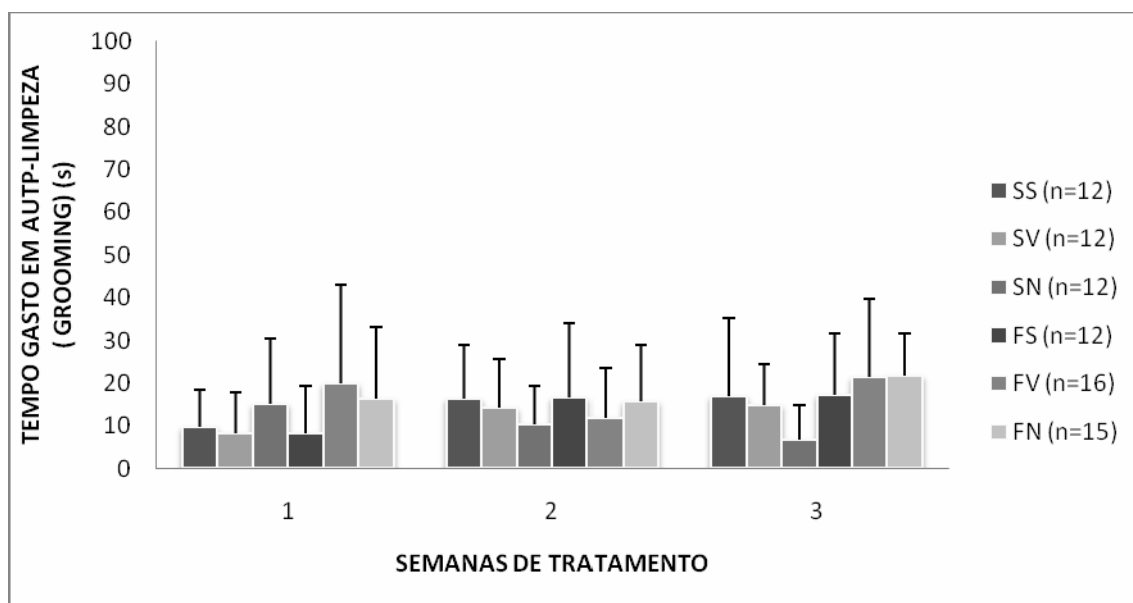


Figura 28. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 120 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferenças significativas entre grupos, semanas (tempos) e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; F=0,62 para os tempos, $P=0,44$; F= 0,75 para os grupos, $P=0,59$; F=1,13 para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,35$).

Na observação realizada 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, não se verificam diferenças significativas no comportamento de auto-limpeza ao se avaliarem os grupos, as semanas de experimento (tempos) e a interação entre os tempos e os grupos (ANOVA de medidas repetidas; F=0,68 para os tempos, $P=0,41$; F=1,33 para os grupos, $P=0,26$; F=0,92 para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,48$) (Figura 29).

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, observaram-se diferenças significativas entre as semanas de experimento (tempos), mas não entre os grupos ou na interação entre os grupos e os tempos, na avaliação do comportamento de *grooming* após 24 horas da administração dos tratamentos propostos ($F=5,91$ para os tempos, $P=0,02$; $F=0,87$ para os grupos, $P=0,51$; $F=0,68$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,64$). Independentemente dos grupos estudados, os animais despenderam tempos significativamente diferentes realizando reflexo de auto-limpeza ao se compararem as segunda e terceira semanas de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,001$). Aquele parâmetro apresentou padrão similar ao se comparar a primeira semana com cada uma das semanas seguintes (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,05$ e $P=1,0$, respectivamente) (Figura 30).

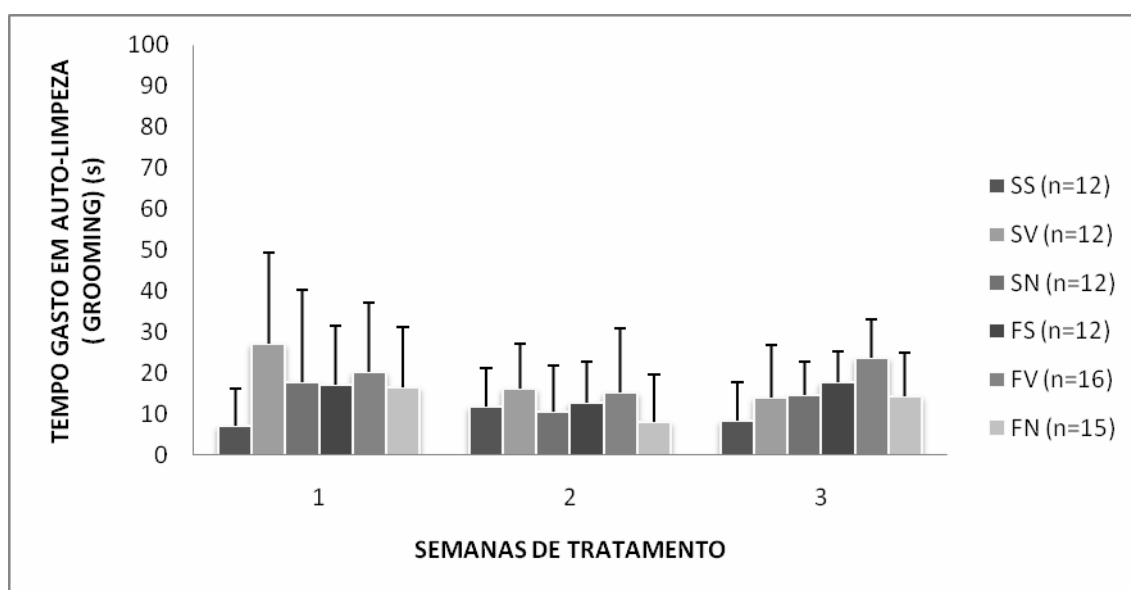


Figura 29. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferenças significativas entre grupos, semanas (tempos) e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,68$ para tempos, $P=0,41$; $F=1,33$ para grupos, $P=0,26$; $F=0,92$ para interação tempos x grupos, $P=0,48$).

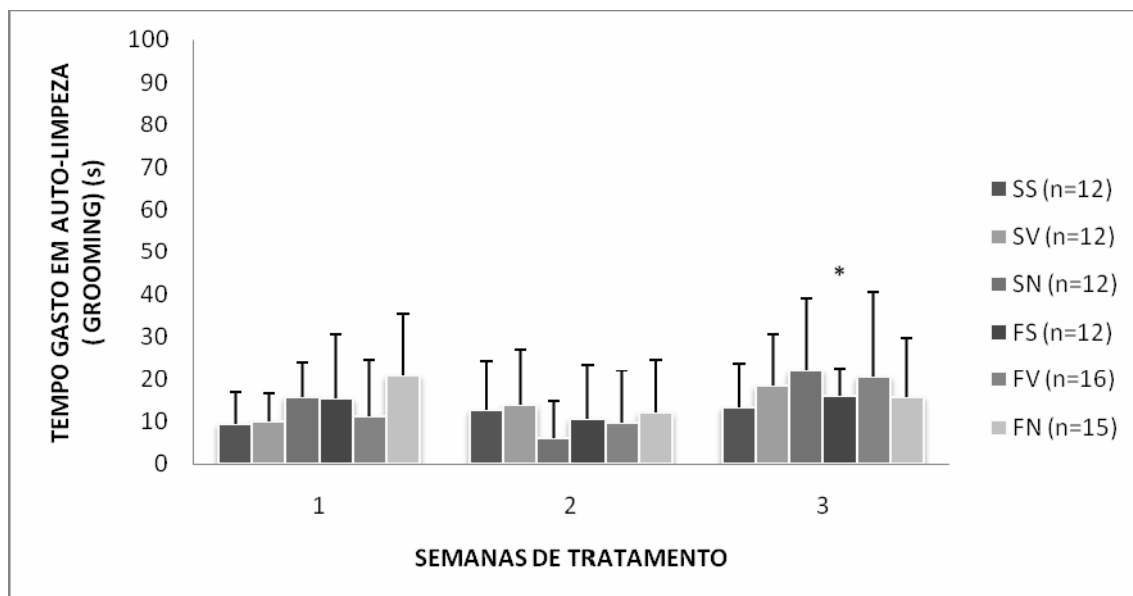


Figura 30. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 24 horas após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença estatisticamente significativa na comparação entre semanas (tempos), mas não entre grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=5,91$ para tempos, $P=0,02$; $F=0,87$ para grupos, $P=0,51$; $F=0,68$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,64$).

*Diferença significativa em relação à segunda semana de experimento, independentemente dos grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,001$).

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, observaram-se diferenças significativas entre as semanas de experimento (tempos), mas não entre os grupos ou na interação entre os grupos e os tempos, na avaliação do comportamento de auto-limpeza após 48 horas da administração dos tratamentos propostos ($F=7,13$ para os tempos, $P=0,009$; $F=1,48$ para os grupos, $P=0,21$; $F=0,89$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,50$). Independentemente dos grupos estudados, os animais despenderam tempos significativamente diferentes realizando reflexo de auto-limpeza ao se compararem as primeira e terceira semanas de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,028$). Aquele parâmetro apresentou padrão similar ao se comparar a segunda semana com

cada uma das outras duas semanas (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,55$ para a primeira semana; $P=0,82$ para a terceira semana) (Figura 31).

Foi realizada a análise das latências do reflexo de retirada da cauda em resposta a estímulo térmico nocivo (*tail-flick*) de modo similar ao que foi feito para o comportamento de auto-limpeza (Figura 24).

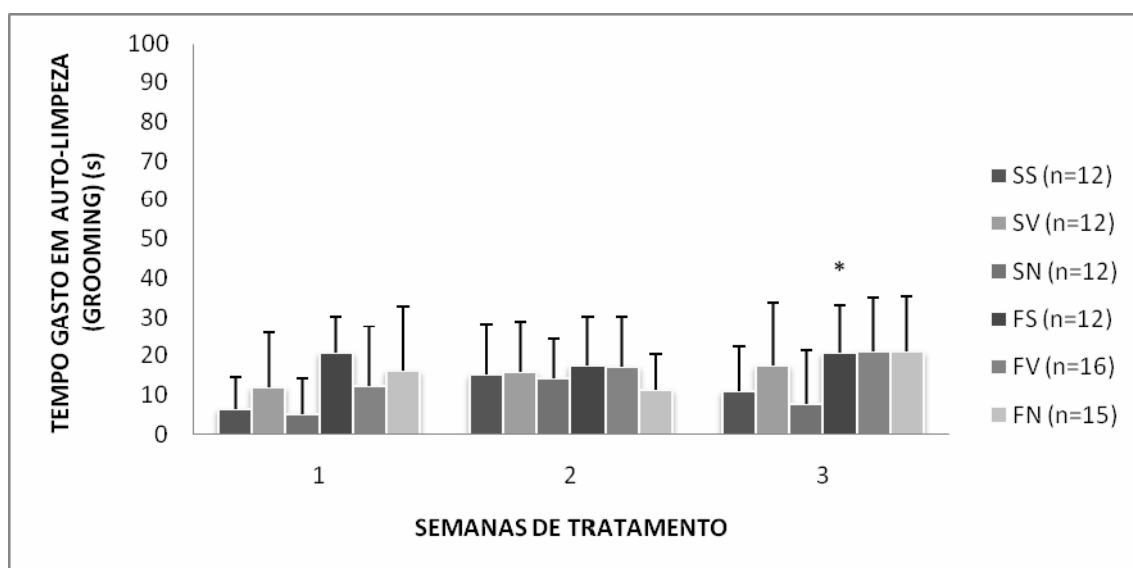


Figura 31. Tempo gasto em comportamento de auto-limpeza (*grooming*) em campo aberto, 48 horas após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença estatisticamente significativa na comparação entre semanas (tempos), mas não entre grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=7,13$ para tempos, $P=0,009$; $F=1,48$ para grupos, $P=0,21$; $F=0,89$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,50$).

*Diferença significativa em relação à primeira semana de experimento, independentemente dos grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,03$).

Na avaliação do reflexo de retirada da cauda, não se observaram diferenças significativas entre as semanas de tratamento (tempos), entre os grupos ou na interação dessas duas variáveis, para as medidas obtidas nos períodos basal (ANOVA de medidas repetidas; $F=2,59$ para os tempos, $P=0,11$; $F=0,74$ para os grupos, $P=0,59$; $F=0,43$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,83$), 15 minutos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,12$ para os tempos, $P=0,30$; $F=1,16$ para os grupos, $P=0,34$; $F=1,67$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,16$) e 30 minutos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,46$ para os tempos, $P=0,23$; $F=0,88$ para os grupos, $P=0,50$; $F=1,38$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,24$) após a administração dos tratamentos propostos (Figuras 32 a 34).

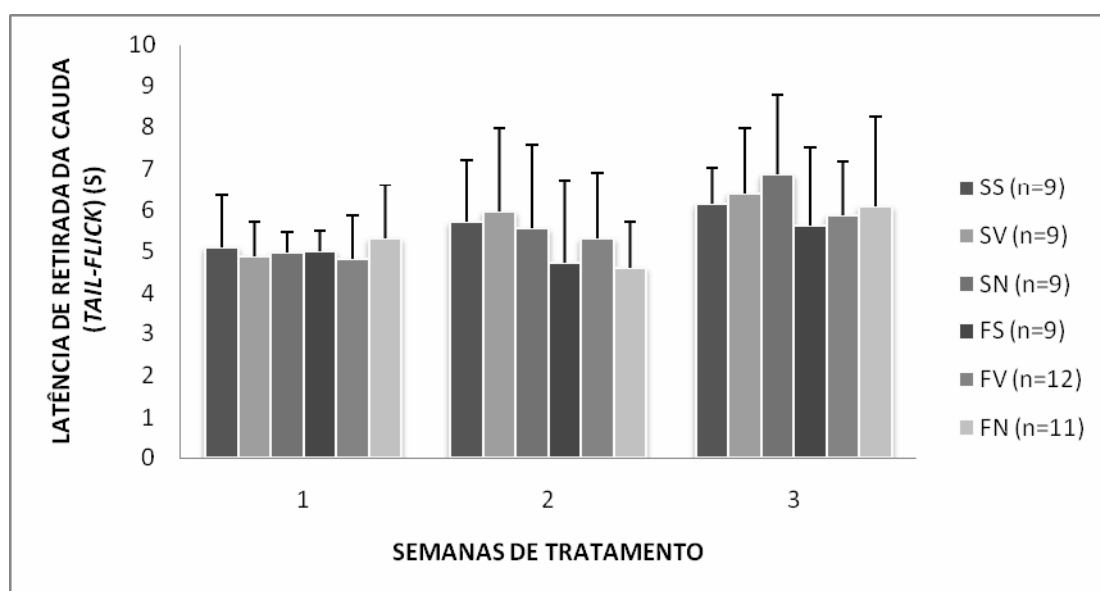


Figura 32. Latência de retirada da cauda (*tail-flick*) no período prévio à administração dos tratamentos propostos (basal), durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=2,59$ para tempos, $P=0,11$; $F=0,74$ para grupos, $P=0,59$; $F=0,43$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,83$).

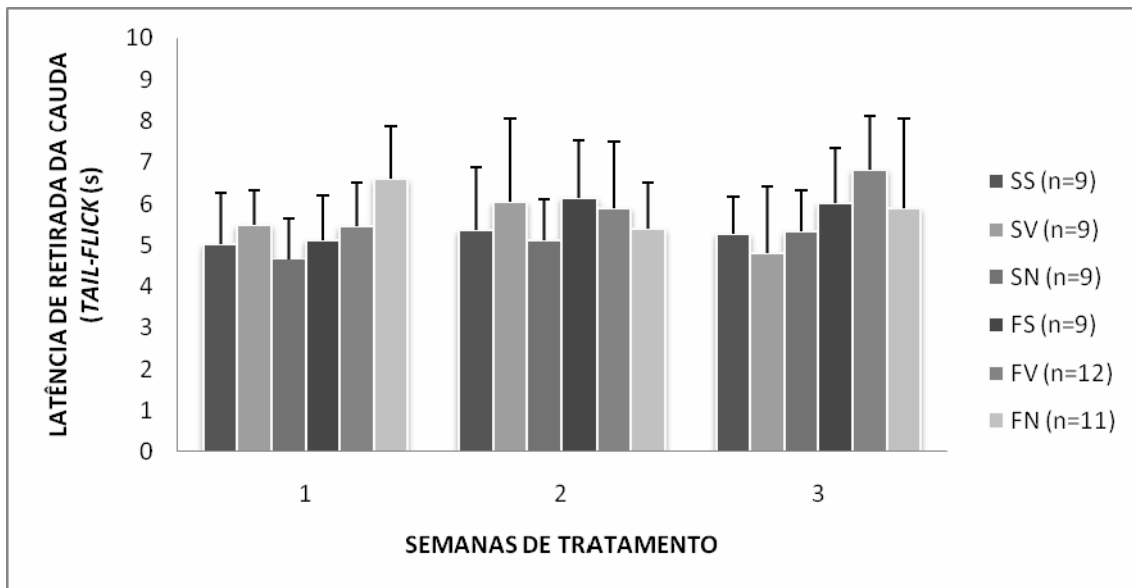


Figura 33. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,12$ para tempos, $P=0,30$; $F=1,16$ para grupos, $P=0,34$; $F=1,67$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,16$).

Na avaliação das latências de retirada da cauda obtidas após 120 minutos da administração dos tratamentos propostos, constataram-se diferenças significativas entre as semanas do experimento (tempos), mas não entre os grupos ou na interação entre os tempos e os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=12,16$ para os tempos, $P=0,001$; $F=1,31$ para os grupos, $P=0,08$; $F=0,77$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,57$). Observou-se aumento significativo das latências de *tail-flick* nas segunda e terceira semanas, em relação às obtidas na primeira semana (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P=0,04$ e $P<0,01$, respectivamente) (Figura 35).

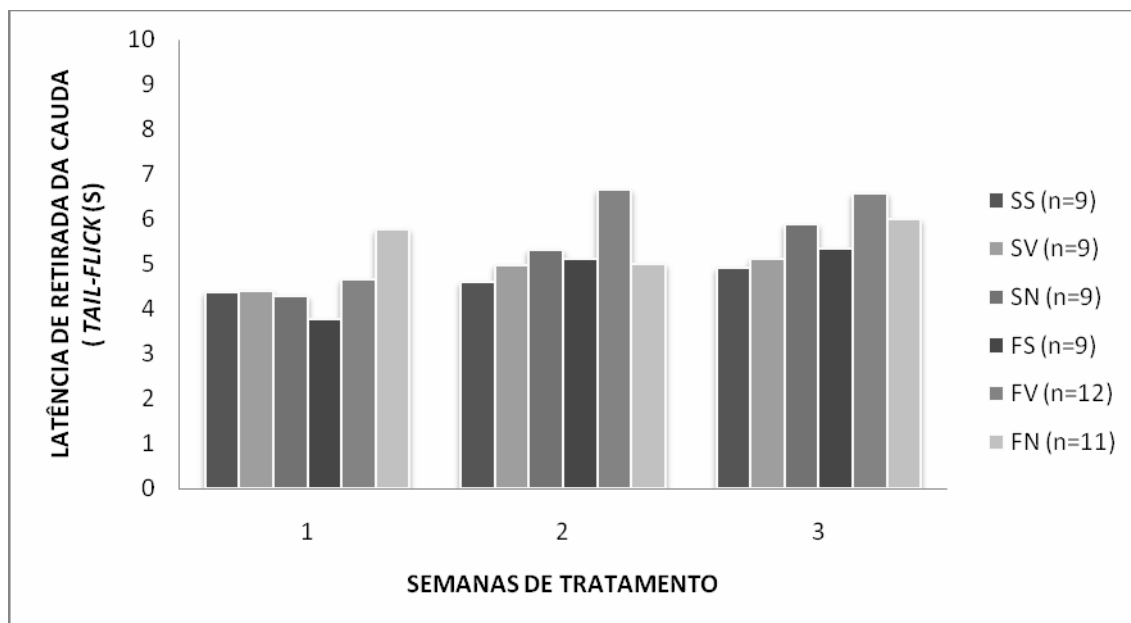


Figura 34. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 30 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,46$ para tempos, $P=0,23$; $F=0,88$ para grupos, $P=0,50$; $F=1,38$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,24$).

Na avaliação das medidas do reflexo de retirada da cauda, não se observaram diferenças significativas entre as semanas de tratamento (tempos), entre os grupos ou na interação dessas duas variáveis, para as medidas obtidas 240 minutos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,87$ para os tempos, $P=0,18$; $F=0,60$ para os grupos, $P=0,70$; $F=1,02$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,41$), 24 horas (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,29$ para os tempos, $P=0,59$; $F=0,22$ para os grupos, $P=0,95$; $F=0,48$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,79$) e 48 horas (ANOVA de medidas repetidas; $F=3,67$ para os tempos, $P=0,06$; $F=0,86$ para os grupos, $P=0,51$; $F=0,60$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,70$) após a administração dos tratamentos propostos (Figuras 36 a 38).

A análise do peso corporal dos animais nesse experimento demonstrou a existência de diferenças significativas entre os tempos e na interação entre os tempos e os grupos. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=31,80$ para os tempos, $P=0,001$; $F=7,08$ para os grupos, $P=0,001$; $F=1,17$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,33$). No decorrer do experimento, constatou-se que os animais aumentaram gradualmente de peso corporal, de maneira independente do tratamento instituído. Na terceira semana, os animais apresentaram-se mais pesados do que na primeira semana e na segunda semana de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,01$ e $P=0,01$, respectivamente) (Figura 39).

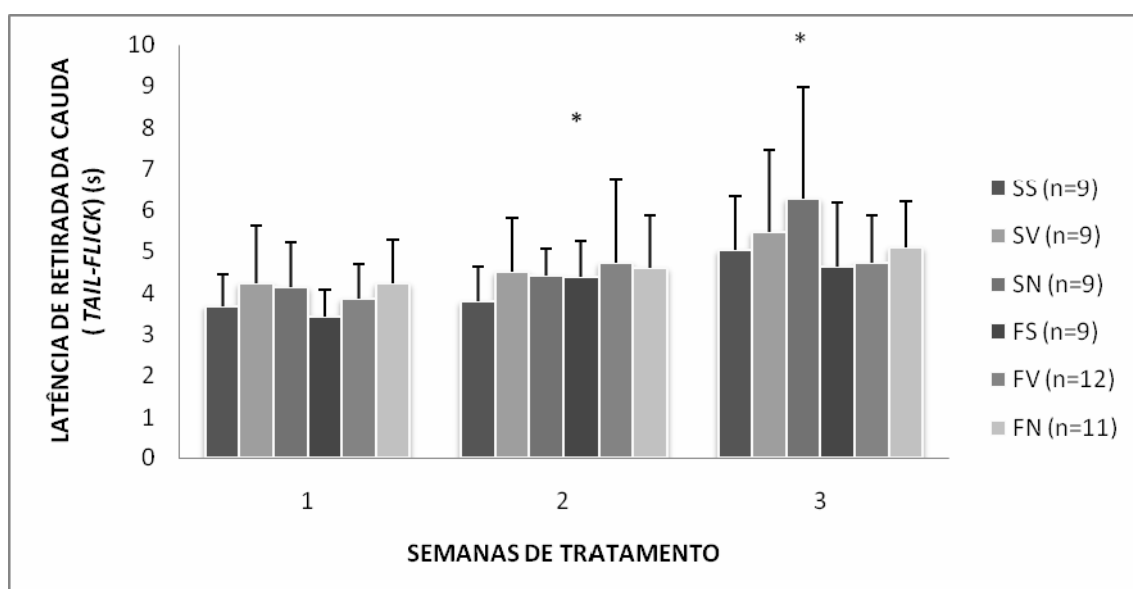


Figura 35. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 120 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença significativa entre semanas (tempos), mas não entre grupos ou na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=12,16$ para tempos, $P=0,001$; $F=1,31$ para grupos, $P=0,08$; $F=0,77$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,57$).

*Diferença significativa em relação à primeira semana de experimento, independentemente dos grupos estudados (teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P \leq 0,04$).

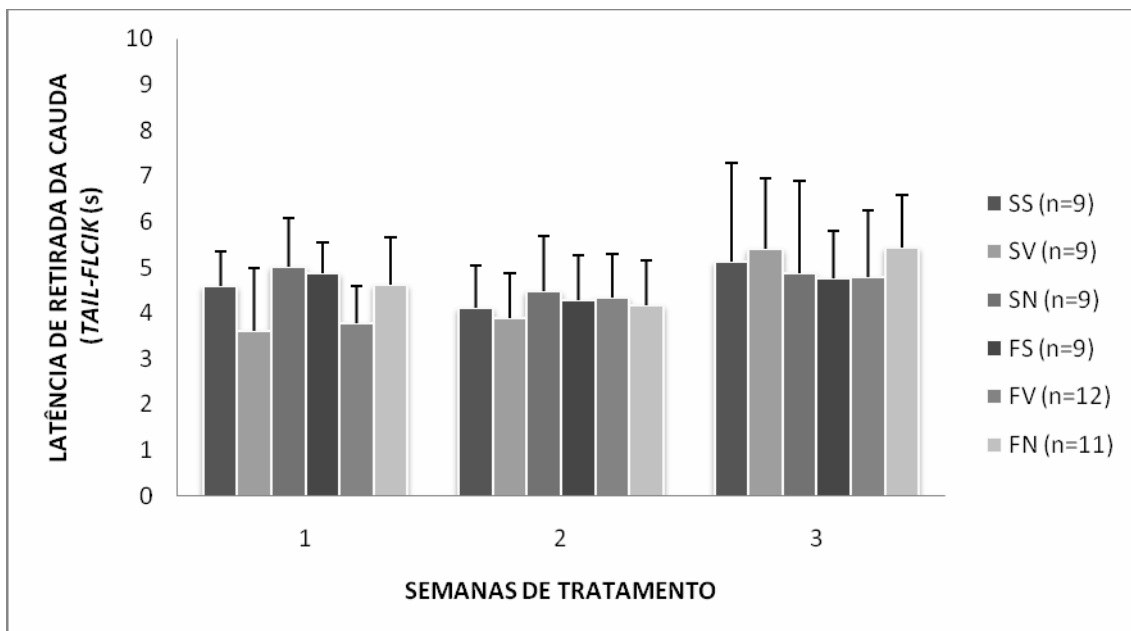


Figura 36. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=1,87$ para os tempos, $P=0,18$; $F=0,60$ para os grupos, $P=0,70$; $F=1,02$ para a interação entre os tempos e os grupos, $P=0,41$).

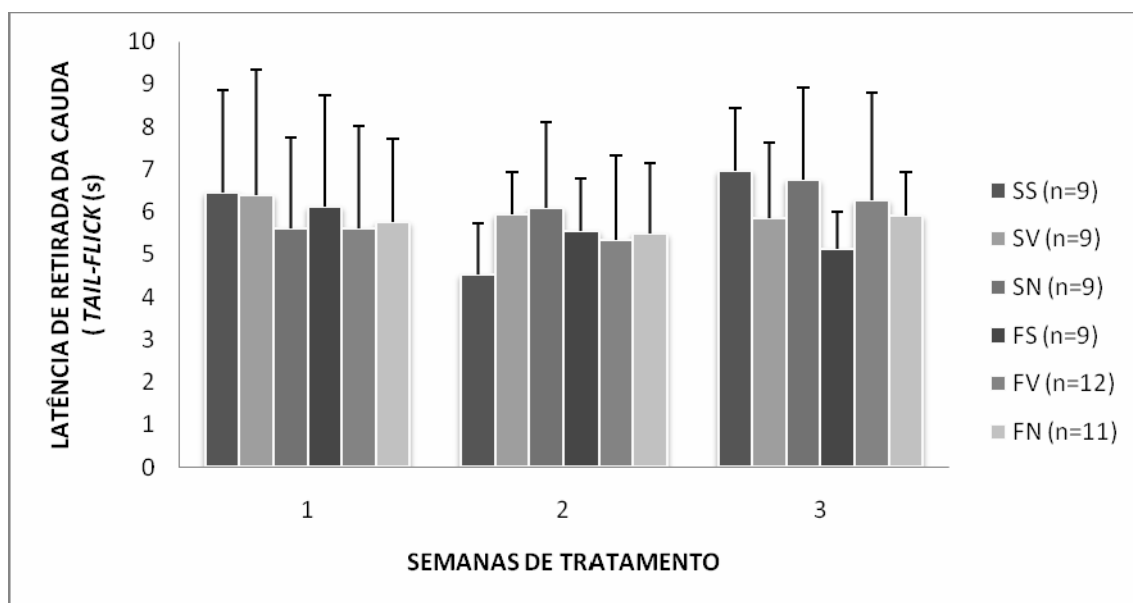


Figura 37. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 24 h após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=0,29$ para tempos, $P=0,59$; $F=0,22$ para grupos, $P=0,95$; $F=0,48$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,79$).

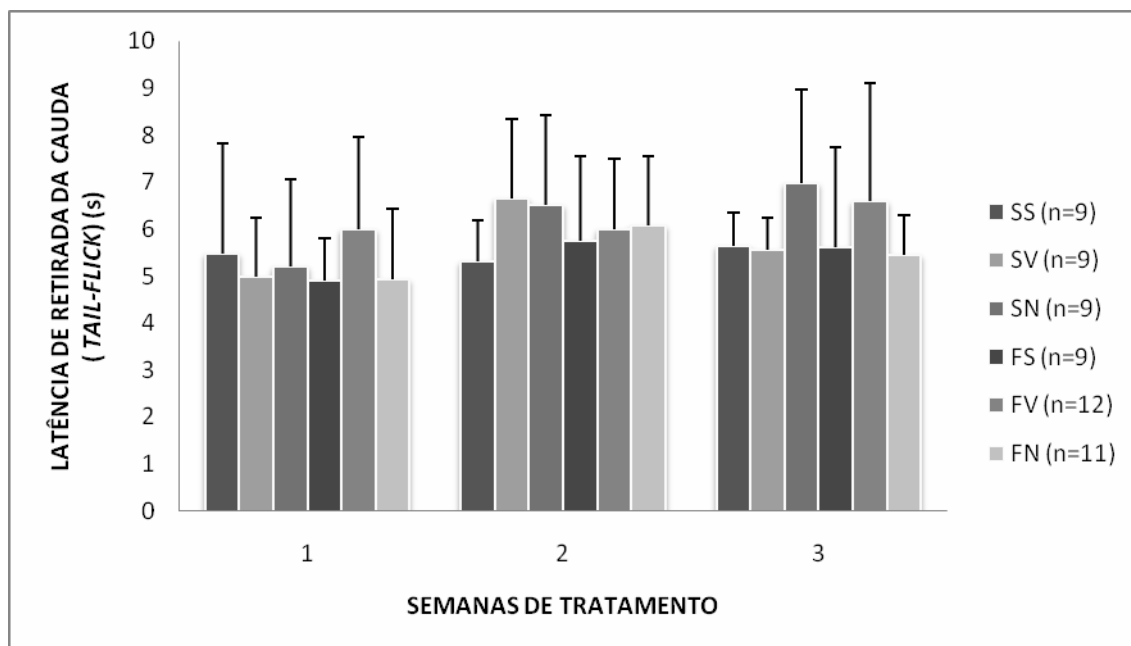


Figura 38. Latências de retirada da cauda (*tail-flick*) obtidas 48 h após a administração dos tratamentos propostos, durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Ausência de diferença significativa entre semanas (tempos), grupos e na interação grupos x tempos (ANOVA de medidas repetidas; $F=3,67$ para tempos, $P=0,06$; $F=0,86$ para grupos, $P=0,51$; $F=0,60$ para interação entre tempos x grupos, $P=0,70$).

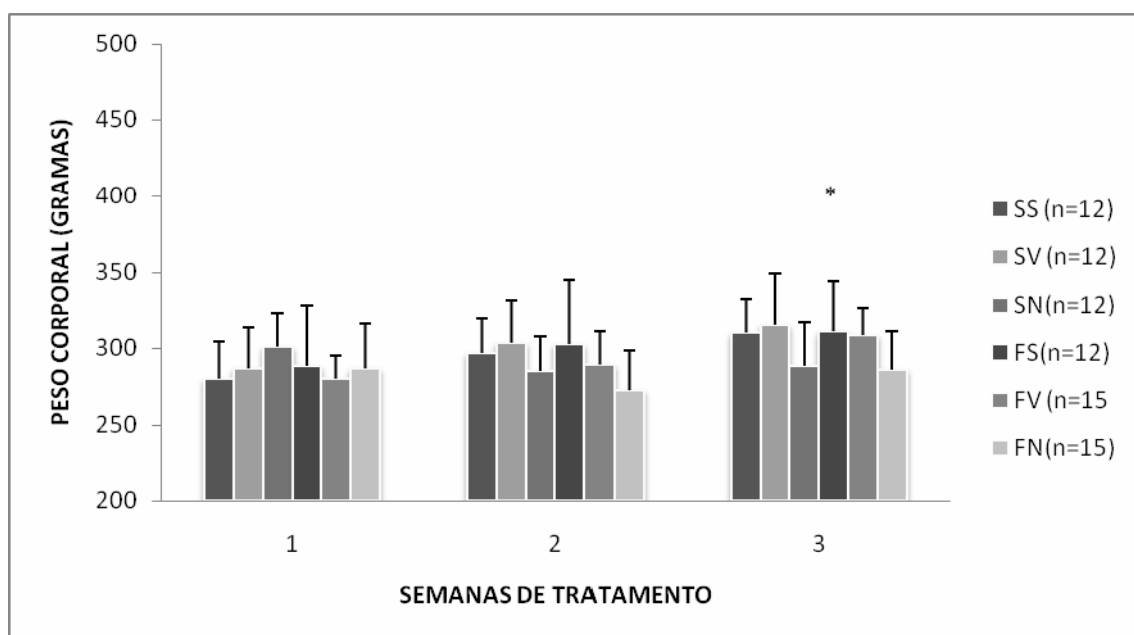


Figura 39. Peso corporal dos animais durante as três semanas de experimento. Dados expressos como média \pm DPM.

SS: Salina, via s.c., no dia 1 do experimento (D1), e salina, via i.p., nos dias 1, 8 e 15 (D1, D8 e D15). **SV:** Salina, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **SN:** Salina, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FS:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e salina, via i.p., em D1, D8 e D15. **FV:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e veículo, via i.p., em D1, D8 e D15. **FN:** Formalina 5%, via s.c., em D1, e nitroglicerina, via i.p., em D1, D8 e D15.

Diferença significativa entre semanas de tratamento (tempos) e na interação tempos x grupos, mas não entre grupos (ANOVA de medidas repetidas; $F=31,80$ para tempos, $P=0,001$; $F=7,08$ para grupos, $P=0,001$; $F=1,17$ para interação entre tempos e grupos, $P=0,33$).

*Diferença significativa em relação a 1ª e 2ª semanas de experimento (teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $P=0,01$ e $P=0,01$, respectivamente).

Discussão

Há várias teorias relacionadas à fisiopatogenia das dores cranianas, principalmente em relação às cefaléias com importante envolvimento vascular, como a enxaqueca. Todavia, existe consenso de que, nas dores cefálicas, há um envolvimento dos vasos cerebrais, de modo que a informação nociceptiva vinculadas a eles é transmitida ao Sistema Nervoso Central (SNC) através de fibras nervosas sensoriais do nervo trigêmeo, por meio de neurotransmissores (Moskowitz, 1984).

As cefaléias com componente vascular podem ser consideradas como uma alteração neurobiológica que reflete distúrbios na interação entre o nervo trigêmeo e o órgão-alvo, que seria o vaso sanguíneo cerebral (Moskowitz, 1984). As fibras trigeminais fazem parte de uma intrincada rede de comunicação que se projeta ao encéfalo. Estão situadas na interface entre a circulação sanguínea e o SNC, envolvendo o vaso e estando em íntimo contato com as três camadas vasculares. Ativação neural libera neurotransmissores vasoativos de seus processos aferentes, que determinam alterações inflamatórias perivasculares. Após algum tempo, resposta nociceptiva é transmitida ao SNC por meio de diversas vias nociceptivas e núcleos (Figuras 4,40) (Moskowitz, 1984; Goadsby *et al.*; 2002).

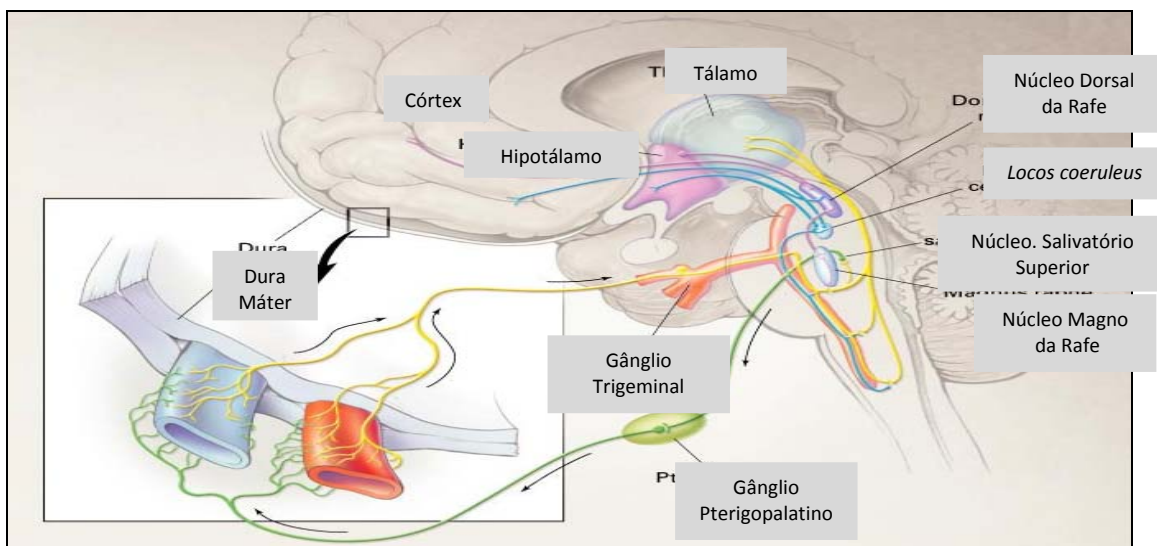


Figura 40. Ativação do Sistema Trigemino durante episódio de dor de cabeça e seu envolvimento com núcleos Talâmicos, Hipotalâmicos, do Tronco e Sistema Nervoso Vegetativo (Parassimpático)(Modificado de Goadsby *et al.*; 2002).

Modelos experimentais de nocicepção são fundamentais para o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento, pela manutenção e, por vezes, pela perpetuação da experiência dolorosa humana. Em sua maioria, estão baseados em respostas nociceptivas passíveis de serem reproduzidas, sendo que vários aspectos do comportamento animal podem ser estudados.

Entre os modelos nociceptivos para o estudo das dores orofaciais e cefaléias, talvez os mais estudados sejam aqueles que enfocam os mecanismos envolvidos na teoria da inflamação neurogênica e vascular, principalmente os modelos de ativação do sistema trigeminovascular. Esta ativação pode estabelecer-se por meio de estimulação de ramos periféricos do nervo trigêmeo, que, através do reflexo axonal, reproduz o processo fisiopatogênico das cefaléias vasculares (Moskowitz, 1984). Outra forma de ativação seria a sistêmica, em que uma substância vasoativa, administrada sistemicamente, pode desencadear dores de cabeça. Dentre esses fármacos, talvez o mais relevante sejam os compostos nitrosos. É de domínio científico, desde o século XIX, que um dos principais efeitos adversos daqueles compostos é o desencadeamento de cefaléia de padrão vascular: dor pulsátil, de média a forte intensidade, com agravamentos por atividades de vida diárias e, às vezes, com sintomatologia vegetativa associada (Marsh e Marsh, 2000). Estudos prévios sugerem que administração sistêmica de nitroglicerina ou histamina pode desencadear crises de cefaléia em pacientes enxaquecosos, mais freqüentemente do que em normais (Krabbe e Olesen, 1980; Sicuteri *et al.*, 1987; Olesen e Thomsen, 1993; Lars e Olesen, 2001). Em estudos com animais, compostos nitrosos, como trinitrato de glicerina (nitroglicerina), também são utilizados em modelos experimentais de dores cefálicas (Tassoreli *et al.*, 2003; Bergerot *et al.*, 2006). Nestes modelos, quando se avaliam parâmetros nociceptivos, na maioria das vezes, utiliza-se a medida da latência de retirada da cauda (Costa *et al.*, 2005). Porém, pouca relevância é dada a outros parâmetros comportamentais, como o reflexo de auto-limpeza.

A administração subcutânea de formalina na região orofacial é um método conveniente para a avaliação da nocicepção na região inervada pelo nervo trigêmeo e, possivelmente, para o estudo das cefaléias. Aquela administração determina uma primeira fase aguda de nocicepção, com duração de 1 a 5 minutos. A esta se segue um período (5 a 15 minutos após a injeção) em que o animal não apresenta comportamento nociceptivo. É a chamada fase silente. Na última etapa, denominada de fase tônica, ocorre reação inflamatória no tecido periférico, caracterizada por intensa atividade nociceptiva, que perdura por aproximadamente 20 a 60 minutos (Dickenson e Sullivan, 1987; Clavelou *et al.*, 1989; Pacák e Palkovits, 2001). Nesta fase, ocorre liberação de diferentes substâncias mediadoras de dor e sensibilização central de vias nociceptivas (Tølsen *et al.*, 1922).

A administração de formalina determina lesão tecidual dependente da concentração empregada, ativação de nociceptores periféricos e ativação de fibras A δ e C, que são as principais fibras efetoras da via primária nociceptiva trigeminal (Raboisson e Dallel, 2003). Ortodromicamente, a ativação de nociceptores sensibiliza o primeiro neurônio da via (localizado no gânglio de Gasser) e, conseqüentemente, o núcleo trigeminal caudal e as estruturas nociceptivas superiores, por meio do trato trigeminotalâmico (Pacák e Palkovits, 2001; Messlinger, 2006) (Figuras 1, 4, 41). Esta ativação também determina a ocorrência do reflexo trigeminovascular, que, por meio de transmissão antidrômica, estimula a liberação de substâncias vasodilatadoras e pró-inflamatórias. Esse fenômeno não só seria responsável pelo desencadeamento de dor, como também por sua perpetuação (Bayliss, 1901; Moskowitz, 1984; Uddman, 1989; Vincent, 1998; May e Goadsby, 1999; Durnett e Vasko, 2002; Pietrobon, 2003; Edvinsson, 2005).

Partindo-se do pressuposto de que estímulo elétrico, químico ou imunológico aplicado em um nervo sensitivo possa desencadear processo inflamatório neurogênico (Bayliss, 1901; Durnett e Vasko, 2002; Lizasoain e Leira, 2003; Bergerot *et al.*, 2006), o modelo de dor orofacial induzido por formalina, administrada por via subcutânea, ao ativar aferências

trigeminais, teoricamente também pode funcionar como modelo neurovascular de ativação periférica do sistema trigeminovascular (figuras 4 e 40).

Estudos nociceptivos orofaciais, comumente baseados na administração de formalina, por via subcutânea, raramente avaliam outros parâmetros comportamentais que não o reflexo de auto-limpeza (*grooming*) ipsilateral à lesão e a observação em campo aberto para aferição dos mesmos (Anderson *et al.*, 2003; Cadet *et al.*, 1995; Clavelou *et al.*, 1995; Eisenberg *et al.*, 1993; Eisenberg *et al.*, 1996; Gilbert *et al.*, 2001; Pelissier *et al.*, 2002; Raboisson e Dallel, 2004; Roveroni *et al.*, 2001; Vos *et al.*, 1998). Parâmetros comportamentais relacionados ao modelo nociceptivo orofacial com formalina são pouco explorados. Neste modelo, segundo Anderson e colaboradores (2003), o tempo gasto pelo animal no comportamento de *grooming* seria uma das respostas comportamentais mais representativas de disestesia grave.

Assim, nos primeiro e segundo experimentos dessa Dissertação, procuraram-se avaliar parâmetros comportamentais e nociceptivos relacionados à ativação periférica do sistema trigeminal, por meio da utilização do modelo de dor orofacial induzida pela administração subcutânea de formalina. Além do comportamento de auto-limpeza, foram analisadas locomoção (por meio do número de cruzamentos ou *crossings*, em inglês) e atividade exploratória (por meio do número de respostas de orientação ou *rearings*, em inglês), em campo aberto. Supôs-se que a nocicepção desencadeada pela administração de formalina poderia repercutir sobre tais parâmetros, levando à eventual redução de cruzamentos e respostas de orientação. Nesse caso, os mesmos poderiam servir como medidas indiretas de nocicepção.

Na avaliação dos parâmetros comportamentais explorados, observou-se, no campo aberto, que os animais que receberam formalina apresentaram número de cruzamentos similar aos do grupo controle (Figura 13), ou seja, esse parâmetro não se mostrou sensível à administração do agente irritante. Paralelamente, observou-se rápida e precoce redução dos cruzamentos, independentemente do tratamento, em todos os tempos de observação

propostos, em comparação com as medidas basais. Tal redução iniciou imediatamente após a administração das soluções estudadas e manteve-se por pelo menos 24 horas, sendo mais acentuada aos 15 minutos. Na figura 13, vê-se uma curva em U, em que as medidas daquele parâmetro em 0 minuto e 24 horas não diferem entre si, mas o fazem daquelas obtidas aos 15 minutos. Este último período corresponde exatamente ao momento em que os animais que receberam formalina, por via subcutânea, despenderam mais tempo no comportamento de auto-limpeza. Isso poderia justificar a maior redução de cruzamentos. No entanto, tal efeito foi observado também no grupo controle e se manteve por tempo superior ao do efeito sobre o comportamento de *grooming* (pelo menos 24 horas *versus* 15 minutos, respectivamente). Sugere-se que esse seja um efeito relacionado à manipulação dos animais durante a realização do estudo. Como ocorreu independentemente do grupo experimental, isso sugere que não se trata de resposta nociceptiva específica à formalina. Ambos os grupos seguem o mesmo padrão comportamental ao longo do tempo. Idêntico raciocínio pode ser feito em relação ao número de respostas de orientação, que apresentou perfil similar de resultados (Figura 14). Assim, concluiu-se que a administração subcutânea das soluções propostas, seja de formalina, seja de salina, na área das vibrissas de ratos, determinou o mesmo tipo de efeito sobre cruzamentos e respostas de orientação em campo aberto. Sugere-se que a redução dos parâmetros estudados possa estar relacionada à habituação ao ambiente, depois de repetidas exposições ao mesmo.

Cruzamentos (*crossings*) e respostas de orientação (*rearings*) são parâmetros comportamentais exploratórios, que refletem a resposta do animal à exposição a um novo ambiente, representando, respectivamente, medidas de locomoção e orientação no espaço.

A redução do número de cruzamentos e respostas de orientação ao longo do tempo poderia ser justificada, pelo menos em parte, pelo fenômeno de habituação ao novo ambiente. Acredita-se que essa seja uma das mais elementares formas de aprendizado, em que se observa redução na atividade exploratória em função de repetidas exposições ao mesmo

ambiente (Thiel *et al.*, 1998, 1999; Viana *et al.*, 2001). Normalmente, é estudada em duas ou mais sessões de observação, em campo aberto ou em um mesmo local (Viana *et al.*, 2001). No experimento 1 dessa Dissertação, as repetidas exposições ao campo aberto, para a obtenção das medidas ao longo do tempo, pode ter contribuído para o menor número de cruzamentos e respostas de orientação em relação ao período basal (antes da administração dos tratamentos propostos), mesmo após 24 horas.

Curiosamente, associado à redução das medidas desses dois parâmetros exploratórios, há aumento concomitante do tempo gasto em auto-limpeza. É interessante se observar que parece haver redução compensatória das medidas exploratórias em relação ao maior tempo gasto em *grooming*. Em tempos em que se constata menor atividade exploratória – imediatamente após (0 minuto) e depois de 15 minutos da administração dos tratamentos, observa-se também maior atividade de *grooming*. No entanto, os padrões temporais são distintos. A atividade exploratória está reduzida em todos os momentos avaliados após a administração dos tratamentos propostos, sendo significativamente menor aos 15 minutos em relação aos períodos de 0 minuto e 24 horas. Já o tempo gasto em auto-limpeza é significativamente maior aos 0 e 15 minutos (não diferindo entre si), voltando aos níveis basais em 24 horas. Também contrária à idéia do aumento de tempo gasto em auto-limpeza estar influenciando a atividade exploratória, é o fato dos animais que receberam soluções de salina ou formalina apresentarem mesmo padrão de comportamento em relação a cruzamentos e respostas de orientação.

No campo aberto, ao inverso do que ocorreu com a atividade exploratória, observou-se aumento do tempo despendido pelos animais na realização de comportamento de auto-limpeza relacionado à administração de solução de formalina 5%. Este aumento iniciou imediatamente após a injeção daquela solução e perdurou por pelo menos 15 minutos (Figuras 15 e 16). Aos 30 minutos, esse efeito começou a desaparecer (Figura 16), de modo que, nesse período, os valores do comportamento de *grooming* ocuparam uma posição intermediária –

não diferiram dos basais, nem dos valores obtidos aos 15 minutos. Aquele comportamento retornou ao nível observado previamente ao tratamento em 2 horas (Figura 16), mantendo-se assim por pelo menos 14 dias (Figuras 15 e 16). Como tal resposta não foi detectada no grupo controle, que não diferiu ao longo do tempo, pode-se propor que a mesma é específica para o grupo que recebeu formalina e, portanto, o comportamento de auto-limpeza mostrou-se sensível à administração do agente irritante nesse modelo. Concluiu-se, assim, que, dentre os parâmetros comportamentais em estudo, o de auto-limpeza é o que melhor se correlaciona com a atividade nociceptiva desencadeada pela formalina administrada por via subcutânea, na região orofacial, em observações de campo aberto.

Esses dados confirmam resultados de Anderson e colaboradores (2003) e Clavelou e colaboradores (1989). Reforçam evidências encontradas na literatura científica de que essa atividade comportamental seria uma das mais preditivas da atividade nociceptiva orofacial (Anderson *et al.*, 2003). Corroboram resultados de Clavelou e colaboradores (1989 e 1995), que demonstraram padrão bifásico de resposta para a formalina, com aumento do comportamento de auto-limpeza nos primeiros 3 a 5 minutos e no período entre 18 e 42 minutos após a injeção. Os períodos de tempo aqui estudados, de 0 minuto a 14 dias, engloba as duas fases relatadas por aqueles autores.

Em mamíferos, entre outras funções, como as reprodutivas e sociais, o comportamento de auto-limpeza está relacionado à remoção de substâncias aversivas, sendo geralmente associado a injúrias cutâneas. Paralelamente, situações que há aumento do estado de alerta dos animais, como na presença de novidade ou agentes estressores externos (atividade nociceptiva desencadeada por estímulo irritante), podem ser ativadores desse comportamento (Spruijt *et al.*, 1992), como foi observado nos experimentos 1 e 2 dessa Dissertação.

Em termos eletrofisiológicos, os estudos demonstraram que nociceptores de fibras periféricas A δ e C, bem como neurônios nociceptivos convergentes do núcleo trigeminal espinhal, são excitados pela administração de formalina no campo nociceptivo correspondente (Anderson *et al.*, 2003; Raboisson *et al.*, 2004). Leong e colaboradores (2000) observaram que a injeção subcutânea de formalina na região da face inervada pelo segundo ramo do nervo trigêmeo induz a expressão do proto-oncogene *c-fos* (*c-fos*) nas lâminas I e II do núcleo sensitivo trigeminal. Esta expressão de *c-fos* possivelmente seja mediada por óxido nítrico (Leong *et al.*, 1999). Estudos adicionais demonstraram que estímulos nociceptivos em face e polpa dentária, por extração dentária ou injeção subcutânea de formalina, são capazes de desencadear essa expressão de *c-fos* no núcleo caudal do trigêmeo (Strass *et al.*, 1993; Coimbra e Coimbra, 1994; Hou *et al.*, 1997). Observou-se, ainda, que, no núcleo caudal do trigêmeo, a expressão de *c-fos* está presente predominantemente na lâmina superficial (Leong *et al.*, 2000).

Uma vez demonstrado que o comportamento de auto-limpeza, avaliado em campo aberto, foi o melhor parâmetro representativo de atividade nociceptiva da área inervada pelo nervo trigêmeo, por meio do teste de dor orofacial induzida pela formalina, administrada por via subcutânea, procurou-se estabelecer o seu perfil temporal por período de 2 semanas (Experimento 2; Figuras 16 e 17). Apesar dos animais já apresentarem comportamento nociceptivo semelhante ao basal na avaliação feita em 24 horas, a lesão tecidual provocada pela formalina deve ter permanecido. Clavelou e colaboradores (1995), analisando a produção de fibrina, demonstraram que, 10 dias após a administração de formalina, nas concentrações de 2,5% a 10%, não houve completa cicatrização da lesão. A degranulação mastocitária, após aquela lesão tecidual, permaneceu por cerca de 4 horas, e o edema, por cerca de 5 dias .

Outro fato interessante foi observado por Ichinose e colaboradores (1999). Estes autores demonstraram, por meio de eletrencefalograma cortical, que há uma discrepância nos resultados eletrencefalográficos sugestivos de comportamento nociceptivo, durante as

distintas fases do teste de dor provocado pela formalina. Durante a fase silente, período em que teoricamente não há atividade nociceptiva, há achados de padrão de vigília (altas freqüências com baixas amplitudes, sugerindo atividade nociceptiva), e, na fase tônica (fase 2), padrão de não-vigília (altas amplitudes e baixas freqüências, sugerindo ausência de atividade nociceptiva). Assim, por mais que não haja comportamento nociceptivo característico em certa fase comportamental, pode haver atividade eletrencefalográfica nociceptiva associada.

No segundo experimento, observou-se que, nas primeiras 4 horas após a administração de formalina, o período em que os animais permaneceram mais tempo realizando auto-limpeza correspondeu ao dos 15 minutos. Neste período, o grupo exposto ao agente irritante e o controle apresentaram diferenças significativas de comportamento, tanto na comparação entre si, quanto na comparação com os valores basais (Figuras 16 e 17).

O tempo total de auto-limpeza parece ter correlação com a atividade nociceptiva apenas durante os primeiros 15 minutos após a administração de formalina. A partir dos 30 minutos, as medidas desse parâmetro comportamental apresentaram valores semelhantes àqueles registrados no tempo basal. Todavia, Clavelou e colaboradores (1989) descreveram que essas alterações podem perdurar por até cerca de 45 minutos após a administração do agente irritante.

Nos primeiro e segundo experimentos dessa Dissertação também foram avaliadas as medidas de latência do reflexo de retirada da cauda. Esse teste de nocicepção tem algumas vantagens. Além de ser um método de simples aplicação, pode ser repetido por várias vezes, apresenta pequena variabilidade para aferição da atividade nociceptiva (King *et al.*, 1997; Le Bars *et al.*, 2001) e reflete a ativação de vias nociceptivas centrais (Irwin *et al.*, 1951; Le Bars *et al.*, 2001). Pretendia-se, assim, verificar se a estimulação nociceptiva determinada pela formalina poderia ativar vias medulares nociceptivas relacionadas à inervação trigeminal. Outra possibilidade seria a de que a administração daquele agente irritante poderia atuar

como estressor, levando à ativação de sistemas antinociceptivos relacionados ao estresse (analgesia induzida por estresse).

Esperava-se que a ativação periférica da via trigeminotalâmica pelo estímulo nociceptivo, gerado pela administração subcutânea de formalina, desencadeasse uma resposta nociceptiva capaz de ativar globalmente vias modulatórias descendentes (Figuras 2 e 3). Todavia, a análise das medidas do reflexo de retirada de cauda feita nos experimentos 1 e 2 não corrobora essa hipótese. Não se observou, nos tempos de observação, qualquer alteração significativa nos valores dessa medida nociceptiva, ao se compararem os grupos formalina e salina (Figuras 12, 18 e 19). Essa discrepância entre resultados esperados e encontrados pode estar refletindo uma incapacidade de o agente irritante, administrado na região das vibrissas do animal, ativar indiretamente vias nociceptivas periféricas e/ou centrais, distintas das trigeminais. Outra hipótese seria a de que, embora atuando como um estressor para o organismo, a intensidade do estímulo não seja suficiente para desencadear resposta antinociceptiva mediada por vias modulatórias descendentes da dor (como observado na analgesia induzida por estresse).

Dose e concentração da formalina poderiam ser fatores aventados como tendo relação com a incapacidade de ativação das vias nociceptivas. Todavia, a solução de formalina empregada – concentração de 5% e dose de 50 μ L – é a mesma encontrada na descrição original do modelo de dor orofacial com formalina, no clássico estudo de Clavelou e colaboradores (1989). Na literatura, aqueles parâmetros (concentração e volume) têm variado de 0,02% a 15% e de 20 a 150 μ L, conforme o estudo (Raboisson e Dallel, 2004). Concentrações de formalina até 1,5% têm sido utilizadas para melhorar a sensibilidade do teste, além de diminuir o sofrimento dos animais (Clavelou *et al.*, 1995). Altas concentrações de formalina geram um paralelo agravamento da reação inflamatória tecidual e da injúria tecidual (Raboisson e Dallel, 2004) e dessensibilização de fibras nervosas periféricas (Puig e Sorkin, 1995).

Possível explicação para os resultados descritos no teste de latência de retirada da cauda estaria relacionada às vias nociceptivas medulares que fazem a integração de estímulos dolorosos periféricos com a atividade em níveis de controle superiores. Quando o estímulo nociceptivo é aplicado abaixo da região cervical, a principal via medular nociceptiva integradora utilizada é o trato espinotalâmico lateral, que ascende até o núcleo ventral póstero-lateral do tálamo e, posteriormente, ao córtex somestésico primário (Pacák e Palkovits, 2001; Le Bars, 2001) (Figuras 1, 41 e 42). A ativação determinada pelo estímulo térmico, provocado pela luz incandescente sobre a pele do animal durante o teste de *tail-flick*, percorre essa via medular ascendente (Figura 42)(Le Bars, 2001). Todavia, quando o agente irritante (no caso, solução de formalina a 5%) é aplicado na região orofacial, a estimulação nociceptiva aferente, transmitida ao núcleo caudal do nervo trigêmeo, trafega pelo trato trigeminotalâmico até o núcleo ventral póstero-medial do tálamo e, daí, ao córtex somestésico primário (Figuras 1 e 41). Apesar de ambas as vias transportarem os mesmos tipos de informações nociceptivas e terminarem na mesma área cortical, ascendem de modo independente, carreando informações de áreas diferentes do corpo (Figura 1, 41 e 42). Possivelmente a ativação do trato trigeminotalâmico não seja capaz de atuar sobre mecanismos descendentes modulatórios relacionados à via espinotalâmica lateral. (Bear *et al.*, 1996 Morgan e Mikhail, 1996; Chudler e Bonica, 2001; Pacák e Palkovits, 2001; Terman e Bonica, 2001; Messlinger, 2006, Schünke *et al.*, 2007)

No experimento 2, observaram-se diferenças significativas entre as latências de retirada da cauda aferidas 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, em comparação com as obtidas em 30 minutos e 2 horas. Nessa fase, depois dos 30 minutos, há queda gradual nas medidas de *tail-flick*. Em 2 horas, foram encontradas as menores latências de retirada da cauda, que se mostraram significativamente diferentes das obtidas no período basal e em 15 minutos. Esse achado é compatível com o de um estado hiperalgésico. Todavia, não se evidenciou diferença significativa entre os grupos (Figura 18).

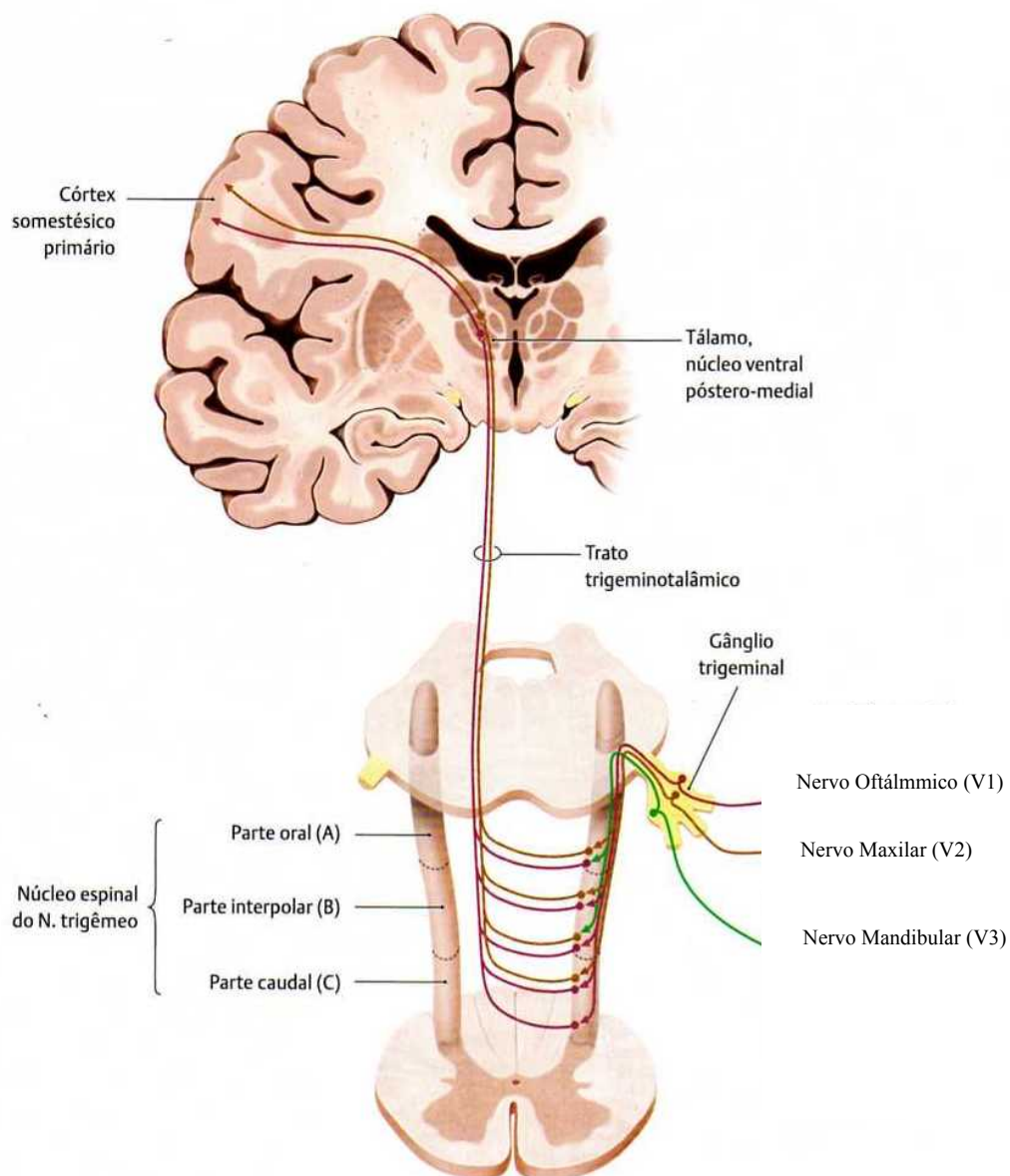


Figura 41. Vias nociceptivas da região da cabeça e cervical alta. Essas vias seguem os ramos do nervo trigêmeo (V1-V3). Os neurônios aferentes primários situam-se dentro do gânglio trigeminal e seus axônios terminam no núcleo espinal do nervo trigêmeo. Os axônios do 2º neurônio cruzam a linha média e ascendem pelo trato trigeminotalâmico até o núcleo ventral pósteromedial do tálamo. Dessa região parte os axônios do 3º neurônio que terminaram no córtex somestésico primário (Adaptado de Schünke *et al.*, 2007)

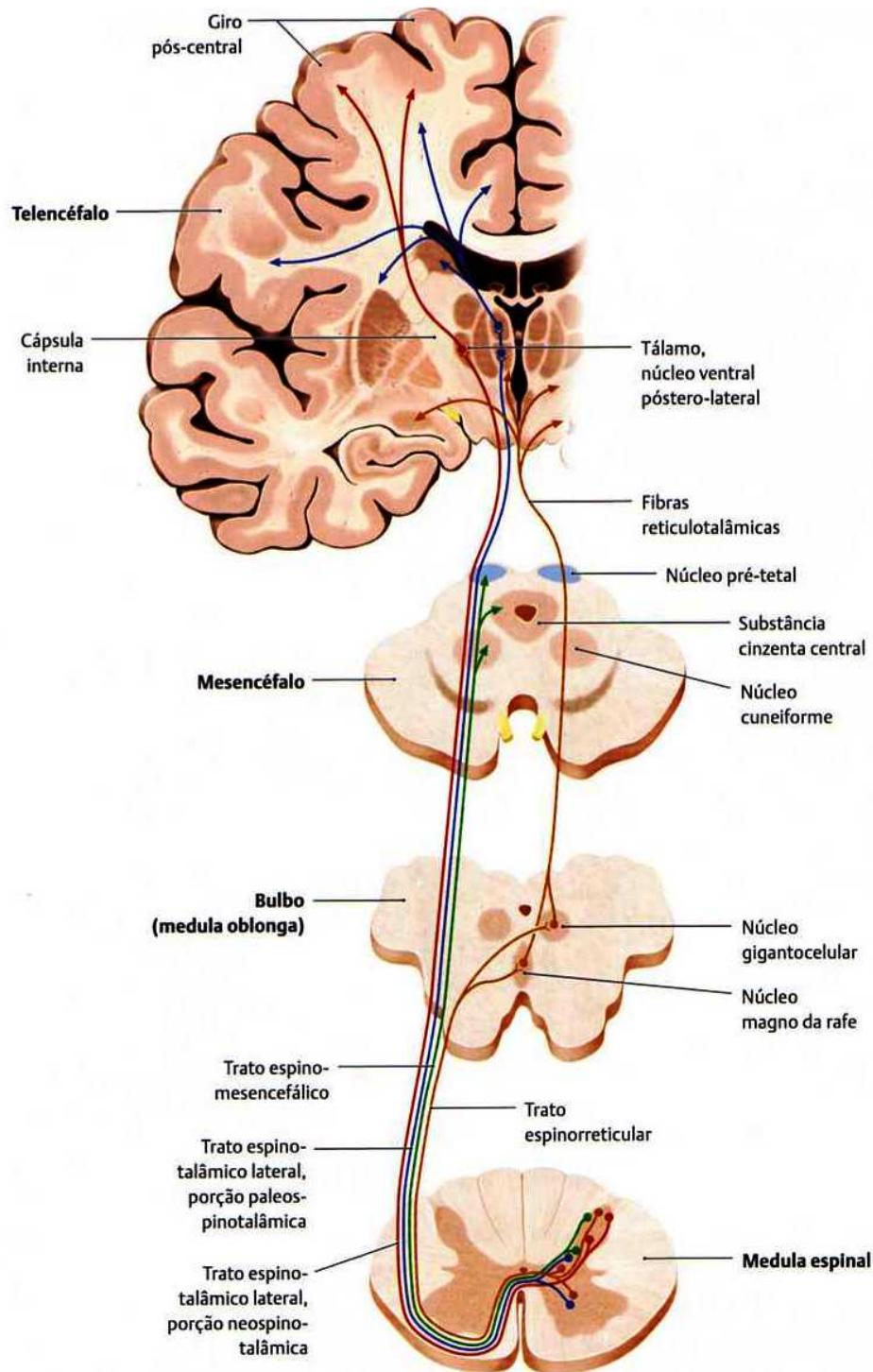


Figura 42. Vias nociceptivas da região do tronco e membros. Os axônios dos neurônios primários terminam nos neurônios de projeção no corno posterior da medula. Os axônios destes neurônios cruzam a linha média e ascendem pelo trato espinotalâmico e espinomesencefálico até o tálamo, mas não fazem conexão com o núcleo ventral pósteromedial do tálamo, como a via trigeminotalâmica. (Adaptado de Schünke *et al.*, 2007)

Essa hiperalgesia não parece estar relacionada ao processo nociceptivo desencadeado pela formalina. Pode estar associada a um processo de modulação das vias nociceptivas, gerado pelo número de vezes que a cauda dos animais foi submetida ao estímulo termoalgésico durante a realização do teste de *tail-flick*. Seria um fenômeno de habituação, decorrente da repetida exposição ao teste, fazendo com os animais passassem a retirar a cauda mais rapidamente ao serem colocados no aparelho. Caso isso realmente tenha acontecido, esse processo foi rapidamente modulado pelas vias antinociceptivas, desaparecendo em 4 horas e assim permanecendo nos dias subseqüentes.

Em nenhum momento dos experimentos 1 e 2, foram observados achados característicos de analgesia. Esse fenômeno poderia ter ocorrido secundariamente ao estresse agudo gerado pelo procedimento experimental (Amir e Amit, 1978; Hayes *et al.*, 1978; Bodnar, 1986). Esperar-se-ia que, durante o período de observação, ocorresse aumento das latências de retirada da cauda, fato que não foi observado. Todavia, se isso ocorreu, deve ter sido adequadamente modulado, pois, durante os primeiros 30 minutos de experimento, não foram observadas alterações características desse processo.

Por outro lado, como conseqüência da lesão gerada pela formalina, poderia ocorrer um eventual estado hiperalgésico. Todavia, as medidas do tempo gasto em reflexo de auto-limpeza, avaliadas em períodos curtos (15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 4 horas) ou mais prolongados (24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias), não mostraram padrão diferenciado entre os grupos (Figuras 12, 18 e 19).

Durante a fase de observação tardia do experimento 2 (em 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias), foi avaliado, no campo aberto, apenas o comportamento de auto-limpeza espontâneo apresentado pelos animais. Nenhum estímulo direto ou indireto foi aplicado sobre eles nesse período. Se a lesão tecidual causada pela formalina foi capaz de alterar a funcionalidade neuronal, a ponto de induzir memória celular em nível trigeminal, talvez isso se refletisse como diminuição do limiar excitatório dessas células. Assim, seria necessário um estímulo subliminar

para desencadear o comportamento nociceptivo típico nesse modelo experimental. Contudo, isso não foi observado (Figura 16).

Recentemente, foi documentado que a estimulação nervosa repetitiva pode induzir potenciação de longa duração (*long-term potentiation* ou LTP, em inglês) na transmissão aferente primária, mediada por fibras de tipo C, no núcleo caudal do nervo trigêmeo (Liang *et al.*, 2005).

A capacidade de transformar experiências transitórias em memória pelo cérebro tem sido associada com alterações sinápticas induzidas por uma transmissão neuronal rápida e de alta frequência (*long-term potentiation* ou LTP), descoberta por Lømo (1966) e descrita por Bliss e Lømo (1973). Estímulos rápidos e de alta frequência (100 Hz) nas vias aferentes do giro denteado do hipocampo pode induzir LTP. Esse fenômeno é a representação eletrofisiológica do postulado de Donald Hebb (1949), pelo qual, quando dois neurônios são ativados repetidamente por algum tempo, ocorre alguma interação entre eles, de modo que, ao final, a atividade de um conduz à atividade do outro.

O processo de LTP envolve vias de transdução celular dependente de cálcio, necessitando de um transitório, porém significativo, aumento pós-sináptico da concentração de cálcio intracelular (Rygh *et al.*, 2002). O glutamato, agindo em receptores glutamatérgicos metabotrópicos, induz ativação de fosfolipase-C, com conseqüente liberação de diacilglicerol (que, por sua vez, ativa proteínas quinases) e de inositol trifosfato (IP₃) (que media a liberação do cálcio intracelular para o citosol). Glutamato também age sobre receptores AMPA, abrindo canais iônicos de sódio. Esse influxo de sódio gera um potencial pós-sináptico despolarizante capaz de expelir o íon magnésio do interior do canal de cálcio NMDA, aumentando ainda mais a concentração de cálcio intracelular. Este aumento gera ativação de proteínas quinases-C, que fosforilam o canal de cálcio, neutralizando os locais de fixação do íon magnésio, de modo a manter o canal aberto e aumentar a excitabilidade do neurônio. Todo esse complexo

mecanismo contribui para a facilitação ou potenciação sináptica, que é o substrato da memória celular (Hudspith, 1997; Basbaum, 1996; Woolf e Manion, 1999).

O processo de LTP foi exaustivamente estudado como um modelo celular de memória e aprendizado. Entretanto, recentes estudos demonstraram que mecanismos similares podem ocorrer em vias nociceptivas, estando envolvidos com o aparecimento de hiperalgesia, alodinia e analgesia (Sandkühler, 2000). Assim como no hipocampo, esse processo também pode acontecer em neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, podendo representar uma primitiva forma somatossensorial de “memória e aprendizado celular” na circuitaria nociceptiva espinhal (Rygh *et al.*, 2002).

Não existem métodos experimentais que possam reproduzir a totalidade de um fenômeno fisiológico ou fisiopatogênico de determinada entidade nosológica. No estudo das dores cefálicas com componente vascular, principalmente de enxaqueca ou de cefaléia em salvas, a ativação do sistema trigeminovascular é o principal evento fisiopatogênico envolvido (Moskowitz, 1984). Todavia, a causa primária e os fatores que levam a esta ativação não são completamente esclarecidos. Acredita-se que tenha causa multifatorial, envolvendo desde mecanismos geneticamente herdados (mutações nos genes *CACNA1A* no cromossomo 19p13 e *ATP1A2* no cromossomo 1q23, responsáveis por alterações em canais de cálcio e sódio, respectivamente) até influências ambientais e psicossomáticas (Pietrobon *et al.*, 2003; Moskowitz, 2007; Hargreaves, 2007).

Conforme já mencionado, outra importante maneira de ativar o sistema trigeminovascular é por meio da administração de nitroglicerina sistemicamente. Padrões comportamentais nociceptivos associados a esse modelo de ativação do sistema trigeminal são pouco explorados. Por esse motivo, elaborou-se o experimento 3. Nele, observou-se importante redução da atividade de auto-limpeza (*grooming*) nos dois grupos estudados, no tempo de 5 minutos após a administração de nitroglicerina ou veículo, em comparação com os valores basais e aqueles obtidos em 1 hora, 2 horas e 4 horas (Figura 21). O tempo gasto pelos

animais realizando aquele comportamento também se mostrou significativamente menor aos 30 minutos, em comparação com o que foi observado em 2 horas (Figura 21). Não foram observadas alterações nos períodos de 24 e 48 horas (Figura 19). Concluiu-se, assim, que a administração dos tratamentos propostos – nitroglicerina e veículo – levou à rápida diminuição do tempo despendido no comportamento de auto-limpeza (aos 5 minutos). A partir dos 30 minutos, os valores desse parâmetro começaram a voltar aos níveis basais, de modo que em 1 hora não mais diferiram daqueles obtidos antes da administração dos tratamentos propostos. As medidas de tempo gasto em auto-limpeza aos 30 minutos assumiram posição intermediária, pois não foram diferentes daquelas obtidas aos 15 minutos, nem das observadas em 1 hora. Os dados sugerem, portanto, que o comportamento de auto-limpeza não é sensível aos efeitos da administração de nitroglicerina.

No experimento 3, também foram avaliadas as latências de retirada da cauda após a administração de nitroglicerina e veículo, em diferentes tempos (basal, 30 minutos, 24 horas e 48 horas), não tendo sido observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os períodos de avaliação (Figura 23).

Desde as primeiras descrições de Sobrero (1846), se reconhece que dor de cabeça é um dos principais efeitos adversos relacionados ao uso de nitratos orgânicos. Esses compostos, quando metabolizados, são importantes doadores de óxido nítrico (Moncada *et al.*, 1991; Marsh e Marsh, 1997; Kerin *et al.*, 2001; Bergerot *et al.*, 2006).

Estudos de Olesen e colaboradores (1993) e Iversen e colaboradores (1993) propuseram que a patofisiologia da enxaqueca estaria relacionada à hipersensibilidade ao óxido nítrico. Em modelos experimentais de cefaléia em seres humanos, a administração de nitroglicerina (NTG) é capaz de desencadear dor de cabeça mais proeminente em pacientes com história prévia de cefaléia primária do que nos controles (Krabbe e Olesen, 1980; Sicuteri *et al.*, 1987; Olesen e Thomsen, 1993; Lars e Olesen, 2001). Além disso, aquele fármaco já foi descrito como ativador de vias nociceptivas trigeminais, levando à maior expressão de *c-fos*

em núcleo trigeminal caudal (Tassorelli e Joseph, 1995). Em modelos experimentais para o estudo de cefaléia, uso de nitroglicerina é descrito como um modelo complexo, categorizado como neurovascular de ativação trigeminal (Bergerot *et al.*, 2006).

Com base nessas evidências, esperava-se que a nitroglicerina fosse capaz de desencadear processo nociceptivo mediado pelo sistema trigeminovascular, caracterizado por aumento nas medidas de auto-limpeza, parâmetro comportamental eleito como medida nociceptiva relacionada à nocicepção trigeminal no primeiro experimento dessa Dissertação. Todavia, os resultados demonstraram, ao contrário, marcada redução daquelas medidas comportamentais (Figura 21). Além disso, tanto os animais que receberam nitroglicerina, quanto aqueles que receberam veículo, nas doses e concentrações estipuladas, apresentaram o mesmo padrão de resposta comportamental. Logo, o efeito observado não se mostrou relacionado especificamente à administração do fármaco.

Tal resultado, inicialmente, apresenta estreita relação temporal com o período no qual pode ocorrer hipotensão arterial decorrente do uso de nitratos. Em experimentos com animais, quando nitroglicerina é administrada sistemicamente, cerca de 1 a 4 minutos após, pode-se observar hipotensão arterial sistêmica (Michel, 2007). Além disso, a dose de nitroglicerina empregada nos experimentos desta Dissertação é reconhecidamente capaz de induzir hipotensão, que pode perdurar por até 75 minutos (Needleman, 1970). Esse fármaco induz hipotensão arterial por meio de vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (Tassorelli e Joseph, 1995a).

Nitroglicerina (trinitrato de glicerina ou NTG) é um nitrato orgânico. Apresenta meia-vida plasmática de cerca de 1 a 4 minutos, que pode ser prolongada em tecidos lipofílicos, incluindo o cérebro. Esse composto é rapidamente metabolizado no meio intracelular em NO, que é um importante mensageiro neuronal, com diversas funções sinalizadoras tanto no SNC, quanto no Sistema Nervoso Periférico (Moncada *et al.*, 1991; Bergerot *et al.*, 2006). Sua metabolização é realizada pela enzima mitocondrial aldeído-d-hidrogenase (Michel, 2006).

Agindo em sistema cardiovascular, causa vasodilatação, acarretando diminuição da pressão diastólica e discreta redução em resistência vascular pulmonar e débito cardíaco. Em altas doses, é capaz de gerar estase venosa, aumento de resistência arteriolar e redução de pressão arterial (sistólica e diastólica) e débito cardíaco, podendo acionar mecanismos autonômicos regulatórios das funções cardiovasculares (Michel, 2006).

A administração de nitratos orgânicos desencadeia uma consistente e sustentada ativação de áreas cardiovasculares centrais e regiões envolvidas na percepção e na transmissão do processo doloroso (Tassorelli e Joseph, 1995a; 1995b; 1996; Tassorelli *et al.*, 1997) .

Expressão de *c-fos* é observada em várias regiões cerebrais após a administração sistêmica de nitroglicerina. Esse fenômeno é encontrado em algumas áreas primariamente envolvidas na resposta barorreceptora, onde os neurônios são ativados em resposta a um episódio de hipotensão (sub-núcleos medial e lateral do núcleo do trato solitário), assim como no bulbo (porção ventro-lateral), que exerce papel fundamental na regulação fásica e tônica da pressão arterial (Tassorelli e Joseph, 1995a). Aumento de expressão daquele pró-oncogene também é observado em áreas não relacionadas às funções cardiovasculares, como em núcleos comissurais, sugerindo que esse fenômeno não esteja estritamente relacionado ao controle da pressão arterial. Alguns dos locais que apresentam abundante expressão de *c-fos* após a administração de nitroglicerina apresentam íntima relação com os processos nociceptivos desencadeados por injúria tecidual subcutânea, provocada pela injeção de formalina a 5% na região orofacial (Tassorelli e Joseph, 1995a).

No núcleo caudal espinhal do nervo trigêmeo, a maioria das células imunorreativas para *c-fos* é encontrada na lâmina I, que recebe aferência de fibras nociceptivas não-mielinizadas, e na lâmina II, de onde as informações daquelas fibras são transmitidas para centros rostrais (Tassorelli e Joseph, 1995a). Tais achados sugerem uma possível ativação dos

neurônios envolvidos na sensibilidade de face, vasos sanguíneos ou meninges (Nozaki *et al.*, 1992; Kaube *et al.*, 1993).

A expressão de *c-fos* observada nos núcleos caudal espinal do trigêmeo e comissural do trato solitário pode ser diretamente afetada pelo efeito da nitroglicerina no sistema trigeminovascular, onde ocorre a regulação dos mecanismos nociceptivos e vasculares cerebrais. Wei e colaboradores (1992) demonstraram que a vasodilatação cerebral induzida pela nitroglicerina é inibida por antagonista de receptores para CGRP, provavelmente o principal regulador do sistema trigeminovascular, e que a denervação crônica trigeminal diminui a resposta das arteríolas cerebrais a esse nitrato orgânico.

Estudos demonstraram que existe importante aumento de GMPc no núcleo trigeminal caudal entre 2 e 4 horas após a administração de nitroglicerina, sendo que o maior valor é observado no período de 4 horas (Torfgard *et al.*, 1989; Torfgard e Ahnler, 1991; Tassorelli *et al.*, 2004). Esses achados predominaram nas fibras neuronais do núcleo caudal do trigêmeo e do trato trigeminoespinal. Nos elementos vasculares associados, níveis aumentados de GMPc ficaram restritos às paredes das pequenas arteríolas corticais e capilares. Possivelmente, o aumento desse nucleotídeo seja resultante de uma cascata de eventos secundários à administração de NTG, que possivelmente inclui ativação de estruturas perivasculares e neurônios do tronco encefálico, seguida pela expressão do gene de NOS_i.

Esse fenômeno sugere que a nitroglicerina induz alterações específicas nas paredes de microvasos, o que, por sua vez, ativaria as fibras trigeminovasculares originadas em gânglio de Gasser. Esse composto seria responsável por uma super-regulação de GMPc em arteríolas corticais e neurônios trigeminais nociceptivos. Paralelamente, a nitroglicerina induz significativas alterações de fluxo sanguíneo em córtex somatossensorial, que perduram por mais de 2 horas. Portanto, esse fármaco é capaz de induzir indiretamente alterações neuroquímicas no núcleo caudal do nervo trigêmeo. Tais achados sugerem que a via NO-GMPc

seja uma conexão entre os eventos vasculares e neuronais envolvidos no desencadeamento e na manutenção das dores cefálicas, principalmente em enxaqueca (Tassorelli *et al.*, 2004).

Se a maior expressão de GMPc e a atividade algésica trigeminal desencadeada pela administração de nitroglicerina são eventos que ocorrem de modo paralelo, teoricamente o tempo entre 2 e 4 horas seria aquele em que maior registro de atividade nociceptiva seria observada. Todavia, no experimento 3, o comportamento sugestivo de atividade nociceptiva só foi observado nos primeiros 5 minutos após o tratamento com aquele fármaco. Além disso, ele foi de natureza conflitante ao resultado esperado – redução em vez de aumento do tempo gasto em auto-limpeza (Figura 18). Possivelmente, se ocorreu processo algíco secundário à administração de nitroglicerina, ele foi modulado adequadamente pelas vias descendentes de dor ou o parâmetro de aferição adotado (tempo de *grooming*) não foi adequado para detectá-lo.

Tassorelli e Joseph (1995a) demonstraram marcante expressão de *c-fos* na porção ventrolateral caudal da substância cinzenta periaquedutal, que apresenta importante atuação nos mecanismos nociceptivos. Similar expressão desse proto-oncogene naquela região também pode ser observada após hipotensão hipovolêmica (Chan e Sawchenko, 1993). Para os primeiros autores, é possível que os mecanismos relacionados tanto à hipotensão, quanto à estimulação nociceptiva possam estar envolvidos, especialmente quando considerada a ativação dos neurônios no núcleo caudal do trigêmeo, sendo que as projeções desta última estrutura à substância periaquedutal parece ter importante envolvimento nesse fenômeno.

Densa expressão de *c-fos* em áreas de integração das repostas vegetativa, endócrina e comportamental também é observada após tratamento com nitrato orgânico. São descritas extensas conexões entre núcleo parabraquial e regiões de tronco e mesencéfalo, tais como núcleo do trato solitário, medula ventrolateral, substância periaquedutal cinzenta, hipotálamo periventricular e núcleo central da amígdala (Tassorelli e Joseph, 1995a; Pacák e Palkovits, 2001). A porção ventrolateral do núcleo parabraquial recebe suas maiores aferências dos

núcleos do trato solitário e área póstrema e projeta-se aos núcleos prosencefálicos com função integradora autonômica (Herbet *et al.*, 1990; Tassoreli e Joseph, 1995a; Pacák e Palkovits, 2001).

Outro importante local de expressão de *c-fos* é o *locus coeruleus*, que possivelmente não apresenta papel ativo na regulação vasomotora. Estudos demonstraram ausência de projeções dos núcleos do trato solitário para essa estrutura, bem como que ela parece exercer pouco ou nenhum efeito sobre a pressão arterial (Anston-Jones *et al.*, 1986; Valentino *et al.*, 1986). O *locus coeruleus* recebe aferências dos neurônios da porção ventro-lateral do bulbo e as encaminha para áreas prosencefálicas e vasos cerebrais. Assim, aquela região parece exercer função fundamental na sinalização e na coordenação da resposta global aos efeitos da nitroglicerina (Valentino *et al.*, 1980; Goadsby *et al.*, 1982; Anston-Jones *et al.*, 1986; Kachidian *et al.*, 1990; Pieribone *et al.*, 1991).

O estudo conduzido por Tassoreli e Joseph (1995a) sugere que a nitroglicerina pode ativar áreas envolvidas com mecanismos neuroendócrinos e vegetativos, uma vez que foi observada intensa expressão de *c-fos* nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos, que estão intrinsecamente envolvidos com aqueles mecanismos. Share (1988) também demonstrou intensa expressão desse proto-oncogene em núcleos supra-ópticos, fato que pode estar relacionado à secreção de vasopressina secundária à hipotensão gerada por aquele nitrovasodilatador.

Grande número de neurônios do núcleo central da amígdala também apresentou intensa expressão de *c-fos* após a administração de nitroglicerina, o que estaria mais relacionada aos fenômenos nociceptivos do que aos cardiovasculares propriamente ditos. As conexões daquela estrutura límbica com a substância cinzenta periaquedutal reforçam o vínculo entre os circuitos que coordenam as funções vegetativas e os eventos nociceptivos (Tassoreli e Joseph, 1995a; Pacák e Palkovits, 2001).

Além disso, extensa expressão de *c-fos* nas células do órgão subfornicial pode ocorrer secundariamente ao uso de nitroglicerina. Esse fato pode estar relacionado ao acesso direto de substâncias circulantes (angiotensina e vasopressina) aos receptores neurais localizados no interior daquele órgão, o que seria resultante das respostas vegetativa, neuroendócrina e comportamental mediadas por suas conexões com o núcleo paraventricular do hipotálamo (Tassorelli e Joseph, 1995a).

Assim como a nitroglicerina, o veículo, por ter sua composição à base de alcoóis (mistura de etanol [30%], propilenoglicol [50%] e água [40 %]) também seria propício a desencadear relaxamento vascular e hipotensão arterial. Possivelmente, esses efeitos estariam mais correlacionados ao etanol. Vários mecanismos foram propostos para justificar a capacidade do etanol de desencadear hipotensão (El-Mas e Abdel-Rahman, 2007). Howe e colaboradores (1989) atribuíram o efeito hipotensor do etanol às alterações no controle vegetativo cardiovascular, que podem ser abolidos após o bloqueio. Outros fatores relacionados a esse fenômeno incluem inibição do influxo de cálcio para dentro do músculo liso vascular (Turlapaty *et al.*, 1979), promoção das atividades de prostaglandinas endoteliais e óxido nítrico (Grennberg *et al.*, 1993), indução de depressão miocárdica (Kelbaek *et al.*, 1985) e aumento do relaxamento vascular, mediado por receptores de adenosina (Rekik *et al.*, 2002).

As coincidentes medidas de auto-limpeza encontradas entre os grupos que receberam nitroglicerina e veículo podem estar relacionadas aos efeitos hipotensores que ambos os compostos desencadeiam, por meio das vias óxido-nitrérgicas, e não necessariamente relacionadas ao desencadeamento de um processo nociceptivo propriamente dito. Além disso, o efeito decorrente da nitroglicerina poderia ser potencializado pelos alcoóis que compõem o veículo em que é diluída. Assim, poder-se-ia esperar valores intermediários das medidas de auto-limpeza nos animais do grupo controle, fato também não ocorrido.

A administração de nitroglicerina em indivíduos com enxaqueca ou cefaléia em salvas desencadeia dor cefálica mais proeminente do que naqueles previamente hígidos.

Possivelmente, isso estaria relacionado a uma hipersensibilidade ao óxido nítrico (Iversen *et al.*, 1993; Olesen *et al.*, 1993). Outra possibilidade é a de que indivíduos com história prévia de dor de cabeça apresentassem um sistema trigeminal sensibilizado, o que facilitaria o desencadeamento da dor ou exacerbaria sua intensidade. Essa hipótese corroboraria os resultados observados no terceiro experimento, pois os animais apenas receberam nitroglicerina por via sistêmica, sem apresentar experiências nociceptivas mediadas pelo sistema trigeminal previamente.

A associação de modelos nociceptivos abrangendo as mais variadas formas de ativação do sistema trigeminovascular seria interessante durante estudos experimentais relacionados às dores orofaciais e cefálicas com componente vascular. Por isso, nessa Dissertação, foi proposto o experimento 4 com esse objetivo. Associou-se um modelo de ativação periférica do sistema trigeminal (dor orofacial induzida pela formalina) com outro de ativação sistêmica neurovascular, utilizando composto vasodilatador (nitroglicerina). Procurou-se avaliar as medidas do tempo total gasto com o reflexo de auto-limpeza e de latência de retirada da cauda.

Na análise do tempo despendido em comportamento de auto-limpeza, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no primeiro dia da primeira semana, imediatamente antes da administração dos tratamentos propostos (Tabela 7). Ao se compararem as medidas basais de cada uma das três semanas de experimento, observou-se redução daquele tempo na segunda e na terceira semanas em relação à primeira, independentemente dos grupos considerados (Figura 25). Esse achado pode estar relacionado ao fenômeno de habituação. Como, durante o experimento, os animais foram submetidos ao mesmo ambiente por várias vezes, há tendência a reduzir os parâmetros comportamentais com a familiarização com o campo aberto (Thiel *et al.*, 1998, 1999; Viana *et al.*, 2001). É importante ressaltar que todas essas medidas, independentemente da semana avaliada, foram

obtidas antes da administração de qualquer tratamento, não estando, portanto, relacionadas à injeção das soluções em estudo.

Na análise do tempo despendido em *grooming* 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, novamente observaram-se diferenças significativas das segunda e terceira semana em relação à primeira, independentemente dos grupos experimentais (Figura 26). Houve redução do comportamento de auto-limpeza, provavelmente como resultado da habituação ao ambiente. Adicionalmente, foram também observadas diferenças entre os grupos e interação entre estes e as semanas de avaliação. Na primeira semana, os animais que receberam solução salina, por via subcutânea, e um dos três tratamentos propostos para a via intraperitoneal (solução salina, veículo ou nitroglicerina, correspondendo, respectivamente, aos grupos SS, SV e SN) não diferiram entre si (Figura 26). Concluiu-se, assim, que a nitroglicerina não interferiu sobre o parâmetro comportamental nesse período de avaliação. Esse resultado complementa o que foi visto no experimento 3, em que houve redução do tempo gasto em auto-limpeza entre 5 e 30 minutos depois da administração de veículo ou nitroglicerina (Figura 21).

Ainda na primeira semana de avaliação, foi observado que a administração de formalina, por via subcutânea, associada à solução salina, por via intraperitoneal (correspondendo ao grupo FS), levou ao aumento do tempo despendido no comportamento de auto-limpeza, em relação ao grupo controle, que recebeu solução salina tanto por via subcutânea, quanto por via intraperitoneal, correspondendo ao grupo SS. De fato, aquele grupo (FS) diferiu de todos aqueles que receberam solução salina, por via subcutânea (SS, SV e SN), e do que recebeu formalina, por via subcutânea, e nitroglicerina, por via intraperitoneal (FN) (Figura 26). Tais dados confirmam aqueles obtidos nos experimentos 1 e 2 (Figuras 15 e 16).

O comportamento observado no grupo que recebeu solução formalina, por via subcutânea, e veículo, por via intraperitoneal (grupo FV), apresentou um padrão

intermediário, de modo que não diferiu do grupo que recebeu solução salina, por via subcutânea, e veículo, por via intraperitoneal (grupo SV), nem do grupo que recebeu solução formalina, por via subcutânea, e salina, por via intraperitoneal (grupo FS) (Figura 26). Isso sugere que o veículo pode apresentar certo efeito no modelo de dor orofacial induzida por formalina, revertendo parcialmente o aumento do tempo gasto em auto-limpeza por aquela substância irritante.

Observou-se, ainda na primeira semana, que os animais para os quais foram administradas formalina, por via subcutânea, e salina, por via intraperitoneal (grupo FS) diferiram significativamente daqueles que receberam formalina, por via subcutânea, e nitroglicerina, por via intraperitoneal (grupo FN) (Figura 26). Os primeiros despenderam significativamente mais tempo em auto-limpeza do que os segundos. Assim, embora a administração de nitroglicerina (grupo SN) não tenha apresentado efeito por si só, foi capaz de reverter o aumento do tempo gasto em auto-limpeza determinado pela formalina. Logo, no primeiro dia da primeira semana de tratamento, 15 minutos após receberem o nitrato, os animais expostos ao modelo de dor orofacial pela formalina voltaram a apresentar comportamento similar ao dos controles (que receberam salina, por via subcutânea, e um dos três tratamentos propostos para uso por via intraperitoneal, correspondendo aos grupos SS, SV e SN) (Figura 23). Nas duas semanas seguintes, todos os grupos avaliados (correspondendo a SS, SV, SN, FS, FV e FN) diferiram significativamente do grupo que recebeu formalina, por via subcutânea, e solução salina, por via intraperitoneal (FS), na primeira semana de experimento. De fato, nas segunda e terceira semanas, a solução de formalina não foi novamente administrada. Isso pode explicar a ausência do efeito observado na primeira semana, com aumento do tempo de *grooming*. Como esse efeito não ocorreu aqui, a administração de nitroglicerina também não levou a alterações de comportamento em relação aos controles (Figura 26). Concluiu-se que a nitroglicerina só reverte o efeito agudo da administração da

formalina, quando há aumento do tempo em auto-limpeza (fase aguda do modelo de dor orofacial). Não exerce efeito em longo prazo nesse modelo.

Por fim, 15 minutos após a administração dos tratamentos propostos, nas segunda e terceira semanas de experimento, observou-se redução do tempo despendido em auto-limpeza, em comparação com a primeira semana, independentemente dos grupos estudados, sugerindo mais uma vez mais a habituação ao ambiente (Figura 26) (Thiel et al, 1998 and 1999; Viana et al, 2001).

Podem-se aventar algumas hipóteses para explicar a reversão que a nitroglicerina determinou sobre o aumento do *grooming* induzido pela formalina.

Por meio do tradicional modelo de dor desencadeada pela administração subcutânea de formalina na pata dos animais, Okuda e colaboradores (2001) demonstraram que, com o uso de alta concentração de agente irritante, formalina 10% , não há produção de efeito máximo no comportamento nociceptivo, nem produção de óxido nítrico ou liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal. Os autores sugerem que esse fato pode ser decorrente da alta intensidade do estímulo nociceptivo gerado. Como resultado de aferência nociceptiva persistente ou intensa, haveria maior ativação dos mecanismos descendentes inibitórios de controle da dor, envolvendo várias estruturas supra-espinhais. Com isso, a resposta final observada seria um efeito mais atenuado ao estímulo nocivo.

Como os modelos de dor orofacial induzida pela formalina e experimental de cefaléia induzida por nitratos compartilham de processos fisiopatogênicos comuns, poder-se-ia supor que a nitroglicerina, agindo como um doador de óxido nítrico esteja atuando sinergicamente com o agente irritante, potencializando seu efeito nociceptivo. Alguns autores referem que aquele fármaco, um pró-formador de óxido nítrico, influencia indiretamente o fenômeno doloroso, especialmente o processo de sensibilização dos nociceptores de segunda ordem em nível medular (Saito et al., 1994; Lin et al., 1999). Como conseqüência da atuação pró-nociceptiva dos dois compostos – formalina e nitroglicerina – em dois sítios distintos, ocorreria

maior ativação das vias descendentes inibitórias e esta, por sua vez, determinaria como resultado final a atenuação da resposta comportamental, com retorno das medidas de tempo gasto com o comportamento de auto-limpeza àsquelas encontradas no período basal.

O óxido nítrico está envolvido em uma variedade de funções fisiológicas nos SNC. Há evidências de sua atuação sobre respostas nociceptivas e inflamatórias. Tem sido proposta, por exemplo, uma complexa interação entre os sistemas óxido-nitrérgicos e opióides, envolvendo paralelamente mecanismos GABAérgicos e glutamatérgicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Homayoun et al., 2002; Okuducu e Onal, 2005). Morfina e óxido nítrico parecem atuar de forma acoplada em diversos processos (Ferreira et al., 1991; Gyires, K., 1994; Kolesnikov et al, 1993; Bhargava, 1995; Dambisya e Lee, 1996). Morfina pode estimular a liberação de óxido nítrico em diferentes tecidos, incluindo eminência media de ratos (Stefano et al., 1997). Tem sido sugerido que a liberação de óxido nítrico induzida por morfina pode ser mediada por receptores mu (Welters et al., 2000). Por outro lado, a administração aguda de substratos de NO altera a distribuição de morfina no encéfalo e na medula espinhal, possivelmente por inibição da captação de morfina em sítios centrais (Bhargava et al., 1998). Tais alterações têm sido implicadas na modulação da analgesia da morfina por NO (Bhargava et al., 1998). Estudos propõem efeito modulador do sistema NO sobre a analgesia evocada por receptores opióides, especialmente os de tipo mu (McDonald et al., 1994; Fidecka et al., 1997; Capasso et al., 1998; Homayoun et al., 2003; Chena et al., 2006).

Conforme Spruijt e colaboradores (1992), em situações de estresse agudo, após a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, se observou importante aumento do comportamento de auto-limpeza, mediado principalmente pela ação de ACTH (hormônio adrenocortrópico). Também se observou papel de ADH, que foi capaz de desencadear tal parâmetro comportamental por longos períodos. Segundo esses autores, existe uma série de evidências associando o sistema opióide com o desencadeamento do comportamento de auto-

limpeza, principalmente por meio da ação de ACTH. É reconhecido que baixas doses de morfina ou β -endorfina são capazes de gerar atividade de auto-limpeza. A administração de antagonista opióide, como naloxona, pode inibir esse comportamento, quando desencadeado pela ação de ACTH e peptídeos opióides. Além disso, a administração de ACTH e β -endorfina na substância cinzenta periaquedutal pode resultar em excessivo aumento no reflexo de auto-limpeza (Spruijt et al., 1992).

Assim, vários sistemas neuro-humorais relacionados a esse modelo experimental podem estar influenciando, direta ou indiretamente, o padrão comportamental de auto-limpeza 15 minutos após a administração associada de formalina e nitroglicerina, no primeiro dia do experimento. Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para melhor elucidação dessas observações. Antagonistas opióides poderiam ser utilizados com a finalidade de avaliar o papel do sistema opióide nos efeitos observados quando da associação dos dois modelos, de dor orofacial e neurovascular de cefaléia.

Na análise do tempo despendido em *grooming* 30 minutos, 120 minutos e 240 minutos após a administração dos tratamentos propostos, não se observaram diferenças significativas, quer entre os grupos, quer entre as semanas de observação (Figuras 27, 28 e 29), confirmando dados dos experimentos 2 e 3. Parece haver uma dissociação entre os tempos em que há maior produção de óxido nítrico, representada pela atividade de GMPc durante os períodos de 2 e 4 horas (Torfgard *et al.*, 1989; Torfgard e Ahnler, 1991; Tassorelli *et al.*, 2004), e a medida comportamental em questão.

Quando da avaliação daquele parâmetro 24 e 48 horas após a instituição dos tratamentos em estudo, apareceram diferenças significativas entre as semanas, independentemente dos grupos, de modo que o tempo gasto em auto-limpeza foi maior na terceira semana do experimento, em comparação, respectivamente, com a segunda ou a primeira.

No experimento 4, também foram avaliadas as medidas de latência de retirada da cauda (*tail-flick*). Não se observaram diferenças significativas, quer entre os grupos, quer entre as semanas, nos períodos imediatamente antes (basal) e após 15 minutos, 30 minutos, 240 minutos, 24 horas e 48 horas da administração dos tratamentos propostos (Figuras 32 a 34, 36 a 35). Apenas no tempo de 2 horas observou-se aumento significativo das latências de retirada da cauda nas segunda e terceira semanas de observação em relação à primeira, independentemente dos grupos experimentais. Tal resultado pode ser atribuído à habituação dos animais à exposição ao aparelho, de modo que, com a repetição do teste, familiarizam-se com o estímulo aplicado e passam a demorar mais para retirar a cauda.

Esses resultados diferem dos de Costa e colaboradores (2005), que relataram estado hiperalgésico 2 a 4 horas após a administração de nitroglicerina, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg. Todavia, tal resultado poderia estar relacionado ao modelo utilizado por estes autores, que além de diferir do proposto neste experimento, também apresenta técnicas de indução a estresse crônico, com contenção dos animais por longos períodos.

Por meio da observação da evolução de peso corporal dos animais, é possível supor que a exposição dos animais aos modelos propostos não interferiu com seu estado de saúde geral. No decorrer das semanas, houve aumento gradual daquele peso, o que é o padrão habitual, esperado, para animais sadios.

Conclusões

- O número de cruzamentos (*crossings*) em campo aberto, utilizando o modelo de dor orofacial induzida pela formalina, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Com base nesse achado, sugere-se que o número de cruzamentos não é sensível à administração de formalina por via subcutânea.

- O número de respostas de orientação (*rearing*) em campo aberto, utilizando o modelo de dor orofacial induzida pela formalina, não se mostrou diferente daquele observado no grupo controle. Com base nesse achado, sugere-se que o número de respostas de orientação não é sensível à administração de formalina por via subcutânea.

- O tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*), em campo aberto, utilizando o modelo de dor orofacial induzida pela formalina, apresentou um valor superior ao grupo controle durante os primeiros 20 minutos do experimento. Com base nesse achado, sugere-se que esse deve ser considerado como o parâmetro representativo da resposta nociceptiva no modelo de dor orofacial induzida pela formalina durante esta janela temporal.

- O tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*), em campo aberto, utilizando o modelo neurovascular de ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina, não apresentou diferença em relação ao seu controle. Com base nesse achado, sugere-se que o comportamento de auto-limpeza não é sensível à administração desse vasodilatador sistêmico.

- O tempo gasto em reflexo de auto-limpeza (*grooming*), em campo aberto, no modelo associado de dor orofacial induzida pela formalina e ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina, apresentou uma redução em relação ao

grupo controle que recebeu apenas formalina por via subcutânea e salina por via intraperitoneal. Com base nesse achado, sugere-se que a nitroglicerina é capaz de reverter o aumento do comportamento de auto-limpeza induzido pela formalina subcutânea.

- A resposta nociceptiva, avaliada por meio da medida do reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*), no modelo de dor orofacial induzida pela formalina, não apresentou alterações significativas quando comparadas com o grupo controle. Com base nesse achado, sugere-se que este método não é adequado para avaliar resposta das vias nociceptivas relacionadas à ativação do trato trigeminotalâmico .

- A resposta nociceptiva, avaliada por meio da medida do reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*), no modelo neurovascular de ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina, não apresentou diferença com relação aos controles em nenhum momento do experimento. Com base nesse achado, sugere-se que a nitroglicerina não é capaz de desencadear uma resposta comportamental capaz de ser mensurada, ou este método não é sensível para avaliação nociceptiva neste modelo de nocicepção.

- A resposta nociceptiva, avaliada por meio da medida do reflexo de retirada da cauda a estímulo térmico nocivo (*tail-flick latency*), no modelo associado de dor orofacial induzida pela formalina e ativação trigeminal por administração sistêmica de nitroglicerina, apresentou alterações sugestivas de analgesia apenas 2 horas após administrado o tratamento, durante a segunda e terceira semana de experimento, porém o resultado não foi diferente do grupo controle. Com base nesse achado,

sugere-se que as alterações relacionadas a esta resposta nociceptiva está relacionada à habituação e o mesmo não é sensível para avaliação de atividade nociceptiva neste modelo.

Perspectivas

➤ Os estudos envolvidos nessa Dissertação contribuíram para a elaboração de dois capítulos de livros didáticos:

1. Ferreira MBC, Perla AS. Dores crônicas orofaciais. In: Wannmacher L, Ferreira MBC, eds. *Farmacologia Clínica para Dentistas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007: 231-249.
2. Ferreira MBC, Perla AS. Farmacologia do Sistema Nervoso Central. In: Wannmacher L, Ferreira MBC, eds. *Farmacologia Clínica para Dentistas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007: 109-115.

➤ A partir dos resultados obtidos dessa Dissertação, estão sendo elaborados três artigos, que estão em fase de conclusão e serão encaminhados para as revistas ***Pain*** e ***Cephalalgia***.

1. Estudo comportamental por meio da análise das medidas do reflexo de auto-limpeza e retirada da cauda no modelo de ativação periférica trigeminal secundário à administração de formalina subcutânea.
2. Avaliação da atividade nociceptiva por meio do estudo do tempo dispendido no reflexo de auto-limpeza, após ativação trigeminal sistêmica por administração de nitroglicerina por via intraperitoneal.
3. Influência da administração sistêmica de nitroglicerina no modelo orofacial de formalina.

- Os resultados obtidos nessa Dissertação também servirão de base para elaboração do projeto de Doutorado. Procurar-se-á mapear as vias nociceptivas, com suas respectivas estruturas, após a ativação da via trigeminal, tanto periféricamente, pela administração de formalina por via subcutânea, quanto sistemicamente, pela administração de nitroglicerina, por meio de estudos imunistoquímicos envolvendo expressão de *c-fos* e neuropeptídeos relacionados à fisiopatogenia das dores cefálicas, como CGRP e Substância P.

O mesmo processo também será aplicado no modelo que associa os dois métodos de ativação das vias trigeminais (central e periférico). Nele, também se estudará as vias moduladoras descendentes da nocicepção, especialmente no que tange o envolvimento das vias oxidonitrérgicas.

O maior conhecimento deste modelo poderá torná-lo uma ferramenta útil para o estudo de novos medicamentos no tratamento de dores orofaciais.

Referências Bibliográficas

1. Amir S, Amit Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. *Life Science* 1978; 23: 1143-1152
2. Anderson LC, Vakoula A, Veinote R. Inflammatory hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Archives of Oral Biology* 2003; 48: 161-169.
3. Aston-Jones G, Ennis M, Pierinebone VA, Nickell WT, Shipley MT. The brain nucleus *locus coeruleus* : restricted control of a broad efferent network. *Science* 1986; 234: 734-737
4. Bayliss VM. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fiber of the hind-limb an on the nature of the fibers. *Journal of Physiology* 1901; 26: 173-209.
5. Bartch T, Goadsby PJ. Increased responses in trigeminocervical nociceptive neurons to cervical input after stimulation of the dura mater. *Brain* 2003; 126: 1.801-1.813.
6. Basbaum AI. Memories of Pain. *Science & Medicine*. 1996; 3(6): 22-31
7. Basbaum AI, Jessell TM. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000: 472-491.
8. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience. Exploring the Brain*. New York: Williams & Wilkins Publishers; 1996: 340-345.
9. Bergerot A, Holland PR, Akerman S, Bartsch T, Ahn AH, MaassenVanDenBrink A, Reuter U, Tassoreli C, Schoenen J, Mitsikostas DD, van den Maagdenberg AMJM, Goadsby PJ.

Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder.
European Journal of Neuroscience 2006; 24: 1.517-1.534.

10. Bhargava H.N. Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *Genera. Pharmacology* 1995; 26: 1049–1053.
11. Bhargava HN, Bian JT. Effects of acute administration of L-arginine on morphine antinociception and morphine distribution in central and peripheral tissues of mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 1998; 61: 29–33.
12. Bliss T and Lømo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, 1973; 232: 331-356.
13. Bodnar RJ. Neuropharmacological and neuroendocrine substrates of stress-induced analgesia. *Annals of New York Academy of Science* 1986; 67: 345-360
14. Borges N, Sarmiento A, Azevedo I. Dynamics of experimental vasogenic brain oedema in the rat: changes induced by adrenergic drugs. *Journal of Autonomic Pharmacology* 1999; 19: 209-217.
15. Bormann J. Electrophysiology of GABA-A and GABA-B receptor subtypes. *Trends of Neuroscience* 1988; 11(3): 112-116.
16. Byers MR, Bonica JJ. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser

- JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 26-72.
17. Cadet R, Aigouy L, Woda A. Enhanced nociceptive behavior following conditioning injection of formalin in the perioral area of the rat. *Brain Research* 1995; 676: 189-195.
 18. Capasso A, Sorrentino L, Pinto A. The role of nitric oxide in the development of opioid withdrawal induced by naloxone after acute treatment with mu- and kappa-opioid receptor agonists. *European journal of pharmacology* 1998; 359 (2-3):127-131.
 19. Cesare P, McNaughton A. Peripheral pain mechanisms. *Current Opinion of Neurobiology* 1997; 7: 493-499.
 20. Cesselin F, Montastruc JL, Gros C, Burgoin S, Hamon M. Met-enkephalin levels and opioid receptors in the spinal cord of chronics suffering rats. *Brain Research* 1980; 191: 25-31.
 21. Chan RKW, Sawchenko PE. Spatially and temporally differentiated patterns of *c-fos* expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *The journal of Comparative Neurology* 1994; 348: 433-460.
 22. Chapman CR, Turner JA. Psychological aspects of pain. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 180-190.
 23. Chena LX, Qia YM, Wangb R, Duan X, Gao YF, Yang DJ. Roles of nitric oxide synthase

- inhibitor on antinociceptive effects of micro-opioid agonist in mice. *Protein and peptide letters* 2006;13(10):993-997.
24. Chudler EH, Bonica JJ. Supraspinal mechanisms of pain and nociception. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 153-179.
 25. Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neuroscience Letter* 1989; 103: 349-353.
 26. Clavelou P, Dallel R, Orliaguet T, Woda A, Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain* 1995; 62: 295-301.
 27. COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Manual para Técnicos em Bioterismo*. 2 ed. São Paulo: H. A. Rothschild; 1996. 259p.
 28. Coimbra F, Coimbra A. Dental noxious input reaches the subnucleus caudalis of the trigeminal complex in the rat, as shown by *c-fos* expression upon thermal or mechanical stimulation. *Neuroscience Letters* 1994; 173: 201-204
 29. Costa A, Smeraldi A, Tassorelli C, Greco R, Nappi G. Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letters* 2005; 383: 7-11.
 30. Dambisya YM, Lee TL. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *British Journal of Pharmacology* 1996; 117: 914–

918.

31. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain. *Journal Pharmacology Therapy* 1941; 72: 74-79.
32. Dray A, Urban L. New pharmacological strategies for pain relief. *Ann Rev Pharmacology Toxicology* 1996; 36: 253-280.
33. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
34. Durnett JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302(3): 839-845.
35. Edvinsson L, Uddman R. Neurobiology in primary headaches. *Brain Research Reviews* 2005; 48: 438-456.
36. Einsenberg E, Vos BP, Strassman AM. The NMDA antagonist Memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. *Pain* 1993; 54: 301-307.
37. Einsenberg E, Vos BP, Strassman AM. The peripheral antinociceptive effect of morphine in a rat model of facial pain. *Neuroscience* 1996; 72(20): 519-525.

38. Ferreira MBC, Perla AS. Dores crônicas orofaciais. In: Wannmacher L, Ferreira MBC, eds. *Farmacologia Clínica para Dentistas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007: 231-249.
39. Ferreira SH, Duarte I.D.G., Lorenzetti, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *European Journal of Pharmacology* 1991; 201: 121–122.
40. Fidecka S, Lalewicz S. Studies on the antinociceptive effects of sodium nitroprusside and molsidomine in mice. *Polish journal of pharmacology* 1997 ; 49 (6):395-400.
41. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
42. Gilbert SD, Clark TM, Flores CM. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. *Pain* 2001; 89: 159-165.
43. Goadsby PJ, Lambert GA, Lance JW. Differential effects on the internal and external carotid circulation of the monkey evoked by *locus coeruleus* stimulation. *Brain Research* 1982; 249: 247-254
44. Goadsby PJ, Adner M, Edvinsson L. Characterization of endothelium receptors in the cerebral vasculature and their lack of effect on spreading depression. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolic* 1996; 16: 698-704.
45. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine – Current understanding and treatment. *New England Journal Medicine* 2002; 346 (24): 257-270.

46. Goadsby PJ, Ahn AH. Animal models of headache. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. *The Headache*. 3 rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 213-220.
47. Goldim JR, Raymundo MM. *Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais*. 2 ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre/Grupo de Pesquisa e Pós-graduação; 1997. 30p.
48. Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: McGraw-Hill; 2001: 569-619.
49. Gyires, K. The role of endogenous nitric oxide in the gastroprotective action of morphine. *European Journal of Pharmacology* 1994 ; 255: 33–37.
50. Hans C, Hansen MD. Treatment of chronic pain with antiepileptic drugs: a new era. *Southern Medicine Journal* 1999; 92(7): 642-649.
51. Hayes RL, Bennett GL, Newlon PG, Mayer DJ. Behavior and physiological studies on non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Research* 1978; 155: 69-90
52. Headache Classification Committee of the international Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. Second Edition. *Cephalgia* 2004; 24(Suppl 1): 110-149.

53. Hargreaves R. New migraine and pain research. *Headache* 2007; 47[Suppl 1]: S26-S46.
54. Hebb DO. The organization of behavior: a Neuropsychological theory. 1949; New York: *Wiley*.
55. Herbet H, Moga Mm, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus if the nucleus of the solitari tract and the medullary reticular formation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 1990; 293: 540-580
56. Heyck H. Pathogenesis of migraine. *Research Clinical Study Headache* 1969; 2: 1-28.
57. Höllt V, Haarmann I, Millan MJ, Herz A. Sensitization of spinal neurons by non-noxious stimuli in the awake but not anesthetized state. *Anesthesiology* 1995; 73: 90-94.
58. Homayoun H, Khavandgar S, Namiranian K, Gaskari AS, Dehpour AR. The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice. *Epilepsy Research* 2002; 48(1-2): 33-41.
59. Homayoun H, Khavandgar S, Dehpour AR. The selective role of nitric oxide in opioid-mediated footshock stress antinociception in mice. *Physiology & behavior* 2003 ;79: (4-5): 567-573.
60. Hou WY, Shyu BC, Chen TM, Lee JW, Shieh JY, Sun WZ. Intrathecally administered c-fos antisense oligodeoxynucleotide decreases formalin-induced nociceptive behavior in adult rats. *European Journal Pharmacology* 1997; 329: 17-26

61. Huber JD, Hau VS, Borg L, Campos Cr, Egleton RD, Davis TP. Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283(4): H1531-H1537.
62. Hudpith, MJ. Glutamate: a role a normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. *British Journal of Anaesthesiology*. 1997; 78: 731-747
63. Hunskaar S and Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
64. Ichinose F, Miyazaki M, Goto T, Takahashi H, Terui K, Niimi Y, Uezono S, Morita S, Yanagida H. Electroencephalographic responses to the formalin test in rats. *Pain* 1999; 80: 251-256.
65. Institute of Laboratory Animal Research (ILAR), Commission on Life Sciences, National Research Council. *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals*. Washington, USA, National Academies Press; 1996. 140p.
66. Irwin S, Houde RW, Bennett DR, Hendershot LC, Seevers MH. The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* 1951; 101: 132-143.
67. Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental

- headache models. *Pain* 1989; 38: 17-24.
68. Iversen HK, Nielsen TH, Tfelt-Hansen P, Olesen J. Lack of tolerance of headache and radial artery diameter during a 7 hour intravenous infusion of nitroglycerin. *European Journal Clinical Pharmacology* 1993; 44: 44-47.
 69. Jacobson L, Mariano AJ. General considerations of chronic pain. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 241-254.
 70. Jones SE. Effect of psychological processes on chronic pain. *British Journal of Nursing* 1993; 2: 463-467.
 71. Juhasz G, Zsombok T, Jakab B, Nemeth J, Szolcsanyi J, Bagdy G. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia* 2005; 25: 179-183.
 72. Kachidian P, Astier B, Renaud B, Bosler O. Adrenergic innervations of noradrenergic locus coeruleus. A dual-labeling immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience Letter* 1990; 109: 23-29.
 73. Kappo K, Arulmani U, Heiligers JP, Garrelds IM, Willems EW, Doods H, Villalon CM, Saxena PR. Effects of the CGRP receptor antagonist BIBN4096BS on capsaicin-induced carotid haemodynamic changes in anaesthetized pigs. *British Journal of Pharmacology* 2003; 140: 329-338.

74. Kaube H, Keay KA, Hoskin KL, Bandler R, Goadsby PJ. Expression of *c-fos*-like immunoreactivity in the caudal medulla and upper cervical spinal cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat. *Brain Research* 1993; 629:95-102.
75. King TE, Joynes TL, Grau JW. Tail-flick Test II. The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behavioral Neuroscience* 1997; III(4): 754-767.
76. Ko S, Zhuo M. Central plasticity and persistent pain. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004; 1(2): 101-106.
77. Kosler P, Pokorný J. Altered blood-brain barrier permeability and its effects on the distribution of Evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. *Physiological Research* 2003; 52: 607-614.
78. Kolesnikov, Y.A., Pick, C.G., Ciszewska, G., Pasternak, G.W. Blockade of tolerance to morphine but not to opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 5162–5166.
79. Krabbe AA, Olesen J. Headache provocation by continuous intravenous infusion of histamine. Clinical results and receptor mechanisms. *Pain* 1980; 8: 253-259.
80. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 2001; 597-652.
81. Le Greves P, Nyberg F, Terenius L, Hökfelt T. Calcitonin gene related peptide is a potent

- inhibitor of substance P degradation. *European Journal Pharmacology* 1985; 115: 309-311.
82. Leong SK, Liu HP, Yeo JF. Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing c-Fos protein after formalin injection. *Brain Research* 2000; 855: 107-115.
83. LeResche L. Gender, cultural, and environmental aspects of pain. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 191-195.
84. Levine JD, Fields HD, Basbaum AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *Journal of Neuroscience* 1993; 13: 2.273-2.286.
85. Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goletz EJ. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leucocytes. *Science* 1984; 225: 743-745.
86. Levine JD, Taiwo Yo, Collins SD, Tam JK. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neuron terminals. *Nature* 1986; 323: 158-160.
87. Liang YC, Huang CC and Hsu KS. Characterization of long-term potentiation of primary afferent transmission at trigeminal synapses of juvenal rats: essential role of subtype 5 metabotropic glutamate receptors. *Pain*. 2005; 114: 417-428

88. Lin Q, Palecek J, Paleckova V, Peng YB, Wu J, Cui M et al. Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *Journal of Physiology* 1999; 81: 1075-1085
89. Lizasoain I, Leira R. Modelos experimentales de cefaleas. *Neurologia* 2003; 18(8): 452-461.
90. Lømo T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate of the hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1966; 68: suppl.128.
91. Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, aminoacids and nitric oxide. *Pharmacology Review* 1996; 48: 113-178.
92. May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for in syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1999; 19 : 115-127
93. Mailis A, Papagapiou M. Profile of patients admitted to the pain facility of a university affiliated acute care hospital. *Pain Clinic* 1993; 6:71-82.
94. Marbach JJ. Orofacial phantom pain: theory and phenomenology. *JADA* 1996; 127: 221-229.
95. Markenson JA. Mechanisms of chronic pain. *American Journal of Medicine* 1996; 101: 6-18.

96. Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M. Opioid systems and the newborn. *British Journal Anesthesiology* 1997; 79:787-795.
97. Marsh NM, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000; 27: 313-319.
98. McDonald CE, Gagnon MJ, Ellenberger EA, Hodges BL, Ream JK, Tousman SA, Quock RM. Inhibitors of nitric oxide synthesis antagonize nitrous oxide antinociception in mice and rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994; 269(2):601-608.
99. Messlinger K, Dostrovsky JO, Strassman AM. Anatomy and Physiology of Head Pain. In: Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan NM, Tfelt-Hansen P, Welch KMA, eds. *The Headache*. 3 ed. Chicago, Illinois: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 95-109.
100. Michel T. Treatment of myocardial ischemia. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11 ed. California, San Francisco: McGraw-Hill; 2006: 823-844.
101. Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 2002; 66: 355-474.
102. Mitsikostas DD, Sanchez del Río M. Receptor system mediating *c-fos* expression with trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Research Review* 2001; 35: 20-35.

103. Myers DE. Potential neurogenic and vascular roles of nitric oxide in migraine headache and aura. *Headache* 1999; 39: 118-124.
104. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacology Review* 1991; 43: 109-141.
105. Morey SS. Guidelines on migraine: Part 3. Recommendations for individual drugs. *American Family Physician* 2000a; 62: 2.145-2.148, 2.151.
106. Morey SS. Guidelines on migraine: Part 4. General principles of preventive therapy. *American Family Physician* 2000b; 62: 2.359-2.360, 2.363.
107. Morey SS. Guidelines on migraine: Part 5. Recommendations for specific prophylactic drugs. *American Family Physician* 2000c; 62: 2.535-2.539.
108. Morgan GE, Mikhail MS. Pain Management. In: Morgan GE, Mikhail MS, eds. *Clinical Anesthesiology*. 2 ed. Stamford: Appleton & Lange; 1996: 274-316.
109. Morton AJ, Reynolds DS. Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualized with trypan blue. *Journal of Neuroscience Methods* 1998; 79: 115-121.
110. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Annals of Neurology* 1984; 16: 157-168.

111. Moskowitz MA. Pathophysiology of headache: Past and present. *Headache* 2007; 47[Suppl 1]: S58-S63.
112. Nahas TR. O teste do campo aberto. In: Xavier GF. *Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso*. São Paulo: Plêiade; 1999: 197-215.
113. Needleman P. Tolerance to the vascular effects of glyceryl trinitrate. *The Journal of Pharmacology Experimental and Therapy* 1970; 171: 98-102
114. Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent a post training stressful stimulation. *Behavioral and Neurological Biology* 1987; 48: 304-309.
115. Nozaki K, Coccalini P, Moskowitz MA. Expression of c-fos-like immunoreactivity in brain stem after meningeal irritation by blood in the subarachnoid space. *Neuroscience* 1992; 49: 669-680.
116. Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible mechanism of migraine pain. *Neuroreport* 1993; 4: 1027-1030.
117. Olesen J, Thomsen LL, Lanssen LH, Olesen IJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 1995; 15: 94-100.
118. Olesen J, Thomsen LL. Nitric oxide in primary headaches. *Current Opinion in Neurology* 2001; 14: 315-321.

119. Okuda K, Sakurada c, Takahashi M, Yamada T, Sakurada T. Characterization of nociceptive responses and the spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin rats. *Pain* 2001; 92: 107-115.
120. Okuducu H, Onal AS. Is nitric oxide involved in the antinociceptive activity of tramadol? Findings in a rat model of neuropathic pain. *The Journal of the Turkish Society of Algology* 2005; 17(4): 31-40.
121. Öztas B, Kaya M, Çamurcu S. Influence of pregnancy on blood-barrier integrity during seizures in rats. *Pharmacological Research* 1993; 28(4): 317-323.
122. Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews* 2001; 22(40): 502-548.
123. Pelissier T, Pajot J, Dallel R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* 2002; 96: 81-87.
124. Pieribone VA, Aston-Jones G. Adrenergic innervations of the rat nucleus coeruleus arises predominantly from the C1 adrenergic cell group in the rostral medulla. *Neuroscience* 1991; 41; 525-542.
125. Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine. *Nature* 2003; Mayo(4): 386-398.
126. Pleuvry BJ, Lauretti GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacological Therapy* 1996; 71: 313-324.

127. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase – 2 activity. *Pain* 1995; 64: 345-355.
128. Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004; 28: 219-226.
129. Ren K, Dubner R. Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. *The Journal of Neurophysiology* 1996; 76: 3025-3037
130. Roveronir RC, Parada CA, Veiga MCFA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain* 2001; 94: 185-191.
131. Rygh LJ, Tjølsen A, Hole K, Svendsen F. Cellular memory in spinal nociceptive circuitry. *Scandinavian Journal of Psychology* 2002; 43: 153-159.
132. Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson Da, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1994; 59: 447-456
133. Sandkühler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 2000; 88: 113-118.
134. Schaible, H-G, Neugebauer V, Cervero F, Schmidt RF. Changes in tonic descending inhibition of spinal neurons with articular input during the development of acute arthritis en the cat. *The Journal of Neurophysiology* 1991; 29: 271-278

135. Share L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiology Review* 1988; 68: 1248-1284
136. Schoen J. Clinical neurophysiology of headache. In: Mathew NT, ed. *Neurologic Clinics (Advances in Headache)*. Philadelphia: Saunders Company 1997: 85-107.
137. Schünke M, Schulte E, Schumaker V, Voll M, Wesker K. Vias nociceptivas da Cabeça e Sistema Central de Inibição da Dor. In: Prometheus, atlas de anatomia: cabeça e neuroanatomia. Ed. Guanabara Koogan 2007: 332-335.
138. Sicuteri F, Del Bene E, Poggioni M, Bonazzi A. Unmasking latent dynociception in healthy subjects. *Headache* 1987; 27(4): 180-185.
139. Siegfried B, Netto CA, Izquierdo I. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behavioral Neuroscience* 1987; 101: 436-438.
140. Silberstein SD, Saper JR, Freitag FG. Migraine: diagnosis and treatment. In: Silberstein SD, Lipton RB, Dalessio DJ, eds. *Wolff's Headache and Other Head Pain*. Oxford: Oxford University Press; 2001: 121-237.
141. Spokes RA, Middlefell VC. Simultaneous measurement of plasma protein extravasation and carotid vascular resistance in the rat. *European Journal of Pharmacology* 1995; 281: 75-79.
142. Spruijt BM, Van Hooff JARA, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews* 1992; 72(3): 825-852.
143. Stainar H, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and

- non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30: 103-114.
144. Stefano GB, Salzet B, Rialas CM, Pope M, Kustka A, Neenan K, Pryor SC, Salzet M. Morphine and anandamide stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release. *Brain Research* 1997; 763: 63–68.
145. Strass AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Bursten R. Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous stimulation of facial skin in the rat. *Journal of Neurophysiology* 1993; 70: 1811-1821.
146. Taenzer P, Melzack R, Jeans ME. Influence of psychological factors on postoperative pain, mood, and analgesic requirements. *Pain* 1986; 24: 331-342.
147. Taiwo Y, Levine JD. Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. *Brain Research* 1989; 492: 397-399.
148. Taiwo Y, Levine JD. Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. *Brain Research* 1989; 492: 397-399.
149. Taiwo Y, Levine JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience* 1991; 48: 485-490.
150. Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Research* 1995a; 68: 167-181.
151. Tassorelli C, Joseph SA. NADPH-diaphorase activity and Fos expression in brain nuclei

- following nitroglycerin administration. *Brain Research* 1995b; 69: 37-44
152. Tassoreli C, Joseph SA. The systemic administration of nitroglycerin activates catecholaminergic and peptidergic nuclei in rat brain. *Peptides* 1996; 17: 443-449
 153. Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Neurochemical mechanisms of nitroglycerin-induced neuronal activation in rat brain: a pharmacological investigation. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1417-1424
 154. Tassoreli C, Joseph SA, Buzzi MG, Nappi G. The effects on the Central Nervous System of nitroglycerin – Putative mechanisms and mediators. *Progress in Neurobiology* 1999; 57: 524-606.
 155. Tassoreli C, Blandini F, Greco R, Nappi G. Nitroglycerin enhances cGMP expression in specific neuronal and cerebrovascular structures of the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2004; 27: 23-32.
 156. Temenbaum HC, Mock D, Gordon AS, Goldberg MB, Grossi MS, Locker D, Davis KD. Sensory and affective components of orofacial pain: is it all in your brain? *Critical Reviews of Oral Biological Medicine* 2001; 12(6): 455-468.
 157. Terman GW, Bonica JJ. Spinal mechanisms and their modulation. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 73-152.
 158. Thiel CM, Huston JP, Schwarting RJK. Hippocampal acetylcholine and habituation

- learning. *Neuroscience* 1998; 85: 1.253-1.262.
159. Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RJK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioral pharmacology and neurochemical assessments. *Neuroscience* 1999; 85: 243-251.
160. Thomsen LL, Olesen J. A pivotal role of nitric oxide in migraine pain. *Annals of New York Academy of Sciences* 1997; 835(1): 363-372.
161. Torfgard K, Ahnler J, Axelsson KL, Norlander B, Bertler A. Tissue distribution of glyceryl trinitrate and the effect on GMPc levels in rat. *Pharmacology and Toxicology* 1989; 64: 369-372.
162. Torfgard K, Ahnler J. Tissue levels of glyceryl trinitrate and the effect and GMPc after *in vivo* administration in rat, and the effect of tolerance development. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1991; 69: 1257-1261.
163. Turk DC, Okifuji A. Pain terms and taxonomies of pain. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:17-25.
164. Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans Blue fluorescence. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* 1988; 8: 282-284.
165. Zuckerman E. Enxaqueca. In: Melo-Souza SE, ed. *Tratamento das Doenças*

Neurológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000: 485-488.

166. Waeber C, Moskowitz MA. Therapeutic implications of central and peripheral neurologic mechanisms in migraine. *Neurology* 2003; 61(8 Suppl 4): S9-S20.
167. Wall PD, Melzack R. *Textbook of Pain*. 3 ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1994. 1.524p.
168. Waxham NM. Neurotransmitter receptor. In: Zigmond MJ, Bloom FL, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds. *Fundamental Neuroscience*. New York: McGraw-Hill; 1999: 235-268.
169. Wei EP, Moskowitz MA, Baccalini P, Kontos HA. Calcitonin gene related peptides mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside induced vasodilatation in feline cerebral arterioles. *Circulation Research* 1990; 70: 1313-1319.
170. Welch KMA. Headache. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: 867-894.
171. Welters ID, Fimiani C, Bilfinger TV, Stefano GB. NF-kB, nitric oxide and opiate signaling. *Medical hypotheses* 2000; 54: 263-268.
172. Wolff HG. The cerebral circulation in the action of amyl nitrite. *Archives Neurological Psychiatry* 1929; 22: 686.

173. Woolf C and Mannion R. Neuropathic Pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*. 1999; 353: 1059-1064
174. Uddman R, Edvinsson L. Neuropeptides in the cerebral circulation. *Cerebrovascular Brain Metabolic Reviews* 1989; 1: 230-252.
175. Valentino RJ, Martin DL, Suzuki M. Dissociation of *locus coeruleus* activity and blood pressure. Effect of clonidine and corticotrophin releasing factor. *Neuropharmacology* 1986; 25: 603-610
176. Van der Kuy PH, Lohman JJHM. The role of nitric oxide in vascular headache. *Pharmacological World Science* 2003; 25(4): 146-151
177. Viana MRM, Izquierdo LA, Barros DM, Souza MM de, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001; 34: 233-240.
178. Vincent, MB. Migraine pathophysiology. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 1998, 56(4): 841-851.
179. Vincent MB, White LR, Elsas T, Qvisgtad G, Sjaastad O. Substance P augments the rate of vasodilatation induced by calcitonin gene-related peptide in porcine ophthalmic artery in vitro. *Neuropeptides* 1992; 22: 137-141.
180. Vos BP, Hans G, Adriaansen H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face

grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. *Pain* 1998; 76: 173-178.

181. Yaksh TL. Spinal system and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends in Progress of Science* 1999; 20: 329-337.