



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

MARLICE HAYUMI THELES OKUMURA

**Avaliação da ativação microglial no bulbo rostroventromedial
(RVM) durante a vigência de dor neuropática orofacial induzida
pela constrição do nervo infra-orbital**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

**Orientador: Prof. Dr. Edilson
Ervolino**

ARAÇATUBA

2015

A minha mãe, Doralice da Silva Theles, pilar da minha vida a quem devo a minha existência, por todo amor e dedicação que recebo. E ao meu noivo, Danilo Tadashi Tagami Kamimura, por todo apoio, encorajamento e companheirismo durante minha formação.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, doador da vida, por me dar a capacidade de transpor todas as dificuldades e por colocar as oportunidades em meu caminho.

Aos **animais**, pela evidente participação neste trabalho.

A meu orientador, Prof. Dr. **Edilson Ervolino**, pelo grande auxílio, instrução, paciência, experiência prestadas e pela confiança na minha capacidade e no meu trabalho.

A doutoranda **Kelly Regina Torres** que compreendeu a importância deste trabalho e me ajudou de várias maneiras; obrigada também pela dedicação ao projeto, amizade, perseverança e competência na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José de Anchieta de Castro e Horta-Júnior** do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, pela colaboração direta e fornecimento dos materiais estudados.

Ao Prof. Dr. **André Valério da Silva**, pela prestatividade e colaboração imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Aparecido Casatti**, ao Prof. Dr. **Roel Cruz-Rizzolo** e a Profa. Dra. **Roberta Okamoto**, pelo auxílio e ensinamentos científicos.

À minha família, em especial à minha mãe **Doralice da Silva Theles**, pilar da minha vida, que nunca me desamparou e sempre me prestou auxílio e incentivo, razão da minha existência.

Ao meu noivo, **Danilo Tadashi Tagami Kamimura** amigo e companheiro inseparável de todos os momentos, a quem atribuo à felicidade de todos os meus dias.

Aos meus colegas, principalmente àqueles do grupo do laboratório de Histologia, em especial ao **Luan, Gestter, Isabella e Camila** pelo convívio agradável e ajuda em horas necessárias.

A todos os **professores**, funcionários e colegas do curso de Graduação em Odontologia.

Enfim, agradeço a **todos** aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

**“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas
vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de
crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”.
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta.**

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

Fernando Pessoa

OKUMURA MHT. **Avaliação da ativação microglial no bulbo rostroventromedial (RVM) durante a vigência de dor neuropática orofacial induzida pela constrição do nervo infra-orbital.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

A patofisiologia da dor neuropática orofacial é pobremente compreendida, o que limita seu tratamento. Estudos apontam alterações no sistema endógeno de modulação da dor como um dos responsáveis pela iniciação e manutenção da dor neuropática. Dentre as principais regiões responsáveis pela modulação da dor está o bulbo rostroventromedial (RVM). Por um longo período, a dor foi vista como sendo solenemente reflexo da atividade dos neurônios, todavia, nos últimos anos, evidências apontam uma efetiva participação das células da glia, especialmente na dor neuropática. O objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de ativação microglial no RVM após constrição crônica do nervo infra-orbital (NIO). Cinquenta e quatro ratos foram distribuídos nos grupos: CCN, CTL2 e CTL1. Em CCN acessou-se cirurgicamente o NIO, e duas amarras (com fio cromado *catgut*) foram instaladas ao seu redor, para que a constrição do nervo resultasse em dor neuropática. Em CTL2, apenas acessou-se cirurgicamente o NIO (grupo controle pseudo-operado). Em CTL1 nenhum procedimento foi realizado (grupo controle intacto). Para validação da constrição do NIO como modelo experimental de dor neuropática orofacial, foi empregado o teste comportamental de hiperalgesia térmica (frio) orofacial. As eutanásias foram efetuadas aos 1, 7 e 14 dias pós-operatórios. Amostras do bulbo foram processadas e submetidas ao método imunistoquímico para detecção de CD11b, um biomarcador da microglia. O padrão de ativação microglial foi analisado via densidade óptica da imunomarcção no RVM. Apenas o grupo CCN exibiu hipersensibilidade comportamental orofacial. Não houve diferença estatisticamente significativa na imunomarcção para CD11b entre CTL2 e CTL1 em nenhum dos períodos experimentais. Em CCN houve maior imunomarcção, tanto no lado ipsilateral quanto no lado contralateral, aos 7 e 14 dias pós-operatórios, quando comparado com CTL2 e CLT1. Dentro dos limites deste estudo, concluiu-se que a microglia situada no principal centro de

modulação descendente da dor está envolvida especialmente com a manutenção da dor neuropática orofacial. Tais achados deixam evidente que, além dos neurônios, a microglia, e provavelmente a astroglia, devem ser considerados conjuntamente como alvos no tratamento efetivo da dor neuropática orofacial.

Palavras-chave: Dor Neuropática. Dor orofacial. Bulbo rostroventromedial. Microglia. Ratos.

OKUMURA MHT. **Microglial activation assessment in rostroventromedial bulb (RVM) during orofacial neuropathic pain induced by the constriction of the infra-orbital nerve.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The pathophysiology of orofacial neuropathic pain is poorly understood, limiting their treatment. Studies demonstrate changes in endogenous pain modulation system as one of those responsible for the maintenance of neuropathic pain. The rostral ventromedial medulla (RVM) is among the main areas responsible for pain modulation. For a long time, the pain was seen only as reflect of the activity of neurons. However, in recent years, evidence suggests an effective participation of glial cells, especially in neuropathic pain. The aim of this study was to evaluate the pattern of microglial activation in RVM after constriction of the infra orbital nerve (IoN). Fifty four rats were distributed into three groups: CCI, CTL2 and CTL1. In CCI group, we accessed the infra orbital nerve (IoN) surgically, and two ligature (catgut chrome wire) were installed around it, to result in neuropathic pain. In CTL2 group, we only accessed the IoN surgically (sham-operated control group). While in CTL1 group no procedure was executed (control group intact). It was used facial grooming behavioral test after thermal stimulation (cold) in the region of adjacent vibrissae to validate the chronic constriction of the IoN as an experimental model of orofacial neuropathic pain. The euthanasia was performed at 1, 7 and 14 days postoperatively. Brain stem (medulla oblongata) samples were processed and submitted to an immunohistochemical method for detecting CD11b, a marker of microglia. The pattern of microglial activation was analyzed by optical density immunolabeling. Only the CCI group showed orofacial neuropathic pain behavior. There was no statistically difference between CTL2 and CTL1 groups in any of the experimental periods. There was a higher immunolabeling pattern showed in CCI both ipsilateral as on the contralateral side at 7 and 14 days postoperatively when compared with CTL2 and CLT1. Within the limits of this study, it was concluded that microglia located in the main center of descending pain modulation is involved especially in the maintenance of orofacial

neuropathic pain. These findings make it clear that, beyond to neurons, microglia should also be considered one of the targets in the treatment of orofacial neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain. Orofacial pain. Rostral ventromedial medula. Microglia. Rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma ilustrando o delineamento experimental do presente estudo. 36
- Figura 2 - Fotografias demonstrando a constrição do NIO. Em (a) uma representação esquemática da constrição do NIO. De (b-f) está evidenciada a sequência cirúrgica de constrição do NIO: assepsia e tricotomia (b), incisão (c), dissecação do NIO (d), instalação de duas amarras com um espaçamento de dois milímetros entre elas (e) e sutura da ferida cirúrgica (f). 36
- Figura 3 - Esquema evidenciando o localização do RVM no encéfalo em um corte longitudinal (a) e em corte transversal (b). O RVM foi definido como um triângulo isósceles (delimitação em vermelho) que compreende as seguintes estruturas anatômicas: núcleo reticular gigantocelular (GiA), núcleo principal inferior da oliva (IOPr), núcleo magno da rafe (RMg), núcleo pálido da rafe (Rpa) e parte ventral do núcleo obscuro da rafe (Rob). Abreviações: Tz, núcleo do corpo trapezoidal; py, trato piramidal; 7L, subnúcleo lateral do núcleo facial. Esquema adaptado de VANEGAS et al., 2004 e Paxinos e Watson 2007. 36
- Figura 4 - Gráficos demonstrando a evolução do peso corporal ao longo do período experimental nos grupos CTL1 (traçado cinza), CTL2 (traçado azul) e CNN (traçado vermelho). Houve aumento progressivo do peso corporal em todos os animais em todos os grupos experimentais e não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada um dos períodos experimentais. 37
- Figura 5 - Fotografias demonstrando o teste comportamental de hiperalgesia térmica ao frio. Em (a) está evidenciado o local onde o tetrafluoroetano foi aplicado. De (b-d) está evidenciada a sequência comportamental que define a manipulação facial considerada o comportamento de 37

hiperalgesia térmica ao frio.

Figura 6 - Gráficos demonstrando o padrão comportamental avaliado pelo tempo de manipulação facial nos grupos CTL1, CTL2 e CCN um dia antes da constrição do NIO e 1, 7 e 14 dias pós-operatórios. Teste estatístico: Análise de variância - ANOVA; Pós-teste de Newman-Keuls. Observar que em CCN ocorre um aumento progressivo da manipulação facial após a constrição do NIO, a qual passa a ser estatisticamente significativa aos 7 e 14 dias pós-operatórios. Abreviações: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL1 no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL2 no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CCN um dia antes da cirurgia de CNIO e 1 dia pós-operatório. 37

Figura 7 - Gráficos demonstrando a densidade óptica de imunomarcção para CD11b na RVM. De (a - c) gráficos evidenciando o padrão de imunomarcção aos 1 (a), 7 (b), 14 (c) dias pós-operatórios tanto no lado ipsilateral como no lado contralateral de todos os grupos experimentais. De (d - e) gráficos evidenciando o padrão de imunomarcção o padrão de imunomarcção no lado ipsilateral (d) e no lado contralateral (e) 1 (a), 7 (b), 14 (c) dias pós-operatórios de todos os grupos experimentais. Teste estatístico: Análise de variância - ANOVA; Pós-teste de Tukey. Abreviações: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL1 no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL2 no mesmo período. 38

Figura 8 - Padrão de imunomarcção para CD11b, o biomarcador da microglia, no RVM. Fotomicrografias evidenciando a microglia CD-11-IR no RVM. Em (a), fotomicrografia evidenciando o aspecto morfológico da microglia CD-11-IR, onde pode ser observado o pequeno corpo celular e 38

inúmeros prolongamento citoplasmáticos intensamente ramificados. De (b - g) estão sendo apresentadas fotomicrografias que representam o padrão de imunomarcção para CD11b no RVM nos grupos CTL1 (b e e), CTL2 (c e f) e CCN (d e g) aos 7 dias pós-operatórios no lado ipsilateral (b - d) e no lado contralateral (e - g). Observar a maior densidade óptica de imunomarcção para CD11b no RVM em CCN tanto no lado ipsilateral quanto no lado contralateral em comparação com CTL1 e CTL2. Aumento original: (a), 1000x; (b-g), 200x. Barras de escala: (a), 15 μm ; (b-g), 100 μm .

LISTA DE ABREVIATURAS

± = mais ou menos

°C = grau Celcius

% = porcentagem

Sp5O = subnúcleo oral núcleo do trato espinal do trigêmeo

Sp5I = subnúcleo interpolar do núcleo do trato espinal do trigêmeo

Sp5C = subnúcleo caudal do núcleo do trato espinal do trigêmeo

SNC = Sistema Nervoso Central

GFAP = proteína fibrilar ácida da glia

PAG = substância cinzenta periaquedutal

PBS = Solução Salina Tamponada

CEUA = Comitê de Ética no Uso de Animais

NRM = Núcleo magno da rafe

CNIO = constrição do nervo infra-orbital

NIO = nervo infra-orbital

RVM = bulbo rostroventromedial

ABC = complexo avidina biotina

DAB = solução de tetracloreto de diaminobenzidina

GiA = núcleo reticular gigantocelular

IOPr = núcleo principal inferior da oliva

RMg = núcleo magno da rafe

Rpa = núcleo pálido da rafe

Rob = núcleo obscuro da rafe

Tz = Núcleo do corpo trapezóide

Py = Trato piramidal

7L = núcleo facial subnúcleo lateral

IASP = International Association for the Study of Pain

FOA = Faculdade de Odontologia

CCN = grupo constrição crônica do nervo infra-orbital

CTL1 = grupo controle intacto

CTL2 = grupo controle pseudo-operado

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
2.	Objetivo	20
3.	Metodologia	21
4.	Resultados	27
5.	Discussão	29
6.	Conclusão	34
	Figuras	35
	Referências	39
	Anexos	45

1. Introdução

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*IASP: International Association for the Study of Pain*) define dor como uma experiência emocional desagradável relacionada com um dano tecidual real ou potencial. Pode ser classificada em dor nociceptiva e dor neuropática (MERSKEY et al., 1994). A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores da via nociceptiva, devido à lesão direta dos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular (BENNETT et al., 2006). A disfunção ou lesão tecidual direta ou indireta de estruturas do tecido nervoso do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, pode resultar em dor neuropática, que é o resultado da ativação anormal da via nociceptiva (MERSKEY et al., 1994). A dor neuropática pode ocorrer de forma espontânea ou provocada por estímulos normalmente inócuos, nocivos e não nocivos. Desta forma, quando a área afetada é estimulada, podem ocorrer alodínia (sensação dolorosa devido estímulo não nocivo) e hiperalgesia (resposta exacerbada à dor após estímulo nocivo) (FINNERUP et al., 2004).

A neuralgia do trigêmeo é o tipo de dor neuropática orofacial mais comum, com uma incidência estimada em 4-5 para cada 100.000 indivíduos (KATUSIC et al., 1990). Apresenta-se como episódios de dor em pontadas ou dor penetrante, limitada à área inervada por um ou mais ramos do nervo trigêmeo. Embora os episódios sejam breves, são extremamente dolorosos, manifestando-se como sensações de choque elétrico, forte queimação ou descarga repentinas explosivas (WANG et al., 2003; GRONSETH et al., 2008). Tal condição torna-se um grande desafio para a odontologia e medicina tendo em vista que, como sua etiopatogenia é pobremente compreendida, existe uma enorme limitação no seu tratamento o qual se mostra atualmente muito pouco efetivo (IDANPAAN-HEIKKILA et al., 1999).

O nervo trigêmeo constitui no quinto par de nervos cranianos e é classificado como um nervo misto, ou seja, composto por fibras nervosas sensitivas e motoras. Conduz informações via três ramos: o oftálmico, o maxilar e o mandibular, os quais, juntamente com suas ramificações, fornecem a inervação somato-sensorial de grande parte da cabeça e da face (WILLIAMS et al.,

1995). Os ramos oftálmico e maxilar são puramente sensoriais, todavia, no ramo mandibular trafegam também fibras nervosas motoras responsáveis pela inervação dos músculos da mastigação (BRODAL, 1981; USUNOFF et al., 1997).

Os neurônios sensoriais primários relacionados com este nervo estão situados no gânglio trigeminal. Pelas fibras nervosas de tais neurônios trafegam os impulsos nervosos exteroceptivos (temperatura, dor, pressão e tato) de grande parte da região crânio-facial. Estes são conduzidos pelos prolongamentos centrais desses neurônios até o complexo nuclear sensorial trigeminal situado no tronco encefálico, o qual também recebe fibras nervosas dos nervos facial, glossofaríngeo, vago e cervical superior (C1, C2 e C3) (WILLIAMS et al., 1995). Dentre os núcleos que compõem o complexo sensorial trigeminal está o núcleo do trato espinhal (Sp5), o qual é subdividido em: subnúcleo oral (Sp5O), subnúcleo interpolar (Sp5I) e subnúcleo caudal (Sp5C), sendo que este último é o sítio onde se concentram a maior parte dos neurônios sensoriais de segunda ordem da via trigeminal nociceptiva. Este neurônios de segunda ordem se projetam especialmente para o núcleo ventral pósteromedial do tálamo, mas também para a formação reticular situada no tronco encefálico. No tálamo, onde estão situados a maior parte dos neurônios de terceira ordem ocorre a projeção especialmente para o córtex somestésico primário relacionado com a região crânio-facial, mas também podem se projetar para outras áreas do córtex cerebral (DARIAN-SMITH, 1966; SESSLE, 1996; SESSLE, 2000).

A integração do fenômeno doloroso é um processo extremamente complexo, onde os neurônios que conduzem a informação nociceptiva ficam sujeitos à influência de outras células, neurônios e células da neuroglia, as quais são capazes de exercer ação inibitória ou excitatória sobre esses neurônios (BESSON, 1999). A informação nociceptiva que atinge o Sp5C está sujeita a modulação efetuada por neurônios que constituem o sistema endógeno de modulação da dor. O principal circuito neural que entra na constituição deste sistema envolve a substância cinzenta periaqueductal (PAG) – bulbo rostroventromedial (RVM) – Sp5C. A PAG envia fibras nervosas para o Sp5C usando a RVM como uma estação intermediária (REN E DUBNER, 2002).

No RVM podem ser classificados três tipos de neurônios: células-ON, células-OFF e células-NEUTRAS (PERTOVARA et al., 2001; PINTO-RIBEIRO et al., 2008; MIKI et al., 2002). As células-ON têm sido associadas com o aumento da resposta comportamental à dor, e foram, portanto, consideradas com ação pró-nociceptiva, envolvidas com a facilitação descendente da dor. Em contrapartida, as células-OFF estão envolvidas com a diminuição da resposta comportamental à dor e são consideradas com ação anti-nociceptiva, ou seja, envolvida com a inibição descendente da dor. Enquanto que o papel das células-NEUTRAS permanece indefinido, sugerindo-se que não estão relacionadas com sua resposta comportamental à dor (FIELDS et al., 1983). Portanto, o balanço entre inibição descendente da dor e facilitação descendente da dor é que vai determinar o efeito modulatório da RVM (VANEGAS et al., 2004).

Por um longo período, a dor, incluindo a dor orofacial, e a sua modulação foi vista como sendo solenemente reflexo da atividade dos neurônios. No entanto, especialmente nos últimos anos, um corpo crescente de evidências aponta a participação das células da neuroglia como fundamentais no processamento, e provavelmente na modulação, da informação nociceptiva (NAKAJIMA & KOHSAKA, 2001; KREUTZBERG, 1996; STOLL & JANDER, 1999; WATKINS et al., 2005). A neuroglia representa cerca de 90% das células que constituem o tecido nervoso situado no SNC. Por muito tempo essa grande população de células foi considerada como um arcabouço de sustentação relativamente passiva, que assegurava a execução das complexas funções desempenhadas fundamentalmente pelos neurônios (KETTENMANN & RANSOM, 2005). Do ponto de vista estrutural e funcional, as células da neuroglia no SNC consistem em uma população bastante heterogênea, constituída pelos: astrócitos, oligodendrócitos, microglia, e células ependimárias.

Atualmente, os astrócitos e a microglia tem recebido considerável atenção nas pesquisas que procuram elucidar as bases biológicas da dor neuropática. Tais células quando passam para um estado ativado sintetizam e secretam uma variedade de mediadores químicos, muitos dos quais aumentam a excitabilidade dos neurônios situados em suas adjacências, ou seja, contribuindo diretamente para a sensibilização central. Além disso, quando

ativadas, a astrogliosa e a microglia elevam a expressão da proteína fibrilar ácida da glia (GFAP) e da molécula de superfície CD11, respectivamente, os quais são biomarcadores célula-específicos facilmente detectáveis pela técnica imunohistoquímica (NAKAJIMA & KOHSAKA, 2001).

A microglia perfaz de 5-10% da população total de células da neuroglia (KREUTZBERG, 1996; STOLL & JANDER, 1999) e, estão presentes em todo o SNC (MITTELBRONN et al., 2001). São derivadas das células da linhagem mielomonocítica da medula óssea que ao atingirem o tecido nervoso perdem a morfologia amebóide e passam a ser portadoras de pequeno corpo celular, do qual partem inúmeros processos que se ramificam profusamente (STREIT, 2002). Os processos das células da microglia estão entre as estruturas mais dinâmicas do SNC. Estes possuem uma alta motilidade, que exerce uma atividade exploratória constante nas áreas de sua abrangência, característica essa que torna a microglia passível de responder prontamente a alterações do meio interno. Uma outra característica que evidencia o dinamismo de tais processos é sua alta capacidade de ramificação frente a determinados estímulos, o que geralmente é acompanhado por um aumento volumétrico da célula como um todo, que passa a sintetizar e secretar inúmeras moléculas que afetam substancialmente o processo que elicitou a sua ativação (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHM et al., 2005). A microglia ainda é capaz de rapidamente assumir uma morfologia amebóide, o que permite que esta célula exerça sua ação fagocitária, e possa ainda proliferar e migrar no interior do tecido nervoso (VAN ROSSUM & HANISH, 2004). Tem sido reportado que após hiperativação celular, as células da neuroglia, especialmente astrogliosa e microglia, liberam citocinas ao nível tanto da medula espinhal (DELEO et al., 2004; SALTER 2004) quanto dos núcleos trigeminais (PIAO et al., 2006), e que isso tem relação com os mecanismos centrais da dor neuropática (REN & DUBNER, 2008).

Diante do exposto e da limitada compreensão acerca da dor neuropática orofacial, há estudos que apontam alterações no sistema endógeno de modulação da dor como envolvidos na manutenção da dor neuropática. Dentre as principais regiões responsáveis por esta modulação está o RVM. O papel modulatório exercido pelo RVM depende do balanço entre a inibição

descendente da dor e a facilitação descendente da dor. O comportamento assumido pelos neurônios no RVM para resultar em efeitos inibitórios e efeitos excitatórios foi relativamente bem explorado, todavia, ainda impera muita dúvida acerca de tudo que pode influenciar a resposta de tais neurônios. Soma-se a isso o fato dos neurônios serem a minoria em um território densamente povoados por células da glia, que potencialmente são capazes de exercer alguns efeitos modulatórios sobre tais neurônios. Portanto, investigar o comportamento e as ações desempenhadas por tais células pode auxiliar a compreender de modo integrado os mecanismos de modulação da dor neuropática orofacial.

2. Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de ativação microglial, via imunomarcção de CD11b, no RVM após constrição do NIO, em um modelo experimental de dor neuropática orofacial.

3. Metodologia

No presente estudo foram utilizados 54 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal compreendido entre 180 – 280g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FOA – UNESP) e posteriormente foram mantidos no Biotério de Experimentação da Disciplina de Histologia e Embriologia da FOA-UNESP sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em gaiolas plásticas (4 animais por gaiola), onde tiveram livre acesso ao alimento e à água. Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “*The International Association for the Study of Pain*” e “*Guide to the care and use of experimental animals*”. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (Protocolo nº 01186-2012).

3.1. Delineamento experimental

3.1.1. Protocolo de habituação dos animais

Ao serem trazidos do Biotério Central para o Biotério de Experimentação, todos os animais passaram por um período de habituação. Tal protocolo compreendeu os 21 dias que antecederam o início do delineamento dos grupos experimentais. Os primeiros 14 dias foram para promover a familiarização dos animais com o ambiente. Os 7 dias que antecederam o delineamento dos grupos foi para assegurar a familiarização dos animais com o operador e minimizar o estresse provocado por algumas manobras empregadas no teste comportamental de hiperalgesia térmica orofacial. Neste período, dentro do ciclo claro (entre 07:00 e 11:00 horas), cada animal foi transportado para a Sala de Experimentação e foi mantido neste local durante 1 hora. Em seguida cada

animal foi suavemente manuseado entre as mãos do operador durante um intervalo de 1 minuto, no qual foram aplicadas manobras de restrição que simularam aquelas empregadas no teste comportamental. Este protocolo de habituação foi repetido novamente após três dias.

3.1.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: CCN (n=18), CTL1 (n=18) e CTL2 (n=18).

Grupo CCN (constricção crônica do nervo infraorbital): neste grupo o nervo infra-orbital (NIO) direito foi acessado cirurgicamente e foram instaladas duas amarras com fio cromado *catgut* ao seu redor, com um espaçamento de dois milímetros, entre elas. Aos 0, 1, 7 e 14 dias pós-operatórios foi realizado o teste comportamental e posteriormente a eutanásia (Fig. 1).

Grupo CTL2 (controle pseudo-operado): neste grupo o nervo infraorbital (NIO) direito apenas foi acessado cirurgicamente e novamente os tecidos foram reposicionados. Aos 0, 1, 7 e 14 dias pós-operatórios foi realizado o teste comportamental e posteriormente a eutanásia (Fig. 1).

Grupo CTL1 (controle intacto): neste grupo não foi realizado nenhum procedimento cirúrgico, apenas o dia 0 foi estabelecido. Aos 0, 1, 7 e 14 dias foi realizado o teste comportamental e posteriormente a eutanásia (Fig. 1).

3.1.3. Monitoramento das condições gerais de saúde dos animais

As condições gerais de saúde dos animais, assim como, a evolução do peso corporal foram monitoradas ao longo de todo o período experimental.

3.1.4. Anestesia

Para os procedimentos cirúrgicos e para a eutanásia, os animais foram anestesiados via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

3.1.5. Constrição crônica do NIO

Esta técnica foi realizada a partir do modelo estabelecido por VOS et al. (1994) e modificada por CHICHORRO et al. (2006) (Fig. 2a). Após o estabelecimento de um plano profundo de anestesia, foi realizada a assepsia e tricotomia nas adjacências das vibrissas do lado direito (Fig. 2b). O acesso ao NIO, foi realizado via uma incisão na pele, cinco milímetros abaixo do olho e três milímetros posterior à inserção das vibrissas (Fig. 2c). Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram delicadamente afastados com um instrumento de ponta romba, de modo que a porção mais rostral do NIO fosse exposta, próximo ao forame infraorbital (Fig. 2d). O NIO foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, duas amarras com fio cromado catgut (4-0, Sertix®, GO, Brasil) foram instaladas ao redor do feixe nervoso, com um espaçamento de dois milímetros de distância entre elas (Fig. 2e). As amarras reduziram o diâmetro do nervo de maneira perceptível, sem contudo interferir na vascularização superficial, como proposto por BENNETT e XIE (1988). Imediatamente após a cirurgia, os tecidos foram reposicionados e as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda (4-0, Ethicon®, Johnson & Johnson, SP, Brasil) (Fig. 2f). Ao término da cirurgia, os animais foram mantidos em sala aquecida até seu completo restabelecimento e foram mantidos em caixas individuais.

3.1.6. Teste comportamental de hiperalgesia térmica orofacial

O teste de hiperalgesia térmica ao frio foi observado pelo tempo de manipulação facial (*grooming facial*: movimento padrão onde os animais

manipulam a área da face estimulada com as patas dianteiras, como descrito por BERRIDGE e ALDRIDGE, 2000) e foi realizado um dia antes da instalação das amarras e 1, 7 e 14 dias pós-operatórios no período compreendido entre 9:00 – 11:00.

Cada animal foi individualmente transportado em uma caixa plástica sem água e sem alimento, e mantidos na Sala de Experimentação por trinta minutos. Em seguida cada animal foi gentilmente imobilizado pelo operador e foi feita a aplicação do gás refrigerante tetrafluoretano (-50° Endo-Ice®, Brasil), via utilização de um *spray*, por um segundo no lado direito (lado ipsilateral), no centro das vibrissas. Imediatamente após a aplicação do tetrafluoroetano, o tempo despendido pelos animais realizando o movimento de manipulação facial bilateral foi computado com a utilizando de um cronômetro durante um intervalo de dois minutos.

No presente estudo, antes da cirurgia de constrição do NIO, foi realizado o primeiro teste comportamental de hiperalgesia térmica orofacial. Este teste fez parte dos critérios de inclusão dos animais no estudo. Apenas os animais que apresentaram um tempo de manipulação facial inferior a 20 segundos, após a aplicação do tetrafluorotano, foram incluídos no estudo.

3.1.7. Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução 0,9% de cloreto de sódio acrescida de 0,1% de heparina (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma Aldrich®, MO, USA) em tampão fosfato salino (PBS – Sigma Aldrich®), 0,1M, 4°C, pH 7,4. Os encéfalos foram cuidadosamente dissecados e submetidos à pós-fixação na mesma solução fixadora durante 4 horas e crioprotégidos com solução de PBS acrescida de 20% de sacarose durante 24 horas.

3.1.8. Processamento imunoistoquímico das amostras

Os troncos encefálicos (bulbo) foram seccionados transversalmente em micrótomo de congelação com 30 µm de espessura. Ao término da criomicrotomia e após cada uma das etapas da reação imunoistoquímica, os cortes histológicos foram lavados em PBS. Posteriormente foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovino (Sigma Aldrich®) por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As secções histológicas foram incubadas em anticorpo primário anti-CD11b do rato gerado em camundongo (1:100; BMA Biomedicals®, Augst, Switzerland), durante 24 horas. Posteriormente os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotinilado (1:800; Vector Laboratories®, CA, USA) por 1 hora e com complexo avidina biotina peroxidase (1:500; Vector Laboratories®, CA, USA) por 1 hora. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (Sigma Aldrich®). Em seguida foi efetuada a montagem dos cortes histológicos em lâminas de vidro gelatinizadas, desidratação em etanol, diafanização em xilol e, recobrimento com meio de montagem (DPX, Sigma Aldrich®) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.2. Análise dos dados

3.2.1. Definição do RVM

A definição do RVM empregado no presente estudo foi aquela definida por VANEGAS et al., (2004), ou seja, um triângulo isoscéles que tem no comprimento de sua base a porção mais superior do trato piramidal e sua altura correspondente à metade de seu comprimento, limitado em sua porção mais rostral pelo início do núcleo do corpo trapezóide e em sua porção mais caudal pelo núcleo facial subnúcleo lateral. Compreende as seguintes estruturas anatômicas: núcleo reticular gigantocelular (GiA), núcleo principal

inferior da oliva (IOPr), núcleo magno da rafe (RMg), núcleo pálido da rafe (Rpa) e parte ventral do núcleo obscuro da rafe (Rob) (Fig. 3b).

3.2.2. Análise imunoistoquímica para detecção de CD11 no RVM

Para a análise da densidade ótica de imunomarcção pra CD11b foram capturadas imagens da área descrita acima com a utilização de uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss) acoplada ao microscópico óptico (Axiolab, Carl Zeiss) e conectada a um microcomputador. Com um aumento de 250x foram obtidas três imagens do centro do RVM do lado ipsilateral e três imagens do centro da RVM do lado contralateral. O nível crânio-caudal de cada uma destas três secções histológicas é: secção mais cranial, -10,50 mm em relação ao Bregma; secção intermediária, -11,25 mm em relação ao Bregma e; secção mais caudal, -12,00 mm em relação ao Bregma (Fig. 3b).

Com auxílio de um programa de análise de imagens (ImageJ®, Microsoft Java) foi demarcada a imunomarcção por meio da ferramenta *limiar de cor*. A densidade ótica que discrimina a imunomarcção (coloração acastanhada) foi obtida e os dados foram expressos como porcentagem média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.2.3. Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados obtidos no teste comportamental de hiperalgesia térmica foi empregado a análise de variância - ANOVA e o pós-teste de Neuman-Keuls. Os dados correspondentes à densidade ótica da área imunomarcada com CD11 foi empregado a análise de variância – ANOVA e o pós-teste de Tukey Kramer. Em ambos os testes o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Condições gerais dos ratos

As condições gerais de saúde dos ratos se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Os ratos toleraram muito bem o procedimento cirúrgico de constrição crônica do NIO e a pseudo-cirurgia. Ao exame clínico, constatou-se que nos grupos CCN e CTL2 o processo de reparação tecidual ocorreu dentro de um padrão de normalidade. Não houve diferença estatisticamente significativa no peso corporal quando foram realizadas as comparações intergrupo e intragrupo (Fig. 4)

4.2. Teste comportamental de hiperalgesia térmica orofacial

Comumente o teste comportamental de hiperalgesia térmica orofacial (ao frio) é empregado para validação do modelo de dor neuropática induzido pela constrição crônica do NIO. No presente estudo o modelo experimental empregado foi capaz de alterar significativamente o padrão comportamental de manipulação facial (Fig. 5) dos animais. Em CCN houve tempo de manipulação facial significativamente maior que nos grupos controle (CTL1 e CTL2) aos 7 e 14 dias pós-operatórios. Após 1 dia da constrição crônica esse padrão comportamental não diferiu do nível basal. Nos grupos CTL1 e CTL2 não houve diferença estatisticamente significativa intergrupo e intragrupo na manipulação facial ao longo dos períodos experimentais analisados (Fig. 6).

4.3. Padrão de imunomarcção para CD11 na RVM

A técnica imunoistoquímica empregada para imonomarcção de CD11b no RVM mostrou alta especificidade na detecção dessa proteína, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação imunoistoquímica. A imunomarcção apresentava uma coloração acastanhada

confinada ao corpo celular e aos prolongamentos citoplasmáticos das células da microglia (Fig. 8).

Não houve diferença estatisticamente significativa intergrupo e intragrupo na densidade óptica de imunomarcacão para CD11 no RVM entre CTL1 e CTL2 em nenhum dos períodos avaliados neste estudo (1, 7 e 14 dias pós constricção do NIO) (Fig 7). No grupo CCN a densidade óptica de imunomarcacão foi significativamente maior que CTL1 e CTL2 tanto após 7 quanto após 14 dias da constricção crônica do NIO em ambos os lados, todavia, não houve diferença estatisticamente significativa no primeiro período analisado, 1 dia pós constricção, tanto do lado ipsilateral quanto do lado contralateral. Neste grupo, em ambos os lados, após 7 e 14 dias da constricção crônica do NIO a densidade óptica de imunomarcacão apresentou diferença estatisticamente significativa, no entanto, ambos períodos mostraram maior imunomarcacão em relação ao período de 1 dia pós constricção neural (Fig 7).

5. Discussão

A patofisiologia da dor neuropática orofacial é pobremente compreendida, o que limita sobremaneira o seu tratamento. Estudos apontam alterações no sistema endógeno de modulação da dor como um dos responsáveis pela iniciação e manutenção da dor neuropática. Dentre as principais regiões responsáveis pela modulação da dor está o RVM. O papel modulatório exercido pelo RVM depende do balanço entre a inibição descendente da dor e a facilitação descendente da dor desempenhada por esta área. Por um longo período, a dor foi vista como sendo solenemente reflexo da atividade dos neurônios, todavia, nos últimos anos, evidências apontam uma efetiva participação das células da neuroglia, em especial na dor neuropática. A astroglia e a microglia são apontadas como as principais células da neuroglia envolvidas com a dor. Recentemente, estudos apontam para um envolvimento da astroglia e microglia também com a modulação da dor.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de ativação microglial no RVM durante a vigência de dor neuropática orofacial. Empregou-se um modelo experimental onde a dor neuropática foi ocasionado pela constrição crônica do NIO. Neste estudo utilizou-se um biomarcador da microglia, CD11b, e se avaliou sua imunomarcagem no RVM após 1, 7 e 14 dias da constrição crônica do NIO. Houve maior imunomarcagem para CD11b, tanto no lado ipsilateral quanto no lado contralateral, aos 7 e 14 dias pós-operatórios, quando comparado com os grupos controle, indicando o envolvimento da microglia da RVM na modulação descendente da dor neuropática orofacial.

Vários são os modelos experimentais de dor neuropática validados na literatura. Dentre eles os mais empregados atualmente são: lesão constritiva crônica, (BENNETT & XIE, 1988), ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER et al., 1990), ligadura de nervo espinal (KIM & CHUNG, 1992), lesão neural parcial (DECOSTERD & WOOLF, 2000), entre outros. Destes, a constrição crônica é bastante empregada, em especial, quando se preconiza o estudo dor neuropática orofacial. Um dos nervos mais preconizados para se estabelecer

modelos de dor neuropática orofacial é o NIO. Empregamos neste estudo a constrição crônica do NIO para gerar a dor neuropática orofacial e, tal escolha se baseou em vários critérios: a fácil execução, tendo em vista o acesso do NIO e a instalação da ligadura; rápido processo de reparação da ferida cirúrgica, com um pronto restabelecimento dos animais; os sinais de dor neuropática surgirem em um tempo relativamente rápido; e também por se tratar de um dos modelos mais utilizados para induzir dor neuropática orofacial, o que faz com que o estabelecimento de comparações com outros estudos possam ser realizadas. Além disso, alguns autores sugerem que o sistema trigeminal é bem mais propenso ao desencadeamento da dor neuropática em função da peculiaridade anátomo-fisiológica (KERR, 1970; SWEET, 1984). Aliado a este fato, a maioria das síndromes de dor neuropática orofacial está relacionada com danos em ramificações do nervo trigeminal (GREGG et al., 1979).

Segundo alguns pesquisadores, o movimento de manipulação facial é definido como “uma atividade primária de suma importância para a sobrevivência do animal, a qual envolve uma forma de cuidado e atenção com o corpo, seja ela executada por um indivíduo ou por membros da mesma espécie” (MCFARLAND, 1987). Tais animais utilizam a manipulação facial para remover restos de objetos na superfície dos olhos, focinho e de outros órgãos dos sentidos (BOLLES, 1960) e para defender o tegumento contra fatores biológicos, como ectoparasitas e outros microrganismos (SVENSON & RANDALL, 1977), além de ter papel fundamental na termorregulação e espalhar feromonas como sinalização social. Outra função da manipulação facial é a tentativa de remover o que está ocasionado a dor e o desconforto, ou a tentativa de aliviar tais sintomas, o que tem um papel particularmente importante nas pesquisas que envolvem dor experimental (GRISWOLD et al., 1977). A mudança de comportamento é interpretada como uma manifestação espontânea, e de sensação fortemente aversiva e possivelmente dolorosa na região da face (VOS et al., 1994; DESEURE & ADRIAENSEN, 2004).

Nos principais modelos de dor neuropática, as alterações comportamentais passam a ser evidentes após um período de dois a cinco dias pós-operatórios e perduram por mais de 14 dias (SELTZER et al., 1990; KIM & CHUNG, 1992;

RO & JACOBS, 1993), o que corrobora com nossos achados. No presente estudo, apenas os animais que foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo infra orbital, obtiveram maior tempo de manipulação facial quando comparados com os demais grupos controle, CTL1 e CTL2, sendo que este aumento foi estatisticamente significativo aos 7 e 14 dias pós-operatórios. Tal comportamento foi semelhante ao relatado por outros pesquisadores os quais relatam episódios recorrentes de manipulação facial após a aplicação do gás refrigerante tetrafluoreto, o qual é considerado inócuo, no entanto, desencadeador de hiperalgesia quando na vigência de dor neuropática (VOS et al., 1994).

No presente estudo, no que se refere à ativação microglial, não se observou diferença entre os grupos controle e o grupo CCN 1 dia após a constrição do NIO. Todavia, constatou-se que aos 7 e 14 dias pós-construção do NIO a ativação microglial se mostrou significativamente maior que nos grupos controle intacto (CTL1) e controle pseudo-operado (CTL2). Tais achados são um indício de que a microglia esteja envolvida com a manutenção da dor neuropática orofacial, no entanto, parece não exercer uma participação efetiva em sua iniciação.

Nossos achados corroboram com o estudo de LUI et al. (2012) que reportaram uma pronunciada ativação microglial e astrogliar na RVM em um modelo de dor óssea induzida pelo câncer. Tais autores verificaram ainda que ocorre um pronunciado aumento na quantidade de mediadores com atividade pró-inflamatória, $TNF\alpha$, $IL1\beta$ e $IL-6$ na RVM neste modelo experimental. Da mesma forma, ROBERTS et al. (2009) empregando um modelo de dor inflamatória constatou aumento da imunomarcagem da microglia e da astrogliar na RVM. Em contrapartida, ZHANG et al. (2008) em um trabalho que empregou a ligadura do nervo peroneal como modelo de dor neuropática observou ativação microglial apenas ao nível da medula espinal, não constatando ativação da microglia no RVM, PAG, hipocampo, amígdala, córtex insular, córtex somatosensorial primário e secundário, córtex pré-frontal e córtex cingulado anterior. Estes dados indicam que a ativação microglial se comporta de maneira diferente quando se trata de diferentes modelos de dor, mas também com relação à origem da dor, dor espinal e orofacial.

Estudos mostram que a interação recíproca entre neurônios e neuroglia é modulada por diferentes mediadores inflamatórios, alguns dos quais produzidos pela microglia, outros atuando sobre a microglia, para fazer com que tais células possam fazer o seu papel na modulação descendente da dor. GUO et al., (2014) reportaram que a via de sinalização dos neurônios para a microglia é realizada através de uma quimiocina denominada fractalcina, a comunicação da microglia com os astrócitos é feita pela IL-18, ao passo que a comunicação dos astrócitos com os neurônios é feita e sinalizada pela IL-1 β . WEI et al (2008) comprovou que a astroglia é capaz de produzir tanto IL1 β quanto TNF α , após constrição do NIO e que o RVM exhibe uma elevação prolongada destas citocinas com atividade pró-inflamatória. Esse trabalho demonstrou que a neutralização do TNF α e IL1 β na RVM reduz a hipersensibilidade comportamental e atenua significativamente a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA. Em contrapartida, a administração de TNF α e IL1 β no RVM aumenta a fosforilação desta subunidade do receptor NMDA e ocasiona severa hiperalgisia comportamental. E que tais neurônios do RVM exibem receptores para TNF α , TNFR1, e para IL1 β , IL1R. Tais dados demonstram que a microglia está envolvida na modulação da dor neuropática orofacial e que estas células são um elemento chave entre os neurônios e a astroglia.

Estudos mostram que a microinjeção do inibidor da microglia, minociclina, no RVM atenua a hiperalgisia comportamental em um modelo de dor inflamatória (ROBERTS et al. 2009) e a alodínia mecânica em um modelo de dor óssea induzida pelo câncer. Esses dados indicam que a ativação microglial está relacionada com a facilitação descendente da dor. Portanto, no presente estudo, onde a ativação microglial foi elevada em nosso modelo de dor neuropática orofacial, supõe-se que tais células estejam envolvidas com a facilitação descendente da dor.

No RVM encontramos células-ON, células-OFF e células-NEUTRAS (PERTOVARA et al., 2001; PINTO-RIBEIRO et al., 2008; MIKI et al., 2002). As células-ON têm sido associadas com o aumento da resposta comportamental à dor, envolvidas com a facilitação descendente da dor. Em contrapartida, as células-OFF estão envolvidas com a diminuição da resposta comportamental à

dor, ou seja, envolvida com a inibição descendente da dor (FIELDS et al., 1983). Portanto, o balanço entre inibição descendente da dor e facilitação descendente da dor é que vai determinar o efetivo papel na RVM.

No presente estudo, o comportamento de hiperalgesia térmica (ao frio) passou se mostrar gradativamente mais elevado 1, 7 e 14 dias após a constrição do NIO, o qual se tornou estatisticamente significante nos últimos períodos avaliados. A exacerbação da resposta comportamental de hiperalgesia térmica está correlacionada com o aumento no padrão de ativação microglial, o que sugere uma correlação entre estes dois fenômenos. Essa ativação microglial pode estar, pelo menos em parte relacionada com ativação, supostamente indireta, das células-ON da RVM, as quais estão envolvidas com a facilitação descendente da dor.

Diante do exposto, estando a dor neuropática orofacial relacionada com alterações no sistema endógeno de modulação da dor, e verificando-se que dessa modulação participam neurônios com função de inibição descendente, neurônios com função de facilitação descendente, astrócitos, microglia e todo um mecanismo de sinalização intercelular que permite a interação de neurônios-neurônios, neuroglia-neurônios e neuroglia-neuroglia, o tratamento dessa condição é de enorme complexidade, portanto, sua efetividade dependerá do quão se conseguirá atingir desse complexo celular e de interação intercelular com a terapia.

6. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir que a microglia situada no principal centro de modulação da dor, o RVM, está envolvida com a manutenção da dor neuropática orofacial. Tais achados deixam evidente que, além dos neurônios, a microglia, e provavelmente a astroglia, devem ser considerados conjuntamente como alvos no tratamento efetivo da dor neuropática orofacial.

FIGURAS

Figura 1: Fluxograma ilustrando o delineamento experimental do presente estudo.

Figura 2: Fotografias demonstrando a constrição do NIO. Em **(a)** uma representação esquemática da constrição do NIO. De **(b-f)** está evidenciada a sequência cirúrgica de constrição do NIO: assepsia e tricotomia **(b)**, incisão **(c)**, dissecação do NIO **(d)**, instalação de duas amarrias com um espaçamento de dois milímetros entre elas **(e)** e sutura da ferida cirúrgica **(f)**.

Figura 3: Esquema evidenciando o localização do RVM no encéfalo em um corte longitudinal **(a)** e em corte transversal **(b)**. O RVM foi definido como um triângulo isósceles (delimitação em vermelho) que compreende as seguintes estruturas anatômicas: núcleo reticular gigantocelular (GiA), núcleo principal inferior da oliva (IOPr), núcleo magno da rafe (RMg), núcleo pálido da rafe (Rpa) e parte ventral do núcleo obscuro da rafe (Rob). Abreviações: Tz, núcleo do corpo trapezóide; py, trato piramidal; 7L, subnúcleo lateral do núcleo facial. Esquema adaptado de VANEGAS et al., 2004 e PAXINOS E WATSON, 2007.

Figura 4: Gráficos demonstrando a evolução do peso corporal ao longo do período experimental nos grupos CTL1 (traçado cinza), CTL2 (traçado azul) e CNN (traçado vermelho). Houve aumento progressivo do peso corporal em todos os animais em todos os grupos experimentais e não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em cada um dos períodos experimentais.

Figura 5: Fotografias demonstrando o teste comportamental de hiperalgesia térmica ao frio. Em **(a)** está evidenciado o local onde o tetrafluoroetano foi aplicado. De **(b-d)** está evidenciada a sequência comportamental que define a manipulação facial considerada o comportamento de hiperalgesia térmica ao frio.

Figura 6: Gráficos demonstrando o padrão comportamental avaliado pelo tempo de manipulação facial nos grupos CTL1, CTL2 e CCN um dia antes da constrição do NIO e 1, 7 e 14 dias pós-operatórios. Teste estatístico: Análise de variância - ANOVA; Pós teste de Newman-Keuls). Observar que em CCN ocorre um aumento progressivo da manipulação facial após a constrição do NIO, a qual passa a ser estatisticamente significativa ao 7 e 14 dias pós-operatórios. Abreviações: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL1 no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL2 no mesmo período; ¶, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CCN um dia antes da cirurgia de CNIO e 1 dia pós-operatório.

Figura 7: Gráficos demonstrando a densidade óptica de imunomarcção para CD11b na RVM. De **(a - c)** gráficos evidenciando o padrão de imunomarcção aos 1 **(a)**, 7 **(b)**, 14 **(c)** dias pós-operatórios tanto no lado ipsilateral como no lado contralateral de todos os grupos experimentais. De **(d - e)** gráficos evidenciando o padrão de imunomarcção no lado ipsilateral **(d)** e no lado contralateral **(e)** 1 **(a)**, 7 **(b)**, 14 **(c)** dias pós-operatórios de todos os grupos experimentais. Teste estatístico: Análise de variância - ANOVA; Pós-teste de Tukey. Abreviações: †, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL1 no mesmo período; ‡, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL2 no mesmo período.

Figura 8: Padrão de imunomarcção para CD11b, o biomarcador da microglia, no RVM. Fotomicrografias evidenciando a microglia CD-11-IR no RVM. Em **(a)**, fotomicrografia evidenciando o aspecto morfológico da microglia CD-11-IR, onde pode ser observado o pequeno corpo celular e inúmeros prolongamentos citoplasmáticos intensamente ramificados. De **(b - g)** estão sendo apresentadas fotomicrografias que representam o padrão de imunomarcção para CD-11 no RVM nos grupos CTL1 **(b e e)**, CTL2 **(c e f)** e CCN **(d e g)** aos 7 dias pós-operatórios no lado ipsilateral **(b - d)** e no lado contralateral **(e - g)**. Observar a maior densidade óptica de imunomarcção para CD11 no RVM em CCN tanto no lado ipsilateral quanto no lado contralateral em comparação com CTL1 e CTL2. Aumento original: **(a)**, 1000x; **(b-g)**, 200x. Barras de escala: **(a)**, 15 µm; **(b-g)**, 100 µm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BENNETT, M.I.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N.; LEE, A.J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v. 122, p. 289-94, 2006.

BESSON JM. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 610-615, 1999.

BOWSHER, D. **Mechanisms of Pain in Man**. Cheshire, England: ICI Pharmaceuticals Division, 1987.

BRODAL A. Neurological anatomy in relation to clinical medicine, New York: **Oxford University Press**, 3 ed.,1981.

CHAI, B.; GUO, W.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Trigeminal-rostral ventromedial medulla circuitry is involved in orofacial hyperalgesia contralateral to tissue injury. **Mol Pain**, v. 23, n.8, pp. 78, 2012.

DARIAN-SMITH, I.; ISBISTER, J.; MOK, H. Somatic sensory cortical projection areas excited and tactile stimulation of the cat: a triple representation. **J. Physiol.**, v. 182; n. 3, p. 671-689, 1966.

DECOSTERD , I.; WOOLF, C. J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n.2, pp. 149- 158.

DESEURE, K.; ADRIAENSE, H. Nonevoked facial pain in rats following infraorbital nerve injury: a parametric analysis. **J Phys. Behav.**; v. 81, p. 595-604, 2004.

FIELDS, H.L.; BRY, J.; HENTALL, I.; ZORMAN, G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J. Neurosci.**, v. 3, p. 2545-2552, 1983.

FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S. Spinal cord injury: mechanisms and treatment. **Eur. J. Neur.**, v. 11, p.73-82, 2004.

GREGG, J.M.; WALTER, J.M.; RISCOLL, R. Neurosensory studies of trigeminal dysesthesia following trigeminal nerve injury. In: BONICA, J.J.; LIEBESKIND, J.C.; ALBE-FESSARD, D.G. **Advanced pain research therapy**. New York: Raven, 1973. p. 311- 315.

GRISWOLD, J.G.; BORCHELT, P.L.; BRANCHEK, R.S.; BENSKO, J.A. Condition of the pelage regulates sand bathing and grooming behaviour in the kangaroo rat (*Dipodomys merriami*). **Anim. Behav.**, v. 25, p. 602–608, 1977.

GRONSETH, G.; CRUCCU, G.; ALKSNE, J.; ARGOFF, C.; BRAININ, M.; BURCHIEL, K.; NURMIKKO, T.; ZAKRZEWSKA, J.M. Practice parameter: the diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies. **J. Neurosci.**, v. 71, p. 1183– 1190, 2008.

GUO, W.; MIYOSHI, K.; DUBNER, R.; GU, M.; LI, M.; LIU, J.; YANG, J.; ZOU, S.; REN, K.; NOGUCHI, K.; WEI, F. Spinal 5-HT₃ receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glia signaling cascade. **Mol Pain**, v. 9, n. 10, pp. 35, 2014.

GUO, W.; ROBBINS, M.T.; WEI, F.; ZOU, S.; DUBNER, R.; REN, K. Spinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for pain facilitation. **J. Neurosci.**, v. 26, p. 126 –137, 2006.

IDANPAAN-HEIKKILA, J.J.; GUILBAUD, G. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine,

morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. **Pain**, v. 79, p. 281- 290, 1999.

KATUSIC, S.; BEARD, C.M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L.T. Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia. **Ann. Neurol.** Rochester, Minnesota, 1990. p.89-95.

KERR, F.W.L. Peripheral versus central factors in trigeminal neuralgia. In: HASSLER R, WALKER AE. **Trigeminal neuralgia, pathogenesis and pathophysiology.** Stuttgart: Thieme, 1970. p. 180-190.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, p. 355-363, 1992.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, v. 19, p. 312–318,1996.

LIU, X.; BU, H; LIU, C.; GAO, F.; YANG, H.; TIAN, X.; XU, A.; CHEN Z.; CAO F.; TIAN Y. Inhibition of glial activation in rostral ventromedial medulla attenuates mechanical allodynia in a rat model of cancer-induced bone pain. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.**, v. 32, n. 2, p. 291-298. 2012

MCFARLAND, D. The oxford companion to animal behavior. **Oxford University Press**, Oxford, 1987, pp. 237–240.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. Seattle: **IASP Press**, 1994.

MIKI, K.; ZHOU, Q.Q.; GUO, W.; GUAN, Y.; TERAYAMA, R.; DUBNER, R.; REN, K. Changes in the gene expression and neuronal phenotype in brain stem pain modulatory circuitry after inflammation. **J. Neurophys.**, v. 87, p. 750-760, 2002.

NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. **J.Biochem.**, v. 130, p. 169–175, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam, **Academic Press**, 2007.

PERTOVAARA, A.; WEI, H.; KALMARI, J.; RUOTSALAINEN, M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant property. **Exp. Neur.**, v. 167, p. 425-434, 2001.

PIAO, Z.G.; CHO, I.H.; PARK, C.K.; HONG, J.P.; CHOI, S.Y.; LEE, S.J.; LEE, S.; PARK, K.; KIM, J.S. Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. **Pain**, v. 121, p. 219–231, 2006.

PINTO- RIBEIRO, F.; ANSAH, O.B.; ALMEIDA, A.; PERTOVAARA, A. Influence of arthritis on descending modulation of nociception from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Res.**, v. 197, p. 63-75, 2008.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends. Neurosci.**, v. 25, p. 319–325, 2002.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, p. 1-6, 2002.

REN, K.; DUBNER, R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. **Curr. Opin. Anesthesiol.**, v. 21, p.570–579, 2008.

RO, L.S.; JACOBS, J.M. The role of the saphenous nerve in experimental sciatic nerve mononeuropathy produced by loose ligatures: a behavioural study. **Pain**, v. 52, p. 359-369, 1993.

ROBERTS, J.; OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F. Glial activation in the rostroventromedial medulla promotes descending facilitation to mediate inflammatory hypersensitivity. **Eur J Neurosci**, v. 30, n. 2, pp. 229-241, 2009.

SALTER, M.W. Cellular neuroplasticity mechanisms mediating pain persistence. **J Orofac Pain.**, v. 18, p. 318 – 324. 2004.

SCHNELL, C.; ULUCAN, C.; ELLRICH, J. Atypical on-, off- and neutral cells in the rostral ventromedial medulla oblongata in rat. **Exp. Brain Res.**, v. 145, p. 64-75, 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain** v. 43, p. 205-218, 1990.

SESSLE, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, n. 1, p.57-91, 2000.

SESSLE, B.J. Mechanisms of trigeminal and occipital pain. **Pain**, v. 3, p. 91-116, 1996.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog. Neurobiol.**, v. 58, p. 233–247, 1999.

SWEET, W.H. Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb and herpes zoster. **Neurosurgery** v.15, p. 1984.

TZENG, S.F.; KAHN, M.; LIVA, S.; DEVELLIS, J. Tumor necrosis factor-alpha regulation of the Id gene family in astrocytes and microglia during CNS inflammatory injury. **Glia** v. 26, p. 139–152, 1999.

USUNOFF, K.G.; MARANI, E.; SCHOEN, J.H.R. The trigeminal system in man. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, 136:1-126, 1997.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Descending control of pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res. Rev.**, v. 46, p. 295-309, 2004.

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

WANG, L.X.; WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 55, p. 949-956, 2003.

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; JOHNSTON, I.N.; MAIER, S.F. Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. **Trends Neurosci.**; v. 28, p. 661–669, 2005.

WEI, F.; GUO, W.; ZOU, S.; REN, K.; DUBNER, R. Supraspinal glial – neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. **J Neurosci.**, v. 15, n. 42, p. 10482–10495, 2008.

WILLIAMS, P.L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; NANNISTER, L.H. Neurologia. **Gray Anatomia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 809-1174.

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

ZHANG, F.; VADAKKAN K,L., KIN, S,S.; WU, L.J.; SHANG, Y.; ZHUO, M. Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. **Mol Pain**, v. 18, n. 4, pp. 15, 2008.

ZHUANG, Z.Y.; GERNER, P.; WOOLF, C.J.; JI, R.R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, v. 114, p. 149–159, 2008.

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)****CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "**Avaliação das modificações no sistema nervoso central durante a vigência de dor neuropática orofacial em ratos**" sob responsabilidade do Pesquisador **EDILSON ERVOLINO** e colaboração de Claudio Aparecido Casati e Kelly Regina Torres está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 01186-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "**Evaluation of changes in central nervous system during neuropathic orofacial pain in rats**", process number **01186-2012**, under responsibility of **EDILSON ERVOLINO** and with collaboration of Claudio Aparecido Casati and Kelly Regina Torres agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fabiano A. Cadioli".

Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator