

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JULIA RISSO PARISI

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE
DO TIPO 1 (TRPV1) NO CONTROLE DA DOR NEUROPÁTICA**

Alfenas-MG
2016

JULIA RISSO PARISI

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE
DO TIPO 1 (TRPV1) NO CONTROLE DA DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Neurociência e Comportamento
Orientador: Marcelo Lourenço da Silva

Alfenas-MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Parisi, Julia Risso.

Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) no controle da dor neuropática / Julia Risso Parisi. --
Alfenas, MG, 2016.

60 f.

Orientador: Marcelo Lourenço da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Nociceptores. 2. Neuropatia Ciática. 3. Medição da Dor. I. Silva,
Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD-616.0472

JULIA RISSO PARISI

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL TRANSIENTE
VANILÓIDE DO TIPO 1 (TRPV1) NO CONTROLE DA DOR NEUROPÁTICA**


A Banca Examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal Alfenas,
Área de concentração: Neurociência e Comportamento

Aprovado em: 22 /02/2016

Profº. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Profº. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Assinatura:



Profº. Dr. Cláudio Viegas Júnior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Maria de Fátima Risso Parisi e Luís Fernando Cerboni Parisi que, por muitas vezes, renunciaram seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Dedico também a minha avó Maria de Lourdes Cerboni que me ensinou agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo, minha maior luz, que me guia e me fortalece para sempre persistir nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela perfeita organização de cada peça do quebra-cabeça da minha vida, por me guiar, proteger, não me deixar fraquejar perante as dificuldades e pelas pessoas que abençoadamente colocou no meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva, que abriu as portas e me apresentou a ciência, mostrando sempre disposto a ajudar. Agradeço pela confiança depositada, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela paciência, compreensão, incentivo e amizade.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

Ao meu irmão, pela cumplicidade e constante apoio para que eu pudesse vencer mais uma etapa de minha vida, assim como toda minha família.

A Profa. Dra. Josie Resende pela sabedoria transmitida, incentivo e amizade.

Aos Técnicos do curso de fisioterapia, Luiz, Luciana e Dona Zélia e a secretária do programa, Antonieta pela disposição, ajuda e apoio.

As alunas de iniciação científica: Ana Jéssica, Livia, Letícia, Ana Carolina e Ana Cláudia, pela amizade construída e dedicação ao trabalho. A minha querida aluna de pré-ic Laura, pelos momentos e conhecimentos compartilhados no laboratório, pelo carinho e amizade.

Aos meus queridos amigos que o Labfex e a pós-graduação me deram de presente: Rafaela, Fred, Pedro, Isabella, Ravena, Roberta, Jadi, Ricardo e Herick por todos os momentos compartilhados, amizade, carinho e companheirismo. Obrigada por estarem sempre do meu lado, me dando força, sorrisos e conselhos. Vocês são essenciais!

As companheiras do Laboratório de Fisiologia: Mara, Tati, Layla e Ana Claudia por sempre estarem dispostas a ajudar e pela amizade construída.

A minha família construída na Clínica de Fisioterapia da Universidade Federal de Alfenas: Vera, Ieda, Cris, Danilo, Maicon, Mary e Gisnay, vocês me ensinaram

muito, sou eternamente grata por deixarem meus dias mais alegres, obrigada pelo companheirismo e incentivo!

A minha amiga e irmã Camila, por participar sempre de maneira positiva de todos os momentos da minha vida! A minha irmã de coração, Anália por todos os momentos compartilhados no nosso dia a dia.

Ao João Henrique, pelo companheirismo, cumplicidade e amor.

Aos meus amigos: Claudinho, Paula, Ana Laura e Larissa, que apesar da distância sempre participaram da minha vida, me aconselhando, incentivando e por sempre acreditarem em mim!

E a todos que participaram direta ou indiretamente dessa fase, serei eternamente grata!

RESUMO

A dor neuropática pode ser causada por lesões e/ou disfunções no sistema somatossensorial. A transmissão da informação nociceptiva ocorre através das fibras aferentes primárias que iniciam a transmissão da informação dolorosa e expressam o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1), um receptor-chave envolvido na transmissão e modulação de sinais de dor. Estudos destacam a capsaicina no tratamento eficaz de dor neuropática. A capsaicina causa uma depleção de substância P, alterando a transmissão da dor, produzindo uma dessensibilização. A resiniferatoxina (RTX), um agonista mais potente de TRPV1 que a capsaicina, inibe rapidamente a transmissão nociceptiva, como também proporciona analgesia duradoura em modelos comportamentais. Esses dados apoiam o desenvolvimento de novos analgésicos direcionados a neurônios que expressam o receptor TRPV1 tanto central como periféricamente. O presente estudo visa avaliar o efeito da RTX nos comportamentos hipernociceptivos de animais submetidos à modelo de lesão neuropática por constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Foram utilizados 112 camundongos *swiss*, machos (5-6 semanas; pesando 25 a 28g), subdivididos em 2 grupos: grupo tratamento prévio (pré-tratados com veículo e falso operados; pré-tratados com veículo e neuropáticos; pré-tratados com RTX e falso operados e pré tratados com RTX e neuropáticos) e grupo tratamento tardio (falso operados e tratados com veículo; falso operados e tratados com RTX; neuropáticos e tratados com veículo e neuropáticos e tratados com RTX). RTX/veículo foram administrados por via intratecal (i.t.), o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelos filamentos de Von Frey e foi utilizada a técnica de Western Blotting para avaliar a expressão dos receptores TRPV1 nos gânglios da raiz dorsal (DRG). Os resultados encontrados por meio da avaliação nociceptiva pelos filamentos de Von Frey demonstram que no grupo tratamento prévio houve um aumento significativo do limiar nociceptivo, demonstrando o efeito nociceptivo de RTX para o tratamento prévio, após CCI e no grupo tratamento tardio a dor neuropática induzida por CCI foi revertida após 1 hora da administração de RTX, persistindo por até 24 horas. Nos grupos dos animais neuropáticos tratados com veículo e nos grupos falsos-operados tratados com veículo e RTX não houve diferença entre os tempos e alteração do limiar nociceptivo. Nas análises das expressões de TRPV1,

foi observado que a expressão dos receptores TRPV1 reduziu de maneira significativa no grupo de tratamento tardio quando comparados com o grupo veículo e tratamento prévio, representando a depleção dos receptores TRPV1 após a administração i.t. de RTX em animais submetidos a CCI. Pode-se concluir que, os receptores TRPV1 participam ativamente no controle da dor neuropática, induzindo antinocicepção, bem como a administração i.t. de RTX 1 hora antes do modelo de dor demonstrou esse efeito, entretanto as expressões dos receptores TRPV1 não foram alteradas.

Palavras-Chave: Nociceptores, Neuropatia Ciática, Medição da dor

ABSTRACT

Neuropathic pain can be caused by injury and dysfunctions in the somatosensory system. The transmission of nociceptive information occurs via the primary afferent fibers that initiate the transmission of pain information and expressing the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), a receptor involved in the transmission and modulation of pain signals and is a main stimulus transducer. Studies featured capsaicin in the effective treatment of neuropathic pain. Capsaicin causes a depletion of substance P by changing the transmission of pain, producing desensitization. The resiniferatoxin (RTX), a more potent TRPV1 agonist capsaicin that rapidly inhibit nociceptive transmission, provides lasting analgesia in behavioral models. These data support the development of new analgesics directed to neurons that express the TRPV1 receptor both central and peripherally. This study aims to evaluate the effect of RTX in hypernociceptive behavior of animals subjected to the model of neuropathic chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI). 112 males mice Swiss were used, (5-6 weeks, weighing 25 to 28g), subdivided into 2 groups: previous treatment group (pretreated with vehicle and false operated; pretreated with vehicle and neuropathic; pretreated with RTX and operated false and pre-treated with RTX and neuropathic) and late treatment group (false operated and treated with vehicle, false operated and treated with RTX, neuropathic and treated with vehicle and neuropathic and treated with RTX). RTX/vehicle was administered intrathecally, the mechanical nociceptive threshold was evaluated by Von Frey filament and Western blotting technique was used to evaluate the expression of TRPV1 receptors on dorsal root ganglia (DRG). The results found by nociceptive evaluation by Von Frey filaments demonstrate that the previous treatment group showed a significant increase of nociceptive threshold, demonstrating nociceptive effect of RTX for previous treatment after CCI and treatment group later neuropathic pain induced by CCI It was reversed after 1 hour of RTX administration and persist for up to 24 hours. In groups of neuropathic vehicle treated animals and the false-operated group treated with vehicle and RTX there was no difference between the times and change the nociceptive threshold. In the analysis of expression of TRPV1 it was observed that the expression of TRPV1 receptors significantly reduced the late treatment group compared to the vehicle group, and previous treatment, representing depletion of the

TRPV1 receptors after intrathecal administration of RTX in animals subjected to CCI. It can be concluded that the TRVP1 receptors actively participate in controlling the neuropathic pain induced antinociception, as well as intrathecal administration of RTX 1 hour before to pain model showed that effect, however the expression of TRPV1 receptors were not changed.

Keywords: Nociceptors, Sciatic Neuropathy, Pain Measurement

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuições dos grupos experimentais do estudo.....	38
---	----

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1-	A superfamília do potencial receptor transitório (TRP).	24
Figura 2-	Representação esquemática do canal TRP.	25
Figura 3-	Aparato para avaliação nociceptiva mecânica por Von Frey filamentos.	34
Figura 4-	Avaliação nociceptiva mecânica por Von Frey Filamentos.	35
Figura 5-	Injeção i.t.	36
Figura 6-	Modelo experimental de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI).	37
Figura 7-	Delineamento experimental do estudo para grupo tratamento prévio.	39
Figura 8-	Delineamento experimental do estudo para grupo tratamento tardio.	40
Figura 9-	Detecção por <i>Western Blotting</i> da expressão dos receptores TRPV1 comparada com B-actina encontradas nos GDR dos tempos T1, T5 e T24 dos grupos Tratamento prévio e tratamento tardio com RTX. *p<0,05 em relação ao grupo tratamento quando comparado com os outros grupos.	43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-Efeitos do tratamento prévio com veículo ou RTX (2 µg, i.t), agonista para o receptor TRVP1, sobre o limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey filamentos em animais falso operados (SHAM) ou a constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....41
- Gráfico 2-Efeitos do tratamento tardio com veículo e RTX (2 µg, i.t.), um agonista para o receptor TRVP1, sobre o limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey filamentos em animais submetidos a falsa cirurgia (SHAM) ou a constrição crônica do nervo isquiático...42

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CCI	Injúria por Constrição Crônica do nervo Isquiático (<i>Chronic constriction injury</i>)
COX	Cicloxigenase
DRG	Gânglios da Raiz Dorsal
EDTA	Etilenodiaminatetracetato de sódio
EPM	Erro Padrão da Média
I.t.	Injecção Intratecal
IASP	Associação Nacional para o Estudo da <i>dor</i>
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
LGICs	Canais de Íons Controlados por Ligantes
NaCl	Cloreto de Sódio
NaF	Fluoreto de Sódio
NP40	Nonideto P-40
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RTX	Resiniferatoxina
SHAM	Falso Operados
TNF- α	Fator de Necrose tumoral alfa
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transiente Vanilóide do Tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DOR	16
2.2 DOR NEUROPÁTICA.....	19
2.3 CANAIS IÔNICOS.....	22
2.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO.....	23
2.5 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE DO TIPO 1 (TRPV1)	25
2.6 AGONISTAS DE DO RECEPTOR TRPV1: CAPSAICINA E RESINIFERATOXINA	26
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 ANIMAIS.....	33
5.2. AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA MECÂNICA.....	33
5.3 DROGAS E DILUENTES	35
5.4. VIA DE ADMINISTRAÇÃO DA DROGA.....	35
5.5. MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA.....	36
5.6. WESTERN BLOTTING.....	37
5.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
5.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	60

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência vivenciada por quase todos os seres vivos, constitui um instrumento de proteção que possibilita a detecção de estímulos físicos, mecânicos e químicos nocivos, além de sensibilizar sistemas que protegem o indivíduo contra futuras lesões. A dor está intimamente associada à redução da qualidade de vida, podendo acompanhar sintomas de ansiedade, depressão ou insônia. (DWORKIN et al., 2010). Diversas formas de dor podem ser classificadas. Dentre elas podemos destacar a dor neuropática, uma síndrome incurável, presente em milhões de pessoas no mundo (DWORKIN et al., 2007).

A dor neuropática é uma dor não-adaptativa que decorre de um dano ao sistema nervoso central ou periférico com estimulação inadequada dos nociceptores (ROWLAND; PEDLEY, 2011). Os nociceptores são terminações nervosas livres, localizados em diversos tecidos do corpo como pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos, sejam eles mecânicos, térmicos e químicos (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

A transmissão da informação nociceptiva ocorre através das fibras aferentes primárias, classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura, velocidade de condução, pela intensidade e qualidade da dor (MILLAN, 2002). As fibras nociceptivas de pequeno diâmetro, denominadas fibras C, possuem um importante papel na detecção de estímulos nocivos, dando início à transmissão da informação dolorosa e expressam o receptor de potencial vanilóide do tipo 1 (TRPV1). Este receptor é um canal iônico, não seletivo de cátions, mais permeáveis para íons de cálcio envolvido diretamente na transmissão e modulação de sinais da nocicepção e reconhece estímulos nocivos como temperatura, pH, produtos exógenos e mediadores inflamatórios (VIDAL et al., 2004; HAANPAA; TREEDE, 2012).

Estudos destacam a capsaicina no tratamento eficaz da dor neuropática (VIDAL et al., 2004). Seu mecanismo de ação é baseado na estimulação seletiva das fibras do tipo C e uma depleção de substância P, alterando a transmissão que resultaria a dor para os sistemas centrais produzindo uma dessensibilização (VIDAL et al., 2004). Foi demonstrado que a administração de capsaicina por via intratecal

(i.t) em ratos induz a degeneração seletiva nos neurônios sensoriais primários envolvidos na mediação da dor (HAANPAA; TREEDE, 2012).

A administração i.t. de resiniferatoxina (RTX), um agonista mais potente de TRPV1 que a capsaicina, produz a inibição rápida da via nociceptiva e também proporciona analgesia duradoura em modelos experimentais, devido à depleção dos receptores TRPV1 nas terminações nervosas sensoriais centrais (NEUBERT et al., 2003; BROWN, 2005; KISSIN, 2005; JEFFRY et al, 2009; BROWN et al, 2015), representando uma abordagem promissora para o controle da dor (IADAROLA; MANNES, 2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Abaixo será abordada uma breve revisão de literatura sobre as características da dor, dando ênfase na dor neuropática, os mecanismos fisiológicos relacionados ao TRPV1 e alguns de seus agonistas, como capsaicina e resiniferatoxina.

2.1 DOR

A dor é uma experiência desagradável vivenciada, constituindo um instrumento essencial de alerta do organismo através da detecção de estímulos físicos, mecânicos e químicos nocivos. Proporciona um rápido aviso ao sistema nervoso iniciando respostas de proteção adequadas para minimizar as lesões (FEIN, 2011). Fisiologicamente, a dor integra o controle homeostático, e é um dos sinais clínicos mais importantes para detecção e avaliação de diversas patologias (BASBAUM et al., 2009).

O comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP) em 1979 conceitua a dor como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrito em termos de lesões teciduais reais e potenciais” (ONOFRE et al., 2009). A dor pode ser clinicamente caracterizada em quatro categorias relacionadas a substratos anatômicos, fisiológicos e psicológicos: sensação nociceptiva, percepção, comportamento e sofrimento (LOESER, 1980).

A sensação nociceptiva, ou nocicepção, palavra originada do latim *nocere* que significa “ferir” é resultado da detecção de estímulos nocivos, por meio das terminações nervosas livres, que são os nociceptores; a percepção da dor depende de experiências psicológicas, emocionais e motivacionais. Portanto, o termo dor é mais apropriado para experiências humanas, enquanto que, em animais, utiliza-se o termo nocicepção e é avaliada indiretamente pela observação comportamental evidenciada (FERREIRA et al., 2009).

O primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânicas, térmicas e químicas em impulsos elétricos por terminais nervosos

especializados denominados nociceptores (PISERA, 2005). Os nociceptores são sensores primários periféricos que reconhecem os estímulos nocivos e são também, terminações nervosas livres de neurônios de primeira ordem. A função destes é preservar a homeostasia tecidual, apontando uma injúria potencial ou real, sendo considerados neurônios pseudounipolares, no qual, o ramo axonal distal se dirige à periferia e o ramo axonal proximal ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral (LOESER; MELZACK, 1999).

Em condições fisiológicas, os nociceptores possuem alto limiar de ativação, ou seja, estímulos de baixa intensidade não desencadeiam ativação dessas fibras. Os estímulos nociceptivos, sejam eles físicos (mecânicos ou térmicos de alta intensidade) ou químicos (prostaglandina, serotonina, bradicinina, capsaicina e/ou prótons, por exemplo), são detectados pelos nociceptores localizados nos diferentes tecidos, principalmente na pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores que inervam a cabeça e o pescoço compõem os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares, principalmente, no gânglio trigeminal. Já os corpos celulares de fibras que inervam o tronco e membros se encontram nos gânglios da raiz dorsal (DRG) da medula espinal (JULIUS, 2001; MILLAN, 2002).

A transmissão da informação nociceptiva ocorre através das fibras aferentes primárias, classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura, velocidade de condução, pela intensidade e qualidade da dor. As fibras aferentes são essencialmente classificadas em dois tipos: 1) fibras C: finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa, e 2) fibras A- δ : médias (2 a 6 mm de diâmetro), pouco mielinizadas, de condução intermediária (2 a 30 m/s) e responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras A- β , de maior diâmetro e muito mielinizadas, responsáveis pela detecção de estímulos inócuos (ex. táteis), que podem passar a responder como nociceptores durante certos processos patológicos, como nas neuropatias, onde ocorre uma plasticidade neuronal (BASBAUM et al., 2009). As fibras C respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, sendo assim chamadas de polimodais e possuem um importante papel na detecção de estímulos nocivos, dando início à transmissão da informação dolorosa e expressam os receptores de potencial transitório (TRP) que são classificadas em grupos, de acordo com sua constituição e a localização de

seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinal (JULIUS, 2001; MILLAN, 2002). As fibras A- δ respondem apenas a estímulos nocivos mecânicos e térmicos expressam também os receptores TRP no DRG (JULIUS, 2001; MILLAN, 2002).

A informação nociceptiva é transmitida pelos nociceptores para sistema nervoso central, chegando ao corno dorsal da medula espinal, onde ocorrem sinapses com neurônios de segunda ordem e a liberação de diversos neurotransmissores, como: glutamato, substância P e também sofre modulações excitatórias e/ou inibitórias. (LIU et al., 1997; BASBAUM et al., 2009). O corno dorsal da medula espinal é didaticamente dividido em 10 lâminas (I-X), sendo a lamina I a mais superficial a partir da região dorsal (REXED, 1954). As lâminas mais superficiais são denominadas nociceptivas, e as mais profundas respondem a uma grande variedade de estímulos, de diversas intensidades e naturezas (FERREIRA et al., 2009). A informação nociceptiva ascende pelos tratos nervosos espinotalâmico ou espinoreticulotalâmico em direção ao tálamo, tronco cerebral (núcleo parabraquial) e amígdala. No tálamo, essa informação é redirecionada para o córtex somatossensorial, onde as informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso são percebidas (MILLAN, 2002; BASBAUM et al., 2009).

Dois tipos de dor podem ser destacados: a dor aguda e crônica. Muitas vezes, a dor aguda é decorrente de um quadro inflamatório e este é caracterizado pela presença de diversos sinais além da dor, como o edema e a migração de leucócitos para o local da lesão. Em muitos casos, a dor inflamatória não é resolvida pelo próprio organismo, nem mesmo com terapias medicamentosas, podendo se tornar um quadro crônico (KALSO et al., 2004). A dor crônica é assim denominada quando extrapola a função de reflexo e/ou defesa do organismo (condições fisiológicas), associada à redução da qualidade de vida e pode ser acompanhada de ansiedade, depressão ou insônia (DWORKIN et al., 2010; KALSO et al., 2004).

A dor ainda pode ser classificada amplamente como dor nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva possui função protetora, alertando quanto à presença de uma lesão, ocorrendo sensibilização de nociceptores periféricos e alteração do sistema nervoso central. Sendo fator decisivo que leva o paciente procurar os cuidados médicos (JI et al., 2003). A dor nociceptiva ocorre em resposta a estímulos nocivos e se mantém presentes apenas quando estes são

mantidos. O estímulo e a sensação dolorosa são diretamente proporcionais (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A dor inflamatória é a resposta à lesão, seguida de um processo inflamatório, normalmente com término e reparo da lesão não ocorre mais a dor. Pode-se observar a presença de alodinia, onde estímulos antes inócuos são detectados como estímulos dolorosos. A hiperalgesia também está presente, onde os estímulos nocivos provocam de maneira exagerada e prolongada a dor (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A dor neuropática é uma dor não adaptativa que decorre de um dano ao sistema nervoso central ou periférico e pode induzir dor na ausência de estimulação dos nociceptores (alodinia) e também de uma resposta dolorosa exacerbada a estimulação dos nociceptores (hiperalgesia) (ROWLAND; PEDLEY, 2011).

2.2 DOR NEUROPÁTICA

Atualmente, a dor neuropática, segundo a IASP, pode ser definida como a dor iniciada ou causada por uma lesão ou disfunção primária do sistema nervoso (SCHESTATSKY, 2008), podem acometer raízes e nervos periféricos, nervos cranianos, medula espinal ou cérebro, são classificadas como dor neuropática (MERSKEY, 1994). A caracterização da dor neuropática é complexa e heterogênea, pois os sintomas podem oscilar no tipo, na intensidade, no tempo dentre outros fatores. Mas, as principais características da dor neuropática são hiperalgesia (sensação dolorosa aumentada a estímulo doloroso), dor espontânea e alodinia (dor provocada por estímulos não nocivos). Outros sintomas também podem ocorrer, como hipersensibilidade, inflamação neurogênica, extraterritorialidade (dor em locais até então não afetados), entre outros (WALL; GUTNICK, 1974). Essas manifestações estão associadas em alterações no sistema somatossensorial, com sensibilização dos neurônios aferentes primários periféricos e neurônios centrais (BARON; BINDER, 2004).

O dano ao tecido nervoso resulta em aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos, assim como, estímulos inócuos passam a ser percebidos como

dolorosos. A hiperalgesia neuropática é decorrente das alterações centrais ou espinhais e a sensibilização dos nociceptores (BARON; BINDER, 2004).

Uma vez que a dor neuropática é gerada, a hipersensibilidade pode persistir por períodos prolongados, mesmo que a causa original tenha cessado, como após trauma do nervo. No entanto, o progresso da doença primária, tais como *diabetes mellitus* ou a compressão nervosa geram danos ao sistema nervoso. A dor neuropática não é uma consequência inevitável de lesões neurais, todavia a dor está associada com o dano neuronal agudo e geralmente ocorre a transição para a dor neuropática crônica. Essa transição está mais evidente após lesões nervosas cirúrgicas onde a extensão e duração da lesão estão bem definidas (KEHLET et al., 2006).

Frequentemente, o dano de um nervo periférico gera um neuroma, estrutura que desenvolve mudanças na excitabilidade neuronal, suficientes para gerar potenciais de ação espontâneos, e conduzir o influxo sensorial independente da estimulação periférica (LIU, et al., 2001; DEVOR, 2006). A hiperexcitabilidade neuronal pode decorrer do aumento da expressão de canais de sódio, que acarreta no aparecimento de fenômenos como a dor espontânea e a sensibilização de neurônios do sistema nervoso periférico e central (DEVOR, 2006).

Quando um nervo é lesado, alguns componentes da resposta inflamatória são ativados, resultando na liberação de mediadores e no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão. A presença de células de *Schwann*, neutrófilos, macrófagos e mastócitos contribuem para que axônios que sofrem decomposição da bainha de mielina sejam removidos e ocorra a síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, num fenômeno conhecido como degeneração Walleriana (TRACEY; WALKER, 1995). A presença de serotonina, substância P, histamina, bradicinina, citocinas, TNF- α , IL-1 β e IL-6, entre outras, assim como de produtos das vias da ciclooxigenase (COX) são capazes de ativar e/ou sensibilizar as fibras sensoriais periféricas, participando ativamente no desenvolvimento da hiperalgesia em condições de dor neuropática (SOMMER; KRESS, 2004).

A sensibilização central e periférica pode ser identificada especialmente pela redução do limiar nociceptivo, ou seja, aumento na responsividade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal a estímulos diversos. Desta forma, ocorrem

alterações plásticas nos neurônios e células envolvidas na transmissão nervosa e manutenção dos neurônios e nas células da glia (WOOLF, 2011). As alterações plásticas na dor neuropática costumam ocorrer no corno dorsal da medula espinal, neurônios de projeção nas lâminas I e V, assim como também nos neurônios das vias descendentes de controle da dor (WHITE; FELDMAN; MILLER, 2009). Alguns exemplos de alterações plásticas que ocorrem na dor neuropática e contribuem para a facilitação do estímulo doloroso são: o aumento da síntese e liberação de aminoácidos excitatórios, e a redução de aminoácidos inibitórios, o aumento da expressão de canais de sódio tetrodoxina-resistentes, o fechamento de canais de potássio dependentes de trifosfato de adenosina (ATP) e a ativação de células gliais (SOTGIU; BIELLA, 2000; CASALS-DÍAZ; VIVÓ; NAVARRO, 2009). Por consequência, os neurônios sensibilizados permitem que impulsos nervosos normalmente não nocivos provoquem dor (alodinia) e a resposta a estímulos que já provocavam dor é intensificada (hiperalgesia) (JI et al., 2003). Estudos demonstram que a hiperalgesia crônica induzida por lesão nervosa libera mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os receptores TRPV1 de maneira constante (KISSIN; FREITAS; BRADLEY, 2007).

Na prática clínica, a dor neuropática é considerada de difícil tratamento, devido ao inadequado entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (ALEY; LEVINE, 2002; SAH; OSSIPO; PORRECA, 2003). E, além disso, tratar-se de uma experiência multidimensional, que integra funcionalmente estruturas do sistema límbico e cortical, para iniciar a percepção da dor e as respostas a esta injúria (HUNT; MANTYH, 2001). As opções terapêuticas para o controle da dor neuropática têm aumentado nos últimos anos (O'CONNOR; DWORKIN, 2009). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos dos tratamentos não é satisfatória. Os tratamentos utilizados na prática clínica incluem intervenções neurocirúrgicas, tratamentos medicamentosos como antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, administração sistêmica de anestésicos locais, agentes tópicos, analgésicos além do tratamento não medicamentoso como fisioterapia (GALER, 1995; SAH; OSSIPO; PORRECA, 2003; O'CONNOR; DWORKIN, 2009).

Para compreensão sobre a dor neuropática estudos são cada vez mais necessários buscando esclarecer totalmente seus mecanismos, dessa forma na

literatura encontram-se diversos modelos experimentais de dor neuropáticas (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Dentre os modelos destaca-se a injúria por constrição crônica do nervo isquiático, traduzida do inglês como *Chronic constriction injury* (CCI) (BENNETT; XIE, 1988) modelo de fácil execução e mimetiza os sinais clínicos, primariamente descrito em ratos (SELTZER *et al.*, 1999) e modificado para camundongos (MALBERG; BASBAUM, 1998).

2.3 CANAIS IÔNICOS

A membrana plasmática é constituída por lipídios e proteínas, essas proteínas possuem uma região especializada, denominada região de poro, que formam canais e permitem a passagem de íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-). Os canais iônicos sustentam o potencial de receptor e o potencial de membrana, que são submetidos a uma transição de um estado fechado para aberto, de maneira regulada ou controlada por uma alteração conformacional da comporta do canal. O resultado é o estímulo sensorial ou do transmissor sináptico envolvido, na transmissão sináptica, o transmissor sináptico, ou seja, o ligante interage com os sítios extracelulares do canal de íons da membrana pós-sináptica e as comportas se abrem esses canais de íons controlados por ligantes (LGICs), também chamados de canais ionotrópicos. Em muitos estímulos sensoriais, um segundo mensageiro intracelular é gerado no processo de transdução sensorial, que reage no canal com abertura da comporta (GUYTON; HALL, 2006; FEIN, 2011). Cada canal tem uma permeabilidade típica a diferentes íons, condutância, mecanismos de abertura e de fechamento, agonistas e antagonistas típicos, dependência da voltagem e características de regulação adicionais. A ativação de canais iônicos pode ocorrer diretamente por voltagem ou ligação entre ligantes, ou de maneira indireta, por meio de uma série de eventos moleculares e produção de segundos mensageiros (MINKE; COOK, 2002). A maioria dos canais iônicos possuem três, quatro ou cinco subunidades, organizados em simetria circular, formando um único poro aquoso e cada subunidade tem apenas um único domínio de poro (FEIN, 2011).

Estímulos próprios, tais como: deformação mecânica no tecido e aumento ou diminuição da temperatura no tecido são exemplos de estímulos que podem regular diretamente os canais de íons na membrana plasmática do nociceptor, originando o potencial do receptor. Sequencialmente, ocorrem alterações locais no meio extracelular resultado da liberação ou exposição de moléculas do tecido lesionado, ou seja, moléculas que normalmente são encontradas no interior das células ou na membrana celular podem agora ser encontradas ou expostas ao fluido extracelular, onde podem se ligar aos receptores do nociceptor. Por fim, as moléculas que entram na região ferida, como parte da resposta inflamatória do organismo ao estímulo, e pode se ligar aos receptores de membrana do nociceptor. Quaisquer umas destas três possibilidades podem participar na transdução de sinal do nociceptor. A família dos canais de cátions do receptor de potencial transitório (TRP) merece destaque, uma vez que, vários de seus membros são implicados na transdução de sinal do nociceptor. (GUYTON; HALL, 2006; FEIN, 2011).

2.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO

A superfamília do receptor potencial transitório (TRP) codifica proteínas de membrana que funcionam como canais iônicos. A partir da homologia de proteínas, os membros da família de canais TRP podem ser subdivididos em subfamílias (figura 1). Os membros desta família são encontrados em leveduras, invertebrados e vertebrados (NILIUS; OWSIANIK, 2011). Funcionalmente, os TRP podem ser caracterizados como canais catiônicos, não-seletivos, embora em sua maioria apresentem características de permeabilidade a íons, sendo alguns deles altamente seletivos para Ca^{2+} (MINKE; COOK, 2002), podendo ser ativados por uma diversidade de estímulos com graus diferentes de seletividade. Os canais TRP quando ativados permitem o influxo de cátions para a célula, provocando uma despolarização, que por sua vez, pode gerar um potencial de ação ou não, devido a sua característica transitória (CLAPHAM, 2003). Estas contribuições são essenciais para diversos processos fisiológicos, que vão desde as funções sensoriais, como: transdução, nocicepção e sensação de temperatura e funções homeostáticas, como:

funções motilidade, contração do músculo e o controle vasomotor (MINKE; COOK, 2002).

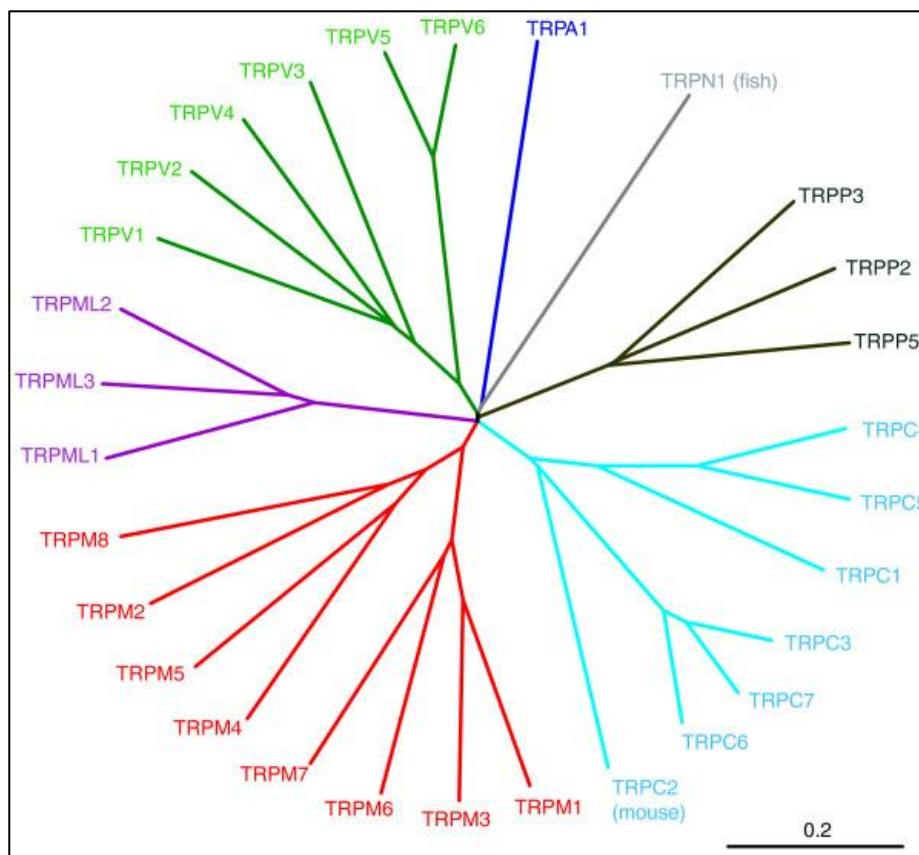


Figura 1- A superfamília do potencial receptor transitório (TRP).
Fonte: Nilius;Owsianik, 2011.

Canais TRP são encontrados em muitos órgãos, principalmente no cérebro, coração, rins, testículos, ovários, pulmão, fígado, baço, intestino, próstata, placenta, útero e tecidos vasculares. São expressos em quase todos os tipos de células, incluindo as células neuronais, tais como os neurônios sensoriais aferentes primários (MINKE; COOK, 2002; NILIUS; OWSIANIK, 2011).

A estrutura primária dos monômeros dos canais TRP é constituída por seis domínios transmembrânicos com um domínio formador de poro entre o quinto (S5) e o sexto (S6) segmentos, além de regiões C e N-terminais direcionadas para a região intracelular como visto na figura 2 (MINKE; COOK, 2002; CLAPHAM, 2003). A superfamília de canais TRP é dividida em dois grupos dependendo das sequências e diferenças topológicas apresentadas por esses canais. Sua nomenclatura é baseada na ordem de descoberta, substâncias que ativam funções fisiológicas,

genes, doenças relacionadas, ou características estruturais (MINKE; COOK, 2002; NILIUS;OWSIANIK, 2011).

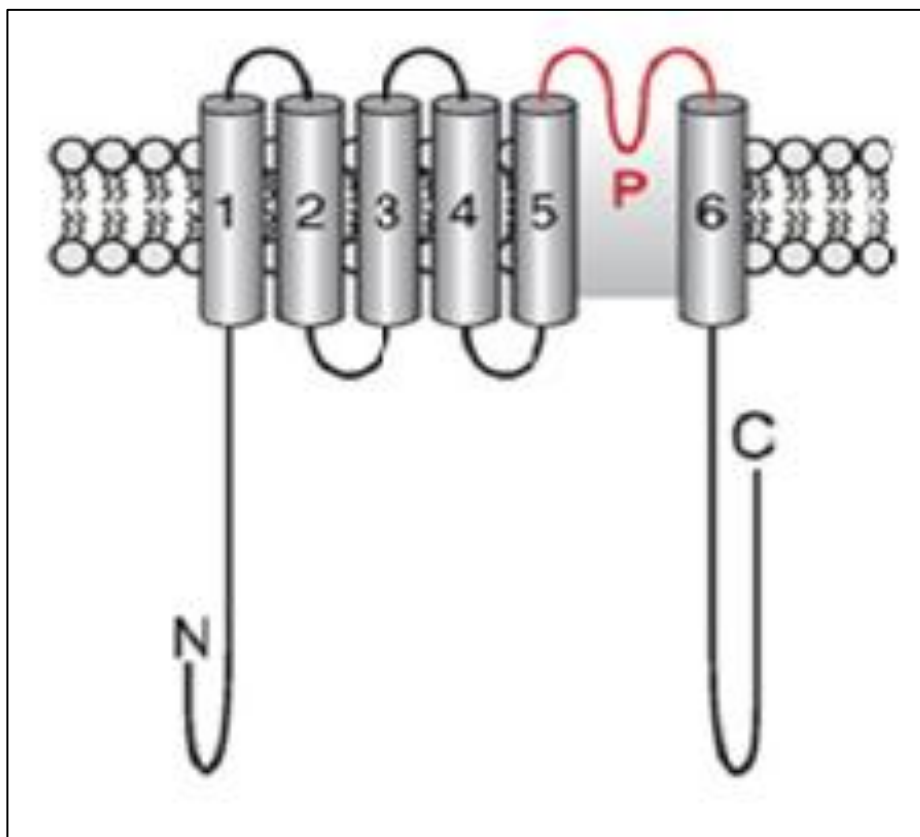


Figura 2- Representação esquemática do canal TRP.
Fonte: Modificado de Firth; Remillard; Yuan, 2007

2.5 RECEPTOR DE PONTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE (TRPV1)

O receptor TRPV1 é um importante receptor-canal iônico pertencente à família dos TRP, sendo expresso nos terminais centrais e periféricos dos neurônios sensoriais. (LATORRE et al., 2007). Recebem esse nome devido ao fato de serem ativados por compostos contendo o grupo vanilil, como por exemplo, a capsaicina (8-metil-*N*-vanilil-6-nonenamida), substância presente nas pimentas chili (LATORRE et al., 2007; NILIUS;OWSIANIK, 2011) e RTX, substância presente no látex do cacto *euphorbia resinifera*, que possui em sua estrutura química o grupamento homovanilil (SZALASSI; BLUMBERG, 1999). O TRPV1 foi o primeiro receptor identificado com sensibilidade à temperatura, denominado termoreceptor (CATERINA et al., 1997), é também considerado, um receptor-chave envolvido na

transmissão e modulação de sinais de dor e é um transdutor importante de estímulos nocivos como: calor (sensíveis à temperatura 37 a 43 °C) ou pH abaixo de 6,5 e certos produtos exógenos. Este receptor é sensibilizado também por mediadores inflamatórios responsáveis pela dor inflamatória resultante de lesão de tecido (FEIN, 2011; NILIUS;OWSIANIK, 2011; HAANPÄÄ; TREEDE, 2012).

A inibição do canal de cátions do TRPV1 parece ser uma abordagem lógica para produção de analgesia, entretanto, a situação não é simples já que os receptores TRPV1 não são expressos somente nos nociceptores, como também em uma variedade de outros tipos de células, incluindo: os queratinócitos, as células pancreáticas, as células endoteliais, os linfócitos, os macrófagos e as células de diferentes regiões do cérebro. Sua presença, em todos esses tipos de células e em diferentes partes do corpo, sugere que o TRPV1 é estimulado normalmente por um ligante endógeno (endovanilóide). É importante salientar, que existem evidências que sugerem a ativação do TRPV1 por seu ligante endógeno sendo essencial para a manutenção da temperatura corporal, sendo improvável então que possam ser desenvolvidos para utilização sistêmica, como agente específico no tratamento da dor (FEIN, 2011).

2.6 AGONISTAS DE DO RECEPTOR TRPV1: CAPSAICINA E RESINIFERATOXINA

A capsaicina, um agonista altamente seletivo para TRPV1, com peso molecular de 305,41g/mol, ingrediente pungente da pimenta chili, que ocasiona a sensação de queimação ou picante, foi isolada pela primeira vez no século XIX. Cristovão Colombo descreve ter comido pimenta chili com nativos no Novo Mundo, há mais de quinhentos anos (FEIN, 2011; HAANPÄÄ; TREEDE, 2012). Os efeitos da capsaicina são entendidos, devido as suas ações excitatórias e dessensibilizantes em nociceptores polimodais. Estudos eletrofisiológicos revelaram que a capsaicina despolariza os neurônios do DRG, sugerindo que o efeito excitatório específico envolve um aumento da permeabilidade da membrana aos íons Na^+ e/ou Ca^{2+} , pela diminuição da resistência nos neurônios à entrada desses íons (FEIN, 2011). A

capsaicina induz o aumento da concentração intracelular de cálcio, no qual, indica não só a abertura do canal não-seletivo e a despolarização, mas também o início da dessensibilização do receptor, conseqüentemente induz a resposta do limiar dor reduzido (SZALLASI; BLUMBERG, 1999; NOLANO et al., 1999). Um desafio no desenvolvimento de medicamentos com capsaicina foi utilizar sua ação para dessensibilização sem expor os pacientes a dor induzida por ativação do receptor TRPV1 (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012).

Nicholas Jancsó, em 1968 demonstrou a atuação da capsaicina, pela indução inflamatória dessa substância nas patas, nos olhos de ratos e também na pele em dois indivíduos com lesões de nervos periféricos, apresentando peles normais ou desnervadas. Foi utilizado anestésico local para observar a presença ou não de inibição da resposta inflamatória induzida pela capsaicina. Assim, concluíram que a inflamação não foi inibida pelo anestésico, mas que era prevenida pela dessensibilização (estado refratário duradouro, onde a pele tratada se torna relativamente resistente à capsaicina, outros agentes químicos e ao calor nocivo) causada por esta substância (JANCSÓ 1968). Em outro estudo anterior a capsaicina gerou dessensibilização, além de insensibilidade, dor e vasodilatação em ratos (JANCS; JANCSÓ-GABOR, 1949).

Nos anos 1959 e 1960, Jancso et al administraram a capsaicina de maneira tópica, provocando uma reação inflamatória dolorosa, seguida por uma reação aguda, demonstrando que a área da administração desenvolve um aumento do limiar de percepção a outros estímulos químicos e tem a duração de vários dias (JANCSO; JANCSO-GABOR, 1959; JANCSO, 1960). Anos depois, um estudo demonstrou a administração de maneira sistêmica (intraperitoneal), em animais adultos, no qual ocorreu uma dessensibilização generalizada a irritantes químicos cutâneos que permanece até 60 dias (SZOLCSANYI, 1975). Em 1977 Jancso et al (1987) demonstraram que uma única dose de capsaicina, 50 mg/kg, via subcutânea em animais neonatais, suprime permanentemente a inflamação cutânea induzida por irritantes químicos. Jancso et al. (1987) e Scadding (1980) demonstraram que a administração intradérmica de capsaicina leva à perda irreversível dos receptores TRPV1 devido a distribuição sistêmica em roedores neonatos, e a dessensibilização transitória de TRPV1 no local da administração em humanos adultos, podendo relacionar a dor, a dessensibilização e degeneração, com o uso de capsaicina a uma

estimulação de um subgrupo específico de fibras sensoriais, sensíveis a outros irritantes e ao calor nocivo (SCADDING, 1980). Ainda McMahon (1991) demonstrou que a aplicação tópica repetida de capsaicina na pata traseira de ratos não lesiona o nervo isquiático ou resulta na perda de neurónios do DRG.

Estudos destacam a capsaicina no tratamento eficaz de dor neuropática (VIDAL, 2004; KANAI et al., 2005; KISSIN et al., 2007). Seu mecanismo de ação é baseado na estimulação seletiva das fibras do tipo C, não-mielinizadas, que causam a liberação da substância P e, eventualmente de outros neurotransmissores, contribuindo para a sensibilização central (CURY et al., 2011). A capsaicina causa uma depleção de substância P, alterando a transmissão que resultaria a dor para os sistemas centrais produzindo uma dessensibilização (VIDAL, 2004). Ela dessensibiliza sem expor aos pacientes a TRPV1 (dor induzida por ativação) (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012). O uso de doses elevadas (peso 10 % em volume [w/v] e peso por peso [w/w] formulações), dessensibiliza totalmente os neurônios que expressam receptores TRPV1 em humano dentro de poucos dias, ou até mesmo sobre uma única aplicação (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012). A administração i.t. de capsaicina quebra a conexão de todas as fibras com a medula espinhal e provoca perda de longa duração da sensibilidade ao calor e pode induzir a degeneração seletiva de uma série distinta de neurônios sensoriais primários envolvidos na mediação da dor (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012).

Na prática clínica a aplicação tópica de capsaicina 8% tem se mostrado eficaz no tratamento da dor neuropática (FINNERUP; SINDRUP; JENSEN, 2010). Haanpää e Treede (2012) citam que a história do estudo de capsaicina é de suma importância para a farmacognosia, sendo uma alternativa para melhorar os medicamentos tradicionais. Ainda assim, é necessário encontrar o alvo molecular exato onde ela exercia suas ações, uma das hipóteses é de que cada neurônio sensorial expressa um receptor específico para esta substância.

A RTX, um diterpeno com massa molecular de 628,71g/mol, presente no látex seco da planta *Euphorbia resinifera*, um cacto comum encontrado na região do Marrocos possui mecanismo de ação análogo à capsaicina, como a pungência, inflamação neurogênica e alteração da temperatura corporal (HERGENHAHN et al., 1975; SZALLASI; BLUMBERG, 1989; SZALLASI; BLUMBERG, 1990). Porém, seu efeito dessensibilizante é mil vezes mais potente que a capsaicina (SZALLASI;

BLUMBERG, 1990). A RTX é o mais potente entre todos os agonistas do receptor TRPV1 endógenos e sintéticos, sendo altamente seletiva para os terminais nervosos sensoriais que expressam receptores TRPV1, sem afetar a propriocepção e função motora (NEUBERT et al. 2003; KARAI, 2004; BROWN et al., 2015).

Estudos realizados em animais mostraram que a RTX atua de maneira satisfatória para os tratamentos de modelos de dor inflamatória, dor incisional pós-operatória e dor do câncer ósseo em diferentes vias de administração como: sistêmica, subcutânea, i.t., epidural, intraganglionar, perineural e diretamente nas terminações nervosas (JEFFRY et al., 2009; NEUBERT et al. 2003; NEUBERT et al. 2008; KARAI, 2004; KISSIN, 2005; LEE et al., 2015; BROWN et al, 2015). Representando uma abordagem viável e versátil para o controle da dor além de não apresentar efeitos colaterais importantes ou tolerância, como no caso dos receptores opióides (IADAROLA; MANNES, 2011).

Estudos demonstram que a administração por via subcutânea de RTX (100-300 mg/kg) pode produzir analgesia de longa duração (SZABO, 1999; OSSIPOV, 1999), a administração por via perineural, em doses menores, também atua no controle de longa duração da dor localizada sem grandes reações sistêmicas. Porém esta via não é considerada adequada para a dor severa em uma doença específica, que possui características geralmente difusas e não locais (KARAI, 2004; KISSIN, 2005). A administração epidural, recentemente documentada, demonstrou efeitos positivos para o tratamento do modelo de dor neuropática em ratos, apresentado um aumento significativo no limiar nociceptivo (LEE et al., 2015).

Quando administrada pela via i.t., possui vantagens no direcionamento seletivo e na exclusão permanente dos receptores TRPV1 com efeito analgésico de longa duração (JEFFRY et al, 2009; KARAI *et al.*, 2004, BROWN, 2005). A administração i.t. de RTX em ratos e macacos não apenas inibe rapidamente a via nociceptiva na transmissão sináptica, mas também proporciona analgesia de longa duração em modelos comportamentais, devido à destruição de receptores TRPV1 expressos nas terminações nervosas sensoriais centrais. (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012).

3. JUSTIFICATIVA

A dor neuropática periférica está presente em milhões de pessoas no mundo (DWORKIN, R.H. et al., 2007) causando uma diminuição drástica da sua qualidade de vida, além de acarretar elevados custos à sociedade (FREYNHAGEN; BENNETT, 2009).

O tratamento da dor neuropática continua sendo um grande desafio, pois o alívio da dor é apenas parcial na maioria dos pacientes. Uma razão para a falta de melhoria clínica é a incapacidade de determinar os mecanismos da dor em pacientes. Testes sensoriais quantitativos e investigações eletrofisiológicas, como estudos de condução nervosa ou potenciais, apesar de revelar informações sobre a função dos diferentes tipos de fibras nervosas sensoriais, não fornecem uma visão sobre os processos celulares e moleculares responsáveis pela dor (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF 2010). Estas dificuldades impedem o desenvolvimento de estratégias de tratamento para mecanismos específicos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF 2010).

De fato, foi demonstrado que agonistas do receptor TRPV1 apresentam um grande potencial antinociceptivo em diferentes modelos de nocicepção em animais, tanto em dores inflamatórias crônicas quando de origem neuropática (JEFFRY et al, 2009; NEUBERT et al. 2003; KISSIN, 2005). Além disso, sua participação também já foi demonstrada no processo de integração e transmissão espinhal da dor (CATERINA; JULIUS, 2001). Desse modo, a modulação farmacológica do receptor TRPV1 tem sido apontada como uma importante terapia para o controle de dores de difícil tratamento, como as neuropatias (WONG; GAVVA, 2009). Ao mesmo tempo o papel dos receptores TRPV1 no sistema de transdução da dor não foi totalmente compreendido, demonstrando a necessidade de estudos que envolvam os receptores TRPV1 (KANAI, et al. 2005, LEE, et al. 2015).

Com base nos estudos encontrados envolvendo a RTX no tratamento de diversos modelos de dor, destacamos os estudos de KISSIN et al., 2007; PARK et al., 2014; Lee, et al. 2015; que demonstraram o tratamento prévio de RTX e elucidaram indagações futuras são necessárias para a ciência. Desta forma, este estudo evidenciou o efeito e o possível mecanismo de ação decorrente da ativação

do receptor TRPV1 em camundongos através da administração i.t. de RTX no tratamento prévio e tardio no modelo experimental de dor neuropática por CCI.

4. OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos geral e específico do presente estudo.

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar o papel dos receptores TRPV1 no controle da dor neuropática em animais submetidos à modelo de lesão neuropática por constrição do nervo isquiático (CCI) por administração i.t. de RTX.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da RTX no tratamento tardio e tratamento prévio de animais submetidos a CCI.
- Avaliar a expressão dos receptores TRPV1 em animais submetidos à injeção i.t. de RTX para controle da dor neuropática, induzida pelo CCI.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos os aspectos éticos de experimentação animal, suas características, os métodos de avaliação, as drogas e a via de administração utilizada, o modelo experimental de dor neuropática e o delineamento do estudo.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos *Swiss* (5-6 semanas; pesando 25 a 28g), provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso a ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL (Registro de nº 571/201), vide anexo A.

5.2. AVALIAÇÃO NOCICEPTIVA MECÂNICA

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi avaliado de acordo com o método *up-and-down* (CHAPLAN et al., 1994), utilizando os filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA). Os camundongos foram acondicionados em caixas de acrílico com a face dianteira transparente sobre uma tela de arame, proporcionando acesso à pata desses animais.

Após a ambientação dos animais (15 min), os filamentos de Von Frey foram aplicados perpendicularmente, sobre a região plantar externa da pata traseira dos

animais, por um período aproximado de 4 segundos ou até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por retirada da pata, seguida de lambida da mesma e/ou “*flinch*”. A avaliação dos camundongos inicia-se com o filamento de 0,4 g. Nesse método, pelo menos 6 avaliações, com intervalos de 10 segundos, foram feitas, por animal. A ausência de resposta do animal a um determinado filamento levará à utilização de outro filamento de maior massa, até que ocorra resposta de retirada. Havendo retirada, um filamento de menor massa foi aplicado, por isso denominado método de *up and down*.



Figura 3- Aparato para avaliação nociceptiva mecânica por Von Frey filamentos.
Fonte: Do autor.



Figura 4- Avaliação nociceptiva mecânica por Von Frey Filamentos.
Fonte: Do autor.

5.3 DROGAS E DILUENTES

Foi utilizado a RTX (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) 1 mg dissolvida em 0,1 ml de etanol a 95 % e 0,9 ml de soro fisiológico a uma concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e armazenado a -20°C (LEE et al., 2012). A concentração de 2 μg em 5 μL (2 μl solução mãe acrescida de 3 μL de salina) foi administrada por via i.t.. O grupo controle recebeu o mesmo volume em solução salina denominada veículo, por via i.t..

5.4. VIA DE ADMINISTRAÇÃO DA DROGA

A via de administração do RTX foi a i.t., conforme descrito por PAPIR-KRICHELI et al., 1987. Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório 2% (Cristália- Itapira,SP) e tricotomizados na região lombar. Posteriormente, o animal foi

alocado sobre um dispositivo cilíndrico em decúbito ventral, com a coluna vertebral hiperfletida, expondo os interespaços lombares L4 e L5. Em seguida, uma agulha hipodérmica nº 26 foi inserida no espaço subaracnóideo medular, perfurando a região medial entre as vértebras L4 e L5 (± 1) num ângulo de 45°.



Figura 5- Injeção i.t..
Fonte: Do autor.

5.5. MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA

Utilizou-se o modelo experimental de injúria por constrição crônica do nervo isquiático- CCI (MALBERG; BASBAUM, 1998).

Após anestesia inalatória (isoflurano 2%- Cristália- Itapira,SP), a superfície lateral da coxa traseira direita foi tricotomizada e realizou a antissepsia da pele dos animais e em seguida a incisão, o músculo femoral foi divulsionado, expondo as três ramificações do nervo isquiático. Esse modelo consiste em amarrações de 1/3 a 1/2 da porção dorsal do nervo isquiático com fio de sutura de 5,0. Após, o músculo e a pele foram suturados.

O grupo experimental controle foi composto por animais falsamente operados (SHAM), ou seja, foi realizada a incisão na pele, o divulsionamento do músculo

femoral e exposição do nervo isquiático de modo similar ao grupo CCI, porém sem qualquer amarração desse nervo.

Os testes nociceptivos foram realizados antes e após 72 horas da cirurgia e nos próximos intervalos de 1, 3, 5, 7, 12, e 24 horas.

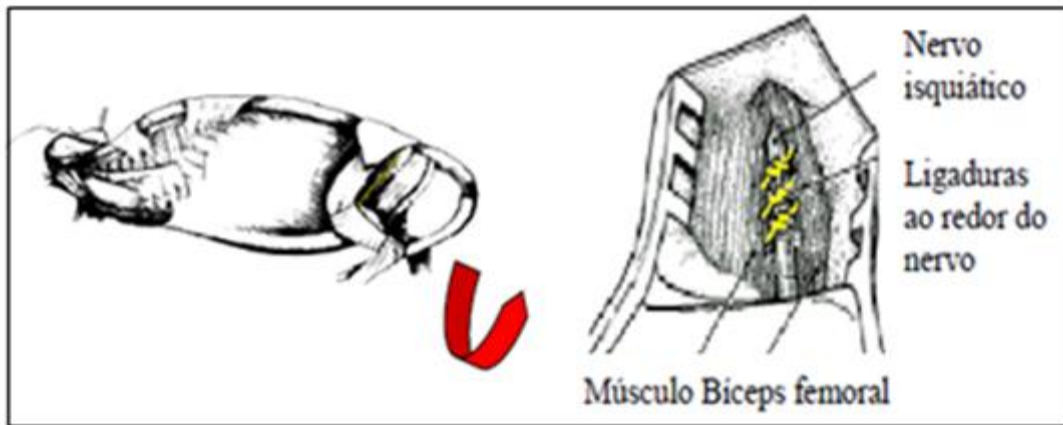


Figura 6- Modelo experimental de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI).
Fonte: Modificado de Bennett; Xie, 1988.

5.6. WESTERN BLOTTING

Para avaliar a expressão de receptores TRPV1, inicialmente, os animais foram anestesiados (isoflurano 2%, inalatório) nos tempos B1, B2, T1, T2, T3, T4, T5. Foram então tricotomizados na região dorso-lombar e foi feita uma incisão póstero-mediana, seguida de abertura dos planos até a lâmina óssea e feita laminectomia para visualização dos gânglios. O DRG dos segmentos L5-L4-L6 foram dissecados e posteriormente homogeneizados e lisados em tampão contendo 50 mmol/l de Tris (pH 7,4), 250 mmol/l de cloreto de sódio (NaCl), 10 mmol/l de etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) (pH 8,0), 0,5% Nonideto P-40 (NP40) (Sigma, EUA), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mmol/l, 10 µg/l de leupeptina, 4 mmol/l de fluoreto de sódio (NaF). Os sobrenadantes foram centrifugados a 1000 g durante 10 min a 4°C. A concentração de proteína foi determinada com um kit de quantificação proteínas por método de Bradford (Pierce, EUA). As amostras de proteína (20 µg / poço) foram separadas através eletroforese em gel acrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueados por leite 5% durante 60 min à temperatura ambiente e incubadas

com anticorpo primário anti-TRPV1 (1:500, Calbiochem, Oncogene, EUA, 35 kDa) durante 48 horas, a 4°C, com tampão de bloqueio [PBS 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% Tween 20]. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado HRP anti-coelho (1:2000, Jackson, USA) e novamente lavadas. As membranas foram então reveladas com kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual do fabricante. A taxa de densidade óptica TRPV1/ β -actina foi utilizada para o cálculo da expressão gênica de receptores TRPV1.

5.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Tabela 1- Distribuições dos grupos experimentais do estudo.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	
GRUPO TRATAMENTO PRÉVIO	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-tratados com veículo e falso operados (Veículo/SHAM, n=14). • Pré-tratados com veículo e neuropáticos (Veículo/CCI, n=14), • Pré-tratados por RTX e falso operados (RTX/SHAM, n=14) • Pré-tratados por RTX e neuropáticos (RTX/CCI, n=14).
GRUPO TRATAMENTO TARDIO	<ul style="list-style-type: none"> • Falso operados e tratados por veículo (SHAM/Veículo, n=14); • Neuropáticos e tratados por veículo (CCI/Veículo, n=14); • Falso operados e tratados por RTX (SHAM/RTX, n=14). • Neuropáticos e tratados por RTX (CCI/RTX, n=14);

Fonte: Do autor.

5.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o grupo tratamento prévio, os animais foram submetidos a uma administração única por via i.t. de VEÍCULO/RTX 1 hora antes da cirurgia CCI/SHAM e o limiar nociceptivo de retirada de pata, através dos filamentos de von Frey foram realizados antes de CCI/SHAM, após 72 hrs de CCI/SHAM (B2) e em seguida, 1, 3, 5, 7, 12 e 24 horas após B2 (Figura 1).

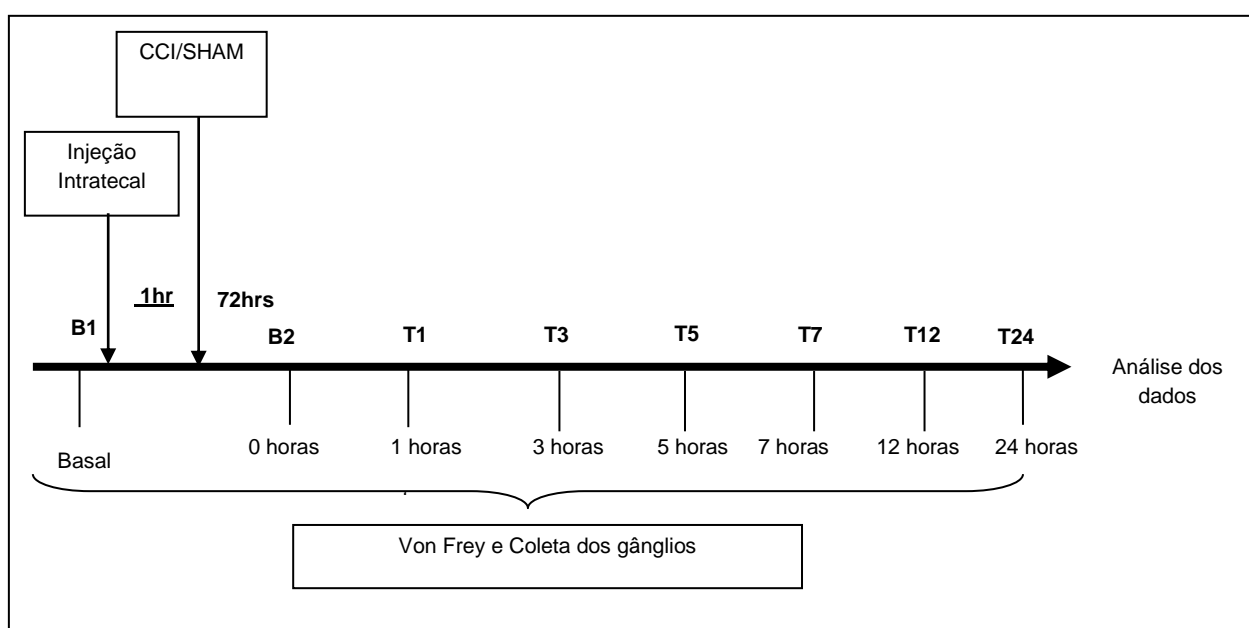


Figura 7- Delineamento experimental do estudo para grupo tratamento prévio.

Fonte: Do autor.

No grupo tratamento tardio, os animais foram submetidos à administração única por via i.t. de VEÍCULO/RTX após o procedimento cirúrgico CCI/SHAM, o limiar nociceptivo mecânico através dos filamentos de Von Frey foram realizados antes da cirurgia CCI/SHAM (B1), após 72 horas de CCI/SHAM, antes da administração i.t. (B2) e em seguida, em 1, 3, 5, 7, 12, e 24 horas após a injeção para os animais dos grupos tratados (Figura 8).

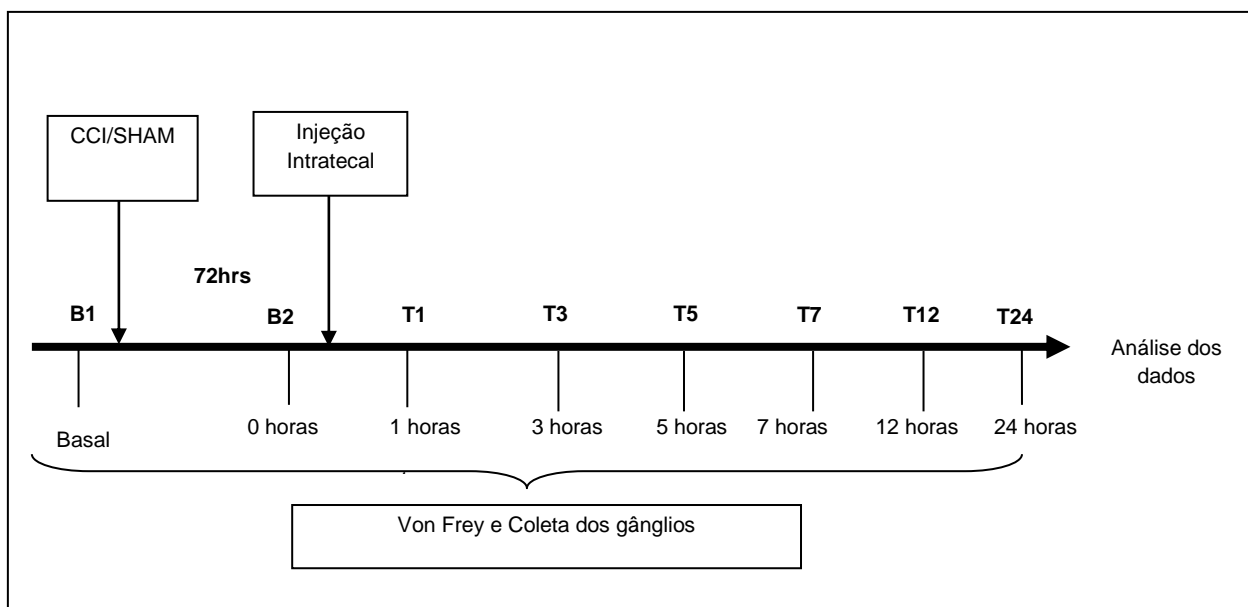


Figura 8- Delineamento experimental do estudo para grupo tratamento tardio.
Fonte: Do autor.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Resultados comportamentais foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 5-7 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) e as comparações foram realizadas pelo teste de post-hoc de Bonferroni, utilizando o *Software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (IBM, Chicago, USA) versão 15.0; O nível de significância foi de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

O gráfico 1 demonstra o limiar nociceptivo (em gramas) avaliado pelo teste de Von Frey filamentos, no grupo tratamento prévio, no qual, foi administrada por via i.t. (i.t.) RTX (2 μ g) ou solução salina 1 hora antes do processo cirúrgico do modelo experimental CCI e modelo falso operado (SHAM). Nos tempos B1 (antes da CCI ou SHAM), B2 após 72 horas (CCI ou SHAM), T1 (1hr), T3 (3hr), T5 (5hr), T7 (7hr), T12 (12hr) e T24 (24hr) após B2. No grupo CCI/VEÍCULO o limiar nociceptivo diminuiu a partir de B2, quando comparado com B1, indicando hiperalgesia mecânica. No grupo SHAM/RTX e SHAM/VEÍCULO os limiares de nocicepção não foram alterados. No grupo CCI/RTX houve um aumento significativo no limiar nociceptivo a partir de B1, demonstrando efeito nociceptivo de RTX (i.t.) para o tratamento prévio no modelo experimental de dor neuropática.

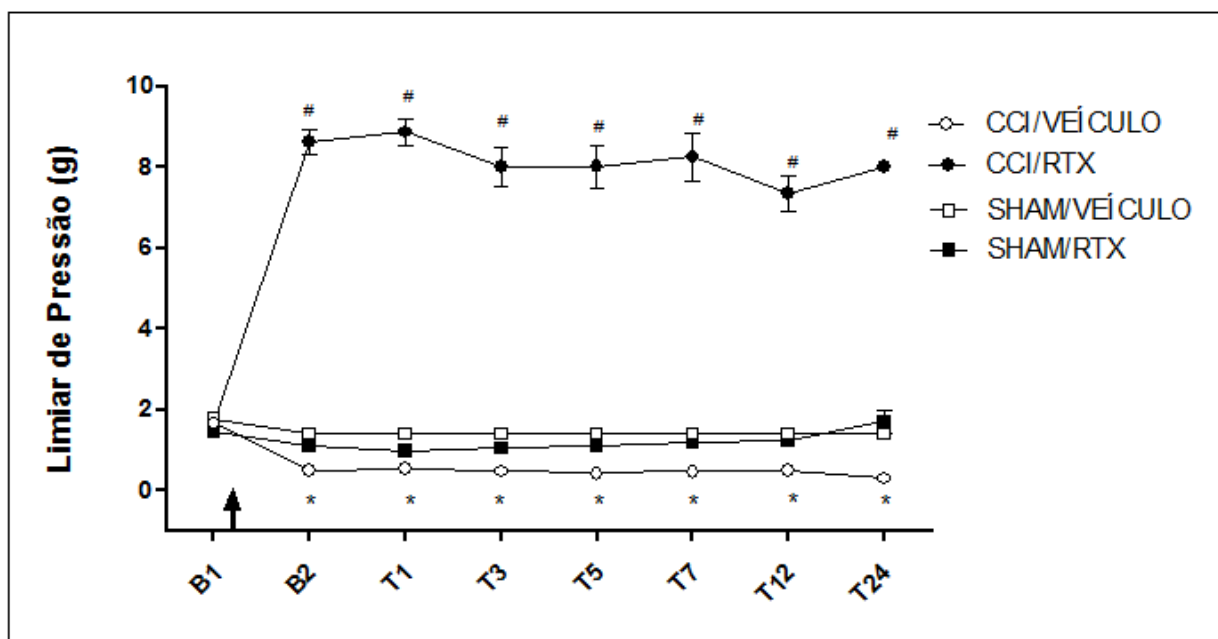


Gráfico 1- Efeitos do tratamento prévio com veículo ou RTX (2 μ g, i.t.), agonista para o receptor TRVP1, sobre o limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey filamentos em animais falso operados (SHAM) ou a constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) realizado antes da CCI/SHAM (B1) e após 72 horas (B2), 1 hora (T1), 3horas (T3), 5 horas (T5), 7 horas (T7), 12 horas (T12) e 24 horas (T24) após B2. * $p < 0,05$ em relação ao grupo RTX/CCI; em relação aos outros grupos. As curvas foram diferentes em relação ao tempo $F_{7,28} = 18,38$ $p < 0,01$; em relação ao tempo x tratamento $F_{21,286} = 36,32$, $p < 0,05$; e entre os tratamentos $F_{1,4} = 5693,4$ $p < 0,01$.

Fonte: Do autor

O gráfico 2 demonstra o limiar nociceptivo (em gramas) avaliado pelo teste de Von Frey filamentos no grupo tratamento tardio. Após a cirurgia pelo modelo experimental de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) e modelo falso operado (SHAM) foi administrado por via i.t., resiniferotoxina (RTX, 2 µg), agonista para o receptor TRVP1 ou veículo. Nos tempos B1 (antes da CCI ou SHAM), B2 após 72 horas (CCI ou SHAM), T1 (1hr), T3 (3hr), T5 (5hr), T7 (7hr), T12 (12hr) e T24 (24hr) após a administração de RTX ou Veículo. No grupo CCI/RTX a dor neuropática foi revertida após 1 hora (T1) da administração do agonista do receptor TRVP1, RTX persistindo até 24 horas (T24). No grupo CCI/Veículo o limiar nociceptivo diminuiu a partir de B2, quando comparado com B1, indicando hiperalgesia mecânica. Nos grupos SHAM/Veículo e SHAM/RTX os limiares de nocicepção não foram alterados.

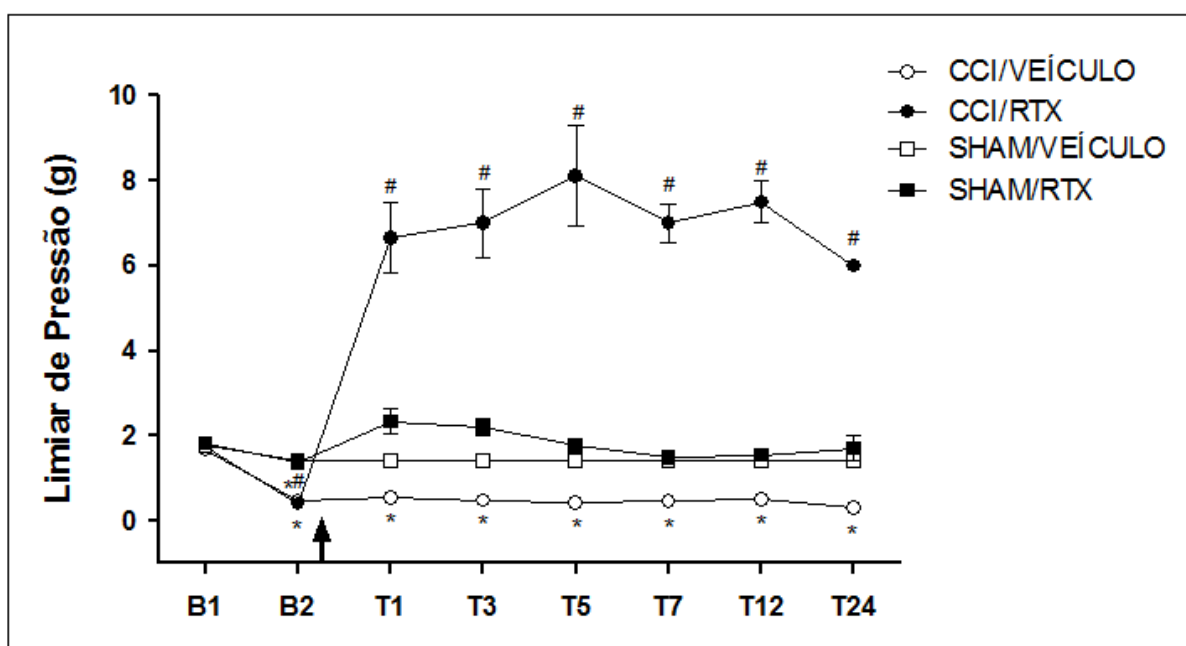


Gráfico 2- Efeitos do tratamento tardio com veículo e RTX (2 µg, i.t.), um agonista para o receptor TRVP1, sobre o limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey filamentos em animais submetidos a falsa cirurgia (SHAM) ou a constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Os dados representam a média + E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) realizado antes da CCI/SHAM (B1) e após 72 horas (B2), 1 hora (T1), 3horas (T3), 5 horas (T5), 7 horas (T7), 12 horas (T12) e 24 horas (T24) após a administração de RTX/Veículo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM/Veículo; # $p < 0,05$ em relação aos outros grupos. As curvas foram diferentes em relação ao tempo $F_{7,42} = 4,21$, $p < 0,01$; em relação ao tempo x tratamento $F_{1,6} = 0,12$, $p < 0,05$; e não foram diferentes entre os tratamentos $F_{7,42} = 8,83$, $p < 0,01$.

Fonte: Do autor.

A figura 9 representa a análise por *Western Blotting* da expressão do receptor TRPV1 comparada com B actina encontradas nos GDR dos animais submetidos ao modelo experimental de dor neuropática, CCI e administração por via i.t. de RTX nos tempos B1(antes da CCI), B2 após 72 horas (CCI ou SHAM), T1 (1hr), T5 (5hr), e T24 (24hr). Pode-se observar que a expressão dos receptores TRPV1 diminuiu de maneira significativa nos tempos T1, T5 e T24 para os grupos tratados com RTX (tratamento tardio), quando comparados com o grupo veículo e tratamento prévio. Mostrando que houve a depleção dos receptores TRPV1 após a administração i.t. de RTX em animais submetidos a CCI.

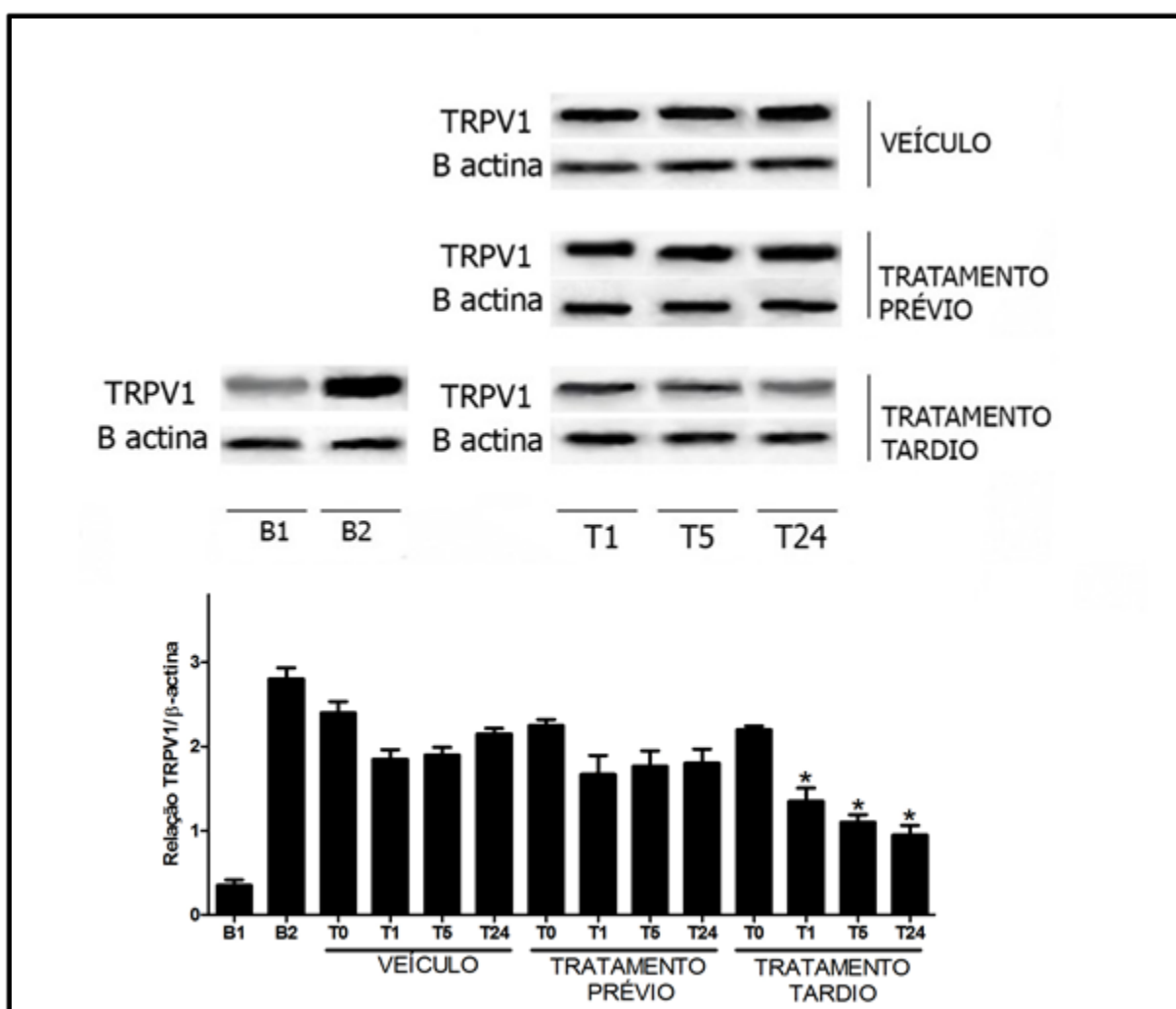


Figura 9- Detecção por *Western Blotting* da expressão dos receptores TRPV1 comparada com B-actina encontradas nos GDR dos tempos T1, T5 e T24 dos grupos Tratamento prévio e tratamento tardio com RTX. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratamento quando comparado com os outros grupos e $F = 25.19$

Fonte: Do autor.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a administração i.t. de RTX, como tratamento prévio e tardio para o modelo de dor neuropática induzida por CCI, induz antinocicepção de maneira significativa neste modelo. Essa ideia é suportada por dados experimentais que demonstram que a hiperalgesia crônica induzida por lesão nervosa libera vários mediadores inflamatórios, que sensibilizam os receptores TRPV1 de maneira constante (KISSIN; FREITAS; BRADLEY, 2007), diferentemente do modelo de dor inflamatória, que possui picos de sensibilização de receptores de TRPV1 (JI, *et al.*, 2002; LU, *et al.*, 2008). Esta sensibilização induz aumento da expressão do receptor TRPV1 nos terminais aferentes primários, fato que demonstra que este receptor está envolvido no processo de indução e manutenção da dor neuropática (KANAI *et al.*, 2005). Desta forma, utilizar um antagonista do receptor TRPV1, como a capsazepina, seria um possível tratamento para a hiperalgesia inflamatória e neuropática (CATERINA *et al.*, 1997; KAWAO *et al.* 2002; HONORE *et al.* 2005). No entanto o bloqueio destes receptores, pode levar a alterações na temperatura corporal (CATERINA; JULIUS, 2001). Portanto, usar um agonista para o tratamento da hiperalgesia neuropática induzida pelo aumento da expressão e do número de receptores parece uma proposta no sentido de aumentar a sensação dolorosa (HAANPÄÄ; TREEDE, 2012). Contudo, a particularidade da potência da ação da RTX (LEE *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2015), leva a uma despolarização constante e inativação sustentada do receptor reduzindo a hiperalgesia (SZALLASI; BLUMBERG, 1999; NOLANO *et al.*, 1999). Um dos principais achados deste trabalho que foi demonstrar, pela primeira vez neste modelo, que a RTX causa o aumento do limiar nociceptivo de maneira persistente.

O modelo de dor neuropática por CCI foi adotado devido, somente, a constrição do nervo isquiático sem que houvesse a perda da continuidade nervosa, diferentemente dos outros modelos experimentais como o de ligadura do nervo espinal (SNL), onde um ou mais nervos espinais são constringidos e cortados, e o modelo de lesão limitada do nervo (SNI) no qual são cortados os ramos fibular e tibial do nervo isquiático (KRAYCHETE; GOZZANI; KRAYCHETE, 2008). A CCI destaca-se por ser um modelo experimental de fácil execução e mimetiza os sinais da dor neuropática encontrados na clínica, como por exemplo, alodinia mecânica e

ao frio, hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, mas não são verificadas mudanças no limiar térmico ao calor (WOOLF; MANNION, 1999; AL-AMIN et al., 2010; BOURQUIN et al., 2006).

A hiperalgesia neuropática é classificada como o resultado de injúrias que acometem diretamente o sistema nervoso periférico, a medula espinhal ou sistema nervoso central (SELTZER, et al., 1999). Essa injúria resulta, muitas vezes, em dor persistente ou crônica com sintomas clínicos caracterizados por dor espontânea em queimação, alodinia e hiperalgesia. (PAYNE; NORFLEET, 1986). A nocicepção neuropática sensibiliza os receptores TRPV1 (KANAI, 2005; KISSIN; FREITAS; BRADLEY, 2007; LEE, et al., 2015), receptores que desempenham um importante papel no desenvolvimento de alodinia e hiperalgesia após a lesão (JI et al., 2002; KANAI et al., 2005; WILSON-GERWING et al., 2005). Kanai et al (2005) demonstraram, em estudo com ratos com hiperalgesia neuropática através do modelo de CCI, que os níveis de expressão de TRPV1 na medula espinhal após CCI, quantificados através de análise de *Western blotting*, estavam significativamente aumentados no lado ipsilateral da medula lombar em até 14 dias após cirurgia CCI, mas não no lado contralateral, resultados que evidenciam o aumento da expressão do TRPV1, no desenvolvimento e/ou manutenção de alodinia mecânica no modelo CCI. Corroborando com os resultados deste estudo que demonstram que após o modelo de CCI, os camundongos apresentam uma hiperalgesia e alodinia mecânica avaliada pelos filamentos de Von Frey, assim como a expressão aumentada dos receptores de TRPV1, através de análise de *Western blotting*.

Em contraste com o presente estudo Zhang et al (2014) avaliaram o efeito antinociceptivo da capsaicina administrada por via i.t. 3 dias após o modelo de dor neuropática (CCI) em ratos onde nenhum efeito significativo sobre o limiar de resposta mecânica foi observado, apenas a hipernocicepção térmica, podendo ser justificado pelo fato de que a RTX ser um análogo mais potente que a capsaicina (SZALLASI; BLUMBERG, 1990).

Efeitos distintos sobre as respostas a estímulos mecânicos e térmicos também foi documentada com a administração i.t. de RTX no modelo de dor inflamatória aguda através a aplicação de carragenina intraplantar em ratos, Jeffry et al (2009) demonstraram que a RTX elevou de maneira significativa o limiar de resposta térmica, mas não o limiar de resposta mecânica na pata inflamada,

resultados indicam que o tratamento de RTX não altera a hipersensibilidade mecânica devido à inflamação, isto é devido à ablação seletiva de TRPV1 expressos nos terminais nervosos centrais no corno dorsal, que é suficiente para reduzir a hipersensibilidade térmica inflamatória sem afetar TRPV1 expressos nos neurónios DRG ou dos seus terminais periféricos (JEFFRY et al, 2009).

Estudos indicam que a capsaicina e seu análogo mais potente a RTX possuíam o mesmo mecanismo de ação *in vivo* e *in vitro*, sendo que sua administração sistêmica em ratos causou hipotermia, inflamação neurogênica e dor, resposta semelhante a do tratamento com capsaicina. As respostas foram acompanhadas por perda de termorregulação, dessensibilização, inflamação neurogênica e analgesia química e térmica. A RTX é cerca de 3-4 ordens de grandeza mais potente do que a capsaicina em seus efeitos sobre a termorregulação e inflamação neurogênica (SZALLASI; BLUMBERG, 1989; CALIXTO et al., 2005). No entanto um estudo avaliou a atuação sistêmica de capsaicina, demonstrando as fibras aferentes sensíveis a esta substância na pele, córnea, articulações e uma série de órgãos viscerais como nas vias cardiovasculares, respiratórias e gastrointestinais, podendo agir de maneira pungente quando administrada por via oral (CATERINA; JULIUS, 2001). Efeitos sistêmicos não são observados em administração tópica. Vidal et al (2004) concluíram em uma revisão sistemática a eficácia da administração tópica de capsaicina a 0,075% para o tratamento da dor neuropática, sendo uma alternativa terapêutica viável. Distintamente, a RTX fornece uma ação local de longa duração sem maiores efeitos sistêmicos (KISSIN; DAVISON; BRADLEY, 2005).

Evidentemente, há um longo caminho a ser percorrido e muitos estudos ainda são necessários para avaliar o potencial terapêutico de fármacos agonistas de TRPV1, entretanto uma nova abordagem para o controle da dor surge a partir de uma detalhada investigação sobre a capsaicina, RTX e outros vanilóides nas suas ações fisiológicas e sua ligação molecular ao receptor TRPV1 (IADAROLA; MANNES, 2011). Dessa forma, estudos que administraram RTX por via i.t. demonstram vantagens no direcionamento seletivo e exclusão permanente dos receptores TRPV1, com efeito analgésico de longa duração (LEE et al., 2012; BROWN et al., 2015). Essas observações corroboram com a via de administração

adotada pelo presente estudo onde a expressão aumentada de TRPV1 após a CCI, foi impedida pelo tratamento de RTX i.t..

Do mesmo modo, Brown et al (2015) investigaram os efeitos eletrofisiológicos da administração i.t. de RTX, demonstrando que a droga leva à abertura seletiva prolongada do potencial de canal iônico do receptor TRPV1, localizado principalmente nas fibras-C dos neurônios nociceptivos aferentes primários, promovendo então a dessensibilização deste receptor e consequentemente analgesia e anestesia, que diminui o limiar nociceptivo dos animais submetidos a CCI. Estes pesquisadores também relataram uma sequência de trabalhos em animais de laboratório, que exploraram o uso de RTX administrada de forma i.t. para controlar a dor espontânea de câncer ósseo em cães. Foram realizados testes comportamentais para estabelecer a latência de retirada da pata e posteriormente, a anestesia geral foi induzida para a administração de RTX por via i.t., sendo os parâmetros hemodinâmicos monitorados. O teste de comportamento foi repetido durante 12 dias após a administração de RTX e os autores concluíram que a RTX i.t. provoca efeitos hemodinâmicos transitórios, e que produz uma resposta antinociceptiva prolongada.

Durante a execução do presente projeto, Lee et al (2015) demonstraram o efeito analgésico de RTX no modelo experimental de dor neuropática por SNI em ratos. Foi avaliado o limiar nociceptivo de retirada de pata, através dos filamentos de Von Frey e os animais foram tratados com RTX por via epidural, a uma concentração de 1 µg/µl. Entre seus achados, foi observado aumento significativo no limiar nociceptivo a partir do tratamento, demonstrando efeito antinociceptivo RTX. Resultados que apoiam a execução do presente estudo, entretanto os animais, modelo de neuropatia, via de administração e modelo experimental se diferem. Da mesma forma Brown et al. (2015) demonstrou que a administração de RTX, guiada por tomografia computadorizada, no DRG, é capaz de diminuir a transmissão nociceptiva em porcos e após quatro semanas, foi verificado a diminuição da expressão de TRPV1 e redução da nocicepção. Também, não foram constatados efeitos colaterais, como prejuízos nas funções motoras.

A escolha do tratamento prévio de RTX, foi fundamentada em estudos que demonstram a participação de antagonistas do receptor TRPV1 no controle da dor. Desta forma, Meller et al. (1992) demonstrou o efeito preventivo sobre a hiperalgesia

térmica, neonatos foram tratados com capsaicina e esta preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica produzida por ligaduras constritivas em torno do nervo isquiático 18 semanas mais tarde, de maneira semelhante aos estudos de GAUS et al. (2003), que administrou a capsaicina intraperitoneal antes da CCI impediu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica. Em analogia, Kissin et al. (2005) verificou a indução de hipoalgesia térmica e mecânica de curta duração após aplicação de RTX. Em seu trabalho a aplicação foi realizada via perineural como tratamento prévio a dor incisional. Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, na qual a RTX obteve efeito antinociceptivo no tratamento prévio avaliado em um período de curta duração, sem que houvesse a alteração da expressão dos receptores TRPV1 no GDR.

A neurotoxicidade de RTX e sua margem de segurança não são totalmente claras e sua toxicidade inicial tem se tornado uma barreira para seu uso generalizado (KISSIN, 2008). Nesse sentido, Lee et al (2012) observaram uma melhoria transitória de hipersensibilidade mecânica e térmica em resposta a administração por via epidural (1 µg) de RTX em um modelo de dor neuropática sem que houvesse uma paralisia respiratória ou sedação. No entanto, os autores demonstraram que todos os ratos tratados com RTX apresentaram sinais de toxicidade sistêmica aguda (irritação e sonolência) e uma resposta de hiperalgesia térmica. Kissin et al (2005) determinaram que a administração de RTX via perineural impedia a hiperalgesia em um modelo de dor incisional sem que houvesse alteração motora.

Até o presente momento não existem dados na literatura que demonstram a administração de RTX em estudos clínicos. Iadarola et al (2011) incentivaram a busca por ensaios clínicos em humanos, dando início à investigação sobre o uso de RTX para demonstrar sua eficácia e segurança, indicando a possibilidade da fabricação, estudo químico livre de substâncias voláteis, formulação de uma forma injetável de RTX, avaliação de estabilidade em diferentes condições de armazenamento e elaboração/execução dessa droga, para sua utilização clínica.

Embora a participação do receptor TRPV1 nos mecanismos nociceptivos tenha sido amplamente demonstrada (BLUMBERG, 1989; JULIUS, 2001; NEUBERT et al. 2003; KARAI, 2004; KISSIN; DAVISON; BRADLEY, 2005; CALIXTO et al., 2005; BROWN, 2005; KISSIN, 2005; FREITAS; BRADLEY, 2007; KISSIN, 2008;

JEFFRY et al, 2009; IADAROLA; MANNES, 2011; LEE et al., 2012; LEE et al., 2015 BROWN et al, 2015), o presente estudo amplia significativamente o entendimento da função desse receptor no modelo de dor neuropática por CCI, além de evidenciar o aumento do limiar nociceptivo através do tratamento prévio e tardio de RTX por via i.t..

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que os receptores TRPV1 participam ativamente no controle da dor neuropática induzida por CCI.

A administração i.t. de RTX no tratamento prévio produziu um aumento significativo do limiar nociceptivo, demonstrando efeito antinociceptivo de curta duração, já que não houve alteração dos receptores TRPV1 no DRG. Entretanto, a administração i.t. de RTX no tratamento tardio, após CCI, produziu hipoalgesia mecânica e diminuição da expressão dos receptores de TRPV1.

REFERÊNCIAS

AL-AMIN, H. et al. Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. **Exp Neurol**, v.228, p. 30-40, 2010.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neuroscience**, v.111, n.2, p.389-97, 2002.

ANDRADE, E.L. **Caracterização farmacológica in vitro e in vivo de substâncias naturais como ativadoras do receptor TRPA1 em roedores**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

BARON, R.; BINDER, A. Wie neuropathisch ist die lumboschialgie? Das mixed-pain-konzept. **Orthopade**, v. 33, n. 5, p. 568–575, 2004.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 16, n. 139, p. 267–284, 2009.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**. v. 33, n.1, p.87-107, 1988.

BOURQUIN, A.F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain**, v.122, p. 14, 2006.

BROWN, D. C. et al. Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. **Anesthesiology**. v. 103, n. 5, p. 1052–1059, 2005.

BROWN, J.D. et al. CT-guided injection of TRPV1 agonist around root ganglia decreases pain transmission in swine. **Sci Transl Med**, v.7, 2015.

BROWN, D.C.; AGNELLO K, IADAROLA, M.J. Intrathecal resiniferatoxin in a dog model: efficacy in bone cancer pain. **Pain**, v.156, n.6, p.1018-24, 2015.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179–208, 2005.

CASALS-DÍAZ, L.; VIVÓ, M.; NAVARRO, X. Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. **Experimental Neurology**, v. 217, n. 1, p. 84–95, 2009.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Rev. Neurosci**, v.24, p. 487-517, 2001.

CATERINA, M.J et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHAPLAN, S.R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v.53, p. 55-63, 1994.

CLAPHAM, E.D. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, p. 517-524, 2003.

COSTIGAN M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, J.C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Rev Neurosci**, n.32, p. 1–32, 2009.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 243–254, 2011.

DEVOR M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J Pain**, v.7, n.1, p.3-12, 2006.

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 85, n. 3 Suppl, p. S3–S14, 2010.

DWORKIN, R.H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidencebased recommendations. **Pain**, v.132, p.237-51, 2007.

FEIN A. **Nociceptores**: As células que sentem dor. Dor On Line, 2011. Disponível em: < <http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em: 16 dez 2015.

FERREIRA, S.H. et al. **Dor Inflamatória. In Dor - Princípio e prática.** São Paulo: Artmed, 2009.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573–581, 2010.

FIRTH, A.L.; REMILLARD, C. V.; YUAN, J. TRP Channels in Hypertension. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n.8, p. 895–906, 2007.

FREYNHAGEN, R.; BENNETT, M.I. Diagnosis and management of neuropathic pain. **BMJ**, v.339, p.3002, 2009.

GALER, B.S. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. **Neurology**, v.45, 1995.

GAUS, S. et al. Capsaicin treatment inhibits osteopenia and heat hyperalgesia induced by chronic constriction injury to the sciatic nerve in rats. **Hiroshima J Med Sci**, v.52, p.43–51, 2003.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAANPÄÄ, M.; TREEDE, R. D. Capsaicin for neuropathic pain: Linking traditional medicine and molecular biology. **European Neurology**, v. 68, n. 5, p. 264–275, 2012.

HERGENHAHN, M., ADOLF, W.; HECKER, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. **Tetrahedron Lett**, v.19, 1595– 1598, 1975.

HONORE, P. et al. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethylbenzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.314, p.410–21, 2005.

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.2, p.83-91, 2001.

IADAROLA M. J.; MANNES A. J. The Vanilloid Agonist Resiniferatoxin for Interventional-Based Pain Control. **Curr Top Med Chem**, v.11, n.17, p. 2171–2179, 2011.

JANCSÓ, G. et al. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. **Acta Physiol Hung**, v.69, p. 295–313, 1987.

JANCSÓ, N. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. **Bulletin of the Millard Fillmore Hospital**, v. 7, p. 53-77, 1960.

JANCSÓ, N., JANCSÓ-GABOR, A. Desensitization of sensory nerve endings (in Hungarian). **Kiserletes Orvostudomány**, v.2, p. 15, 1949.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A.; Szolcsanyi, J. the role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. **Br. J. Pharmac. Chemother.** v, 32, p.32-41, 1968.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GABOR, A. Dauerschaltung der chemischen Schmerzempfindlichkeit durch Capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 236, p. 142-145, 1959.

JEFFREY, J.A. et al. Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. **PLoS One**, v.4, n.9. 2009.

JI, R. R. et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 12, p. 696–705, 2003.

JI, R.R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v.36, n.1, p.57-68, 2002.

JULIUS, D. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KALSO, E. et al. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 372–380, 2004.

KANAI, Y. et al. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. **Neuropharmacology**, v.49, p. 977-984, 2005.

KARAI, L. et al. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. **J Clin Invest**, v.113, p.1344-1352, 2004.

KAWAO, N. et al. Capsazepine inhibits thermal hyperalgesia but not nociception triggered by protease-activated receptor-2 in rats. **Jpn J Pharmacol**, v.89, n.2, p.184-7, 2002.

KEHLET, H.; JENSEN, T.S.; WOOLF, C.J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet**, v. 367, p.1618-162, 2006.

KISSIN, I.; DAVISON, N.; BRADLEY, J.R. Perineural resiniferatoxin prevents hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. **Anesth Analg**, v.100, p.74–80, 2005.

KISSIN, I.; FREITAS, C.F.; BRADLEY EL, J.R.; Perineural resiniferatoxin prevents the development of hyperalgesia produced by loose ligation of the sciatic nerve in rats. **Anesth Analg**, v.104, p.1210-1216, 2007.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J.L.; KRAYCHETE, A. C. Neuropathic Pain – Neurochemical Aspects. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 58, n. 5, p. 492-505, 2008.

LATORRE, R. et al. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. **Cell Calcium**, v. 42, n. 4-5, p. 427–438, 2007.

LEE, M. G. et al. The effect of clonidine pretreatment on epidural resiniferatoxin in a neuropathic pain rat model. **Acta Med Okayama**, v.69, n.2, p.95-103, 2015.

LEE, M. G. et al. The effect of epidural resiniferatoxin in the neuropathic pain rat model. **Pain physician**, v. 15, n. 4, p. 287–96, 2012.

LIU, C.N. et al. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience**, v.105, n.1, p.265-75, 2001.

LIU, H, MANTYH, P.W, BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v.386, p, 721-724, 1997.

LOESER, J.D. Perspectives on pain. In Proceedings of the First World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics. p. 316-345, 1980.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

LU, Yu. et al. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat chronic inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant. **Mol Pain**. v.4, p. 61, 2008.

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-222, 1998.

MCMAHON, S.B.; LEWIN, G.; BLOOM, S.R. The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat. **Pain**, v.44, p.301-310, 1991.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Neonatal capsaicin treatment prevents the development of the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Pain**, v.51, p. 317–321, 1992.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual Life Res**, v.3, n.1, p.69-76, 1994.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MINKE, B.; COOK, B. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. **Physiol Rev**, v.82, p. 429–472, 2002.

NEUBERT, J.K., et al. Perineural resiniferatoxin selectively inhibits inflammatory hyperalgesia. **Mol Pain**, v.4, 2008.

NEUBERT, J.K., et al. Peripherally induced resiniferatoxin analgesia. **Pain**, v.104, p.219-228, 2003.

NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. **Genome Biol**, v.12, n.3, p. 218, 2011.

NOLANO, M. et al. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. **Pain**, v.81, p.135-145, 1999.

O'CONNOR, A.B, DWORKIN, R.H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. **Am J Med**, v.122, n.10, p.22-32, 2009.

ONOFRE, A.N.et al. **Dor princípios e práticas**. São Paulo: Artmed, 2009. 1438p.

OSSIPOV M.H. et al. Lack of involvement of capsaicin- sensitive primary afferents in nervalgation injury induced tactile allodynia in rats. **Pain**, v.79, p.127-133. 1999.

PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**, v.31, p. 263-276, 1987.

PARK, A. et al. Dual Effect of Exogenous Nitric Oxide on Neuronal Excitability in Rat Substantia Gelatinosa Neurons. **Neural Plasticity** v. 2014, 2014.

PAYNE, B.; NORFLEET, M.A.Chronic pain and the family: a review. **Pain**. v.26, n.1, p.1-22, 1986.

PISERA, D. Fisiologia da dor. in: dor avaliação e tratamento em pequenos animais. **OTERO, P. E. São Paulo:Interbook**, p. 30-74, 2005.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **J Comp Neurol**, v.100, p. 297-379, 1954.

RICHNER, M. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. **J Vis Exp**, v.54, p.3092, 2011.

ROWLAND, L.P; PEDLEY, T.A. **Merritt: Tratado de Neurologia**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1196p.

SAH, D.W.; OSSIPO, M.H.; PORRECA F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, n.6, p.460-72, 2003.

SCADDING, J. W. The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. **Journal of anatomy**, v. 131, n. Pt 3, p. 471-482, 1980.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Rev HCPA**, v. 28, n.3, 2008

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v.43, n.2, p.205-18, 1999.

SHIR, Y.; SELTZER, Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. **Neurosci Lett**, v.15, p.62-67, 1990.

SOOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v.6, p.184-7, 2004.

SOTGIU, M.L; BIELLA, G. Contribution of central sensitization to the pain-related abnormal activity in neuropathic rats. **Somatosens Mot Res**, v.17, p.32-38, 2000.

SZABO, T. et al. Epidural resiniferatoxin induced prolonged regional analgesia to pain. **Brain Res**, v.840, p.92-98, 1999.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Rev Pharmacol**, v. 51, p.159–212, 1999.

SZALLASI, U.M.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. **Life Sei**, v. 47, p.399-408, 1990.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience**, v.30, n. 2, p.515-20, 1989.

SZOLCSANYI, J.; JANCZO-GABOR, A.; JOO, F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v.287, p. 157-169, 1975.

VIDAL, M. A. Capsaicina tópica en el tratamiento del dolor neuropático. **Rev Soc Esp Dolor**, v.11, n.5, p. 306–318, 2004.

WALL, P.D.; GUTNICK, M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. **Exp Neurol**, v.43,p.580-593, 1974.

WALKER, J. S; TRACEY, D.J. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved. **Inflammation Research**. v.4, p.407-411. 1995.

WHITE, F. A; FELDMAN, P.; MILLER, R. J. Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. **Molecular interventions**, v. 9, n. 4, p. 188-195, 2009.

WILSON-GERWING et al. Neurotrophin-3 Suppresses Thermal Hyperalgesia Associated with Neuropathic Pain and Attenuates Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor-1 Express, 2005 ion in Adult Sensory Neurons. **J Neuroscience**. v.25, n.3, p.758-767, 2005.

WONG, G.Y.; GAVVA, N.R. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: recent advances and setbacks. **Brain Res Rev**, v. 60, n.1, p.267-77, 2009.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v.152, p.02-15, 2011.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v.353, p.1959-1964,1999.

ZHANG, K. et al. Effect of delayed intrathecal administration of capsaicin on neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **J Pain Research**, v.7, p.547-554. 2014.

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

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37.130-400
Fone: (35) 3298-1000 - Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de julho de 2014.

Prof. Marcelo Lourenço da Silva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 571/2014, intitulado "Participação dos receptores transientes de potencial vanilóide do tipo 1 (TRPV1) no controle da dor neuropática" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA - Unifal-MG