

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO DA  
PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) FRENTE  
À ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS EMPREGADAS  
NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia Ambiental e  
Experimental da Universidade Paulista –  
UNIP, para a obtenção do título de Mestre  
em Patologia Ambiental e Experimental.

**LIGIA BOCAMINO VIEBIG**

**SÃO PAULO**

**2017**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO DA  
PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) FRENTE  
À ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS EMPREGADAS  
NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

**LIGIA BOCAMINO VIEBIG**

**SÃO PAULO  
2017**

Viebig, Ligia Bocamino.

Resposta astrocitária de expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) frente à administração de drogas empregadas no tratamento da dor neuropática / Ligia Bocamino Viebig. - 2017.

62 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Astrócitos. 2. Dor. 3. GFAP. I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

**LIGIA BOCAMINO VIEBIG**

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO DA  
PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) FRENTE  
À ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS EMPREGADAS  
NO TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia Ambiental e  
Experimental da Universidade Paulista –  
UNIP, para a obtenção do título de Mestre  
em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Universidade Paulista UNIP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, orientador dedicado que soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos.

Agradeço aos professores da pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP pela sabedoria e ensinamentos durante esse percurso.

Aos meus pais, Ricardo Guilherme Viebig e Sonia Maria Bocamino Viebig, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradeço a meu namorado Pietro Domingues Dossa por toda ajuda e apoio ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho e à toda equipe da UNIP por ajudar a tornar esse sonho possível.

## RESUMO

Uma grande variedade de drogas são utilizadas em situações de dor aguda, crônica e neuropática. Os efeitos pelos quais certos analgésicos agem sobre as células do sistema nervoso central, incluindo astrócitos, não são totalmente compreendidos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi o de observar, após administração de doses de curta duração de fluoxetina, dipirona, carbamazepina, amantidina e quetamina S, a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no córtex frontal, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (PAG). Para isso, ratos Wistar foram divididos em 6 grupos com 6 animais cada: Grupo 1: Solução salina 0,9% - 1ml, via intraperitoneal (IP), Grupo 2: fluoxetina-10 mg/kg (IP), Grupo 3: carbamazepina, 40 mg/kg (IP), Grupo 4: dipirona, 200 mg/kg (IP), Grupo 5: amantadina, 100 mg/kg (IP) e Grupo 6: cloridrato de quetamina S, 100 mg/kg (IP). Após 10 dias, foi realizada a colheita das amostras de encéfalo para estudo imuno-histoquímico para a GFAP. Nossos resultados demonstram que todas as drogas administradas aumentaram a expressão da GFAP no hipotálamo e no córtex frontal em relação ao grupo salina. Na PAG, apenas a amantadina, a fluoxetina e quetamina aumentaram essa expressão. Pode-se concluir que todas as drogas tiveram capacidade de alterar a expressão de GFAP, que variou de acordo com a região observada. Mais estudos devem ser feitos a fim de esclarecer os efeitos desses analgésicos em astrócitos, tanto na ausência como na presença de estímulos nocivos.

Palavras chave: Astrócitos. Dor. GFAP.

## **ABSTRACT**

A wide variety of drugs are used in situations of acute, chronic and neuropathic pain. The effects by which certain analgesics act on central nervous system cells, including astrocytes, are not fully understood. Thus, the objective of the present study was to observe the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the frontal cortex, hypothalamus and periaqueductal gray (PAG) after administration of short doses of fluoxetine, dipyrrone, carbamazepine, amantidine and ketamine S. For this, Wistar rats were divided into 6 groups with 6 animals each: Group 1: Saline solution 0.9% - 1 ml, intraperitoneal (IP), Group 2: fluoxetine 10 mg / kg (PI), Group 3: carbamazepine 100 mg / kg (IP) and Group 6: ketamine hydrochloride S, 100 mg / kg (IP), Group 4: dipyrrone, 200 mg / kg (IP). After 10 days, brain samples were collected for immunohistochemical study for GFAP. Our results demonstrate that all drugs administered increased GFAP expression in the hypothalamus and frontal cortex in relation to saline group. At PAG, only amantadine, fluoxetine and ketamine increased this expression. We can conclude that all drugs were able to alter the expression of GFAP, which varied according to the region observed. Further studies should be done to clarify the effects of these analgesics on astrocytes, both in the absence and presence of noxious stimuli.

**Keywords:** Astrocytes. Pain. GFAP.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
2.1 Dor neuropática.....	8
2.2 Astrócitos e dor .....	10
2.3 Fármacos .....	14
2.3.1 Dipirona .....	14
2.3.2 Fluoxetina.....	15
2.3.3 Carbamazepina .....	17
2.3.4 Amantadina .....	18
2.3.5 Quetamina.....	20
2.4 Vias centrais do processamento da dor .....	21
2.4.1 Córtex frontal.....	22
2.4.2 Hipotálamo .....	24
2.4.3 PAG.....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Animais .....	27
3.1.1 Descrição dos grupos, fármacos e doses utilizadas.....	27
3.1.2 Perfusão intracardíaca de solução fixadora .....	27
3.1.3 Estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP.....	28
3.1.4 Quantificação da reatividade astrocitária de GFAP .....	29
3.1.5 Análise estatística.....	30
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de drogas como antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésicos locais e analgésicos opioides, dentre outras, são frequentemente utilizadas em situações de dor aguda, crônica e neuropática. Embora a dor seja tradicionalmente considerada como mediada por neurônios, evidências demonstram um papel importante para as células gliais na sensibilização da dor persistente (LYNCH; WATSON, 2006).

Existem evidências de que citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), estão envolvidas no processo da dor patológica (WATKINS et al., 2003) e muitos analgésicos são conhecidos por diminuir a produção de citocinas (DE WAAL et al., 1998; KENIS; MAES, 2002; HUTCHINSON; SOMOGYI, 2004; VALLEJO et al., 2004; SACERDOTE, 2006; BAO et al., 2014). Citocinas hematógenas como IL-1, IL-6 e TNF-alfa têm exibido a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica apesar de seu elevado peso molecular (BANKS et al., 1995), permitindo a existência de uma comunicação entre os sistemas neuroendócrino e imune.

A modulação da dor existe na forma de um circuito modulatório descendente, cujas entradas surgem de vários sítios, incluindo hipotálamo, amígdala e córtex cingulado rostral anterior, alimentando a substância cinzenta periaquedutal (PAG), e contando com saídas da PAG para o bulbo (OSSIPOV et al., 2010).

Muito embora células microgliais tenham sido amplamente implicadas no desenvolvimento da dor, pouco é conhecido acerca do papel dos astrócitos nessa regulação. Os mecanismos pelos quais certos analgésicos agem permanecem desconhecidos, bem como os efeitos de tais drogas sobre as células do sistema nervoso central (SNC), especialmente astrócitos.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo será o de observar, após administração de doses de curta duração de fluoxetina, dipirona, carbamazepina, amantadina ou quetamina S a resposta astrocitária no córtex frontal, hipotálamo e PAG por meio da expressão do marcador astrocitário GFAP (protéina glial fibrilar ácida).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dor neuropática

A dor, a despeito de sua valência geralmente aversiva, é benéfica para a sobrevivência, funcionando como um sistema de alarme embutido, alertando sobre uma lesão tecidual direta ou iminente, com o propósito de motivar decisões, conduzindo à ação e à mudança de comportamento (EIPPERT; TRACEY, 2014)

A dor é definida como uma experiência emocional desagradável relacionada a um dano tecidual real ou potencial (MERSKEY; BOGDUK, 1994) sendo dividida nos tipos “nociceptiva” e “neuropática”. A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares (BENNETT et al., 2006). Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico) (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Mais recentemente, em função da possível concomitância de ambos tipos de dor e das dificuldades diagnósticas, alguns autores recomendaram o uso do termo “dor predominantemente neuropática” ou “dor predominantemente nociceptiva”, dependendo do padrão clínico de apresentação (BENNETT et al., 2006).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. De forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascendendo pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projetando-se para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004).

A dor neuropática pode ter como etiologia traumas em tecido nervoso, doenças inflamatórias, infecciosas, metabólicas, autoimunes, degenerativas, neoplásicas, uso de medicamentos quimioterápicos, iatrogenias, entre outras (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Fatores de risco para o estabelecimento da dor neuropática são idade, gênero e polimorfismos genéticos (BENNETT et al., 2006; GARCIA et. al., 2016).

Dor e nocicepção podem ser processos não necessariamente dependentes, uma podendo ocorrer sem a outra. Nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores resulta necessariamente em uma experiência dolorosa. O estado emocional do indivíduo, as expectativas em relação à dor e seu tratamento e o contexto no qual ocorre a experiência dolorosa explicam porque indivíduos percebem a dor diferencialmente mesmo na presença de estímulos nociceptivos similares. Essa variabilidade reforça a existência de mecanismos endógenos que modulam a experiência de dor (FAIRHURST et al., 2012; DE FELICE; OSSIPOV, 2016). Estudos também mostram que uma experiência dolorosa pode ocorrer sem um estímulo nociceptivo primário (DERBYSHIRE; OSBORN, 2004; SINGER et al., 2004; RAIJ et al., 2005), por exemplo, a observação de outro indivíduo sentindo dor pode ativar regiões cerebrais relacionadas à dor física (LAMM et al., 2011). Porém, apesar de a nocicepção não ser necessária nem suficiente para a dor, ela é requerida para respostas autonômicas que são essenciais para a sobrevivência (LEE; TRACEY, 2013)

Os nociceptores transmitem o estímulo nocivo para a medula espinhal através das fibras sensoriais aferentes, que são de dois tipos – A delta (A $\delta$ ) e C. Fibras do tipo A $\delta$  são mielinizadas, com maior velocidade de condução e contribuem para a percepção da dor de forma rápida, conduzindo estímulos térmicos e mecânicos. Por sua vez, as fibras C, não mielinizadas e com menor velocidade de condução, relacionam-se principalmente à dor de caráter dolente, provocando sensação de queimação (BASBAUM; JESSELL, 2000).

Após lesão de nervo, alguns pacientes desenvolvem alteração na distribuição e conformação de canais iônicos (especialmente canais de sódio), que promovem aumento da excitabilidade axonal das fibras finas nociceptivas. Tal excitabilidade é, muitas vezes, gerada longe do foco da lesão inicial (chamada de descargas ectópicas), mas capaz de acarretar o surgimento de sintomas de características neuropáticas (BOSTOCK, 2005).

O complexo sistema de vias diretas e indiretas de transmissão das informações nociceptivas inervam o tálamo, o mesencéfalo, o sistema límbico e a formação reticular. Estes centros nervosos são responsáveis pela localização da dor, sua intensidade, bem como pelos aspectos afetivos e cognitivos relacionados (PISERA, 2005). A região anatômica mais importante para o sistema de analgesia endógeno é a substância cinzenta periaquedutal (PAG) do mesencéfalo,

considerada por alguns como sendo uma extensão caudal do sistema límbico dentro do mesencéfalo (LAMONT; TRANQUILLI, 2000).

## 2.2 Astrócitos e dor

Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC (incluindo manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, alterados com a descarga de potenciais de ação dos neurônios; captação e liberação de diversos neurotransmissores, tendo um papel crítico no metabolismo dos neurotransmissores, glutamato e GABA; participação na formação da barreira hematoencefálica; secreção de fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios, direcionamento de axônios e formação e funcionamento das sinapses (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005; STIPURSKY et al., 2011). Também estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e do acoplamento neurovascular, bem como no auxílio na defesa imune, por meio da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias (IL-1, IL-3, IL-6, IFN- $\delta$  e TNF- $\alpha$ ) e expressão de moléculas de MHC (complexo principal de imunohistocompatibilidade) de classe I e II. Além disso, essas células têm grande impacto no controle energético do tecido nervoso, em razão do fornecimento de energia e metabólitos (ROUACH et al., 2008).

Apesar de sua pronunciada heterogeneidade morfológica e bioquímica, os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos dotados de filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP -*glial fibrillary acidic protein*), servindo como meio de identificação deste tipo celular em estudos *in situ* e em cultivo (MONTGOMERY, 1994). Entre as características gerais dos astrócitos maduros destacam-se também a presença da proteína ligadora de cálcio, S-100 beta e da enzima conversora de glutamato em glutamina, glutamina sintetase. Mais recentemente, um novo marcador antigênico para a célula astrocitária foi identificado, a enzima metabólica aldeído desidrogenase 1 (Aldh1L1) (CAHOY et al., 2008).

Independentemente da causa da lesão no SNC, o reparo do tecido é sempre realizado em maior ou menor grau com participação astrocitária. A reação dos astrócitos inclui o aumento de seu número (astrocitose) e de suas dimensões (astrogliose), além de várias outras alterações funcionais, como espessamento dos

feixes de filamentos gliais e consequente aumento da intensidade de marcação de GFAP (EDDLESTON; MUCKE, 1993; MONTGOMERY, 1994). Estes fenômenos têm sido referidos como gliose astrocitária, astrocitose e astrogliose reativa, cicatriz glial ou simplesmente gliose, podendo ser de dois tipos de acordo com o tipo de dano provocado – isomórfica, na qual os processos astrocitários apresentam-se orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e paralelo, e anisomórfica, onde sua disposição é irregular ao redor da lesão geralmente causadora de dano morfológico grosseiro na estrutura do tecido, com ruptura da barreira hematoencefálica (BIGNAMI; DAHL, 1984; FERNAUD-ESPINOSA et al., 1993).

Dentre as alterações astrocitárias com efeito benéfico, podemos observar essa formação de cicatrizes gliais, constituída principalmente por astrócitos reativos, resultando na reorganização da arquitetura do tecido para isolamento físico da área da injúria (DONG; BENVENISTE, 2001; SEIFERT et al., 2006; DE KEYSER et al., 2008), como a que ocorre no isolamento de placas amiloides e internalização de peptídeos A $\beta$  observados na doença de Alzheimer (DONG; BENVENISTE, 2001); a reconstrução da barreira hematoencefálica (ATTWELL et al., 2010); além da liberação de vários fatores neuroprotetores como citocinas anti-inflamatórias, neurotrofinas e fatores de crescimento (MOISSE; STRONG, 2006).

A proteína glial fibrilar ácida é a principal proteína de filamento intermediário entre astrócitos maduros e a regulação de sua expressão é uma das principais características da ativação de astrócitos observados após a lesão do SNC (MIDDELDORP; HOL, 2011). Moduladores da expressão de GFAP incluem vários hormônios como T3 e T4, glicocorticoides e vários fatores de crescimento, como fator de crescimento do fibroblasto (FGF), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), dentre muitos outros (GOMES et al., 1999). A exata função da GFAP permanece desconhecida, a despeito do enorme número de estudos usando esse biomarcador astrocitário. Ele provavelmente auxilia os astrócitos a manterem uma força mecânica, bem como sua forma (MIDDELDORP; HOLL, 2011).

O envolvimento microglial em vários estados de dor está bem documentado, porém novas evidências sugerem que os astrócitos aparentemente desempenham um papel mais dominante do que a micróglia nessas situações (CHIANG et al., 2012).

A modulação ascendente, responsável pela amplificação da informação dolorosa se dá pela ação de mediadores liberados por neurônios de primeira ordem, pelas fibras A-delta como aminoácidos, o glutamato e o aspartato e pelas fibras C, como neuropeptídeos, como a substância P e as neurocininas (LARSSON; BROMAN, 2011). Estas substâncias atuam em receptores específicos como o AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-propiónico) e, posteriormente, com receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (WOOLF, 2004). A estimulação do receptor NMDA, chave para a maior duração do aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, produz sensibilização central devido à redução do limiar excitatório da dor, manifestando-se com uma resposta exagerada ou amplificada a estímulos nocivos (WOOLF et al., 1995; WOOLF, 2011).

Ocorrendo lesão do nervo periférico, a micróglia, os oligodendrócitos e os astrócitos localizados no corno dorsal são ativados e liberam mediadores pró-inflamatórios, que modulam o processamento da dor, afetando a liberação pré-sináptica de neurotransmissores e/ou a excitabilidade pós-sináptica (VALLEJO, 2010).

Nos estados de dor exagerados refletidos na hiperalgesia e alodinia, os astrócitos reativos podem liberar gliotransmissores tais como glutamato (CHOI et al., 2011), ATP (SAWYNOK, 2006; BURNSTOCK et al., 2011), D-serina ou fatores neurotróficos (PEZET; MCMAHON, 2006; ZHANG et al., 2011), citocinas e quimiocinas (GAO; JI, 2010). Notavelmente, o glutamato é um potente neurotransmissor excitatório e através do seu produto metabólico, a adenosina, inibe indiretamente a função de células locais, isto é, neurônios e células gliais (FELLIN et al., 2009; HALASSA et al., 2010).

Em um modelo de dor neuropática envolvendo a transecção do nervo espinhal lombar em ratos adultos, a expressão da proteína S100b na medula espinhal aumentou de forma constante do dia 4 ao 28, implicando o envolvimento tardio dos astrócitos (TANGA et al., 2006). Em outro estudo com o mesmo modelo de dor, a GFAP aumentou a partir do dia 4 a 7, sugerindo, assim, que os astrócitos desempenham um papel na manutenção de dor crônica enquanto que a ativação da micróglia correlaciona-se estreitamente com a fase inicial da dor neuropática (ROMERO-SANDOVAL et al., 2008).

Esses achados sugerem que a ativação direta dos astrócitos e micróglia ocorrem em uma determinada fase do processo de dor patológica. Assim, os

astrócitos podem desempenhar um papel no início da dor inflamatória aguda (QIN et al., 2006; XIE et al., 2007) e na manutenção de doenças inflamatórias crônicas e da dor neuropática (LEE et al., 2011; TSUBOI et al., 2011), enquanto a micróglia está envolvida no início ou em todas as fases de dor patológica (MILLIGAN et al., 2000; LEE et al., 2011).

Colburn et al. (1997) foram os primeiros a tentar separar os papéis relativos de micróglia e astrócitos nestes fenômenos. Usando dois modelos de dor neuropática, eles avaliaram mudanças na ativação microglial e de astrócitos na morfologia celular e na intensidade da coloração com o marcador microglial OX-42 e do marcador de ativação de astrócitos GFAP. Mudanças na morfologia microglial ocorreram desde o estado de repouso até um estado ativado, com maior intensidade da expressão de OX-42. Em contraste, o grau de ativação dos astrócitos correlacionou-se com o desenvolvimento e com a manutenção da dor. Esse padrão de ativação microglial e astrocitária e sua correlação com o comportamento foi replicada em modelos animais (HASHIZUME et al., 2000; WINKELSTEIN; DELEO, 2002). Um estudo comparando o número total de astrócitos ativos e a micróglia nos cornos dorsais da medula espinhal mostrou que, uma semana após a lesão no nervo ciático, houve um aumento significativo da micróglia, enquanto que o número de astrócitos aumentou ligeiramente (MIKA et al., 2009b). Esses dados levaram à proposta de que a ativação microglial precoce induz a ativação de astrócitos e que essa ativação mantém os estados de dor (WINKELSTEIN E DELEO, 2002; RAGHAVENDRA et al., 2003).

Garrison et al. (1991) foram os primeiros a observar o aumento da ativação de astrócitos no lado danificado da medula espinhal em ratos após lesão do nervo ciático. Essas células foram capazes de mudar seu fenótipo de repouso para o fenótipo ativo, levando à liberação sistêmica de citocinas (por exemplo TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Uma vez ativados, os astrócitos liberaram um alto número de fatores, como óxido nítrico (NO) (LIU et al., 2000), prostaglandinas, (GHILARDI et al., 2004), aminoácidos excitatórios (DUAN et al., 2003), citocinas (MILLIGAN et al., 2001) e ATP (QUEIROZ et al., 1997). O aumento da expressão dos marcadores GFAP e S100 $\beta$  foi observado em muitos modelos de dor neuropática, como constrição crônica do nervo, (STUESSE et al., 2001), ligadura parcial do nervo isquiático (COYLE, 1998) ou ligadura do nervo tibial (VEGA-AVELAIRA et al., 2007). Em um

estudo utilizando um modelo de dor tumoral em ratos, Zhang et al. (2005) também demonstraram aumento da ativação de astrócitos e aumento da expressão de IL-1 $\beta$ .

A ativação glial aumenta a liberação de neurotransmissores nociceptivos e a excitabilidade dos neurônios de segunda ordem, levando a informação da medula até o tálamo, e causando dor generalizada. Nesse sentido, o conhecimento do papel das células gliais pode levar ao estabelecimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento da dor neuropática (INOUC; TSUDA, 2009; ZHUO et al., 2011). No entanto, é importante perceber que a resposta imune e glial ao dano neuronal também é necessária para o reparo nervoso eficaz (LACROIX, 2011; ZHUO et al., 2011).

## **2.3 Fármacos**

### **2.3.1 Dipirona**

A dipirona sódica ou metamizol sódico é um analgésico amplamente utilizado no tratamento da dor de diferentes etiologias. Além de analgesia, também apresenta propriedades antipiréticas e espasmolíticas (JASIECKA et al., 2014). Seus efeitos se devem à inibição da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, pela inibição reversível da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) e ativação dos sistemas opioidérgico e canabinoide (REZENDE et al., 2008). A dipirona pode bloquear ambas as vias de indução da hipertermia, dependentes e independentes de prostaglandinas, sugerindo que este fármaco tenha um perfil de ação antipirética diferente dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Entre seus efeitos colaterais, o mais grave e controverso é o efeito mielotóxico, podendo ainda causar hipotensão, reação de hipersensibilidade e reações hematológicas (JASIECKA et al., 2014).

Inicialmente, a analgesia provocada pelo tratamento com a dipirona foi atribuída à sua ação inibitória na síntese de prostaglandinas, o que fez com que surgissem comparações dos seus efeitos com aqueles obtidos após tratamento com AINEs, que bloqueiam a atividade das ciclooxigenases por meio da competição com o ácido araquidônico pelo sítio ativo da enzima (EROL et al., 2012). De fato, vários estudos já demonstraram que a dipirona é capaz de reduzir a atividade enzimática da COX-1 e da COX-2 em plaquetas (ABBATE et al., 1989; CAMPOS et al., 1999) e



causar analgesia em modelos nociceptivos nos quais há comprovada liberação de PGE2 (importante mediador da inflamação, da dor e da hipertermia), como na administração de carragenina na pata de ratos (REZENDE et al., 2008). Entretanto, a maioria dos AINEs apresenta uma tríade de efeitos (analgésico, antipirético e anti-inflamatório), enquanto que a analgesia provocada pela dipirona está associada com uma ação anti-inflamatória muito fraca (TATSUO et al., 1994).

Outros estudos sugerem, ainda, que a dipirona provoca antinocicepção por meio da ativação de vias opioides localizadas na substância cinzenta periaquedutal (PAG), no núcleo magno da rafe (NRM) e na medula espinhal. Resultados apontam que microinjeções do fármaco na PAG reduzem a resposta de neurônios de espectro dinâmico amplo a estímulos nocivos aplicados nos seus campos receptivos (VANEGAS et al., 1997). Os efeitos analgésicos de dipirona microinjetada na PAG são abolidos por naloxona (antagonista competitivo opioide não-seletivo) administrada na PAG, RVM (porção rostral da medula oblonga ventromedial) e medula espinhal, indicando que o efeito antinociceptivo da dipirona é mediado por opióides presentes nessas estruturas (VAZQUEZ et al., 2005). Já foi demonstrado, também, que a dipirona é capaz de potencializar a ação de opioides. A administração concomitante de doses sub-efetivas de morfina e dipirona produz efeito analgésico maior do que aqueles observados quando os fármacos são administrados sozinhos em doses analgésicas (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2008).

Também já foi observada uma interação entre a dipirona e a atividade nociceptiva do glutamato no sistema nervoso central, na qual a primeira inibiu de forma significativa a hiperalgesia induzida pela administração intratecal do segundo em camundongos (BEIRITH et al., 1998; SIEBEL et al., 2004). Adicionalmente, há evidências que indicam que a administração crônica de dipirona aumenta de forma significativa os níveis de células positivas para serotonina no córtex cerebral e no mesencéfalo de ratos (GENÇ et al., 2009), embora o efeito analgésico central da dipirona não tenha sido influenciado por antagonistas de receptores de serotonina (GODOY et al., 2004).

### **2.3.2 Fluoxetina**

A fluoxetina é um fármaco da classe dos antidepressivos altamente seletivos para inibição da recaptação de serotonina (5-HT ou 5-hidroxitriptamina). Com

toxicidade mínima, constituiu uma nova classe de antidepressivos denominados inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (HIEMKE; HÄRTTER, 2000). Os ISRS estão envolvidos no aumento da neurotransmissão serotoninérgica em algumas áreas do cérebro, por meio do aumento da liberação de 5-HT, como resultado da dessensibilização dos autoreceptores 5-HT somatodendríticos e terminais, os quais, normalmente, exercem efeito negativo sobre os neurônios serotoninérgicos (ROMEIRO et al., 2003). Possui metabólito farmacologicamente ativo com meia vida plasmática prolongada e maior latência para o início da ação antidepressiva (MORENO et al., 1999).

A fluoxetina pode reduzir a perda axonal progressiva na esclerose múltipla, por meio da ativação da PKA (proteína quinase A), já que estimula a glicogenólise astrocítica, necessária para a manutenção da remoção de glutamato dependente de sódio por astrócitos, e a liberação de lactato, que serve como fonte de energia para axônios (KONG et al., 2002; ALLAMAN et al., 2011). A fluoxetina também estimula a liberação de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) de astrócitos (ALLAMAN et al., 2011) e pode melhorar o fluxo sanguíneo cerebral, dilatando arteríolas cerebrais independentes do endotélio (UNGVARI et al., 2000).

Existem alguns estudos relatando que, ao lado da fluoxetina, outras drogas também podem modular a plasticidade estrutural dos astrócitos. Após medicação crônica de lítio e de fluoxetina, houve aumento no número de células gliais no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos e primatas não humanos (ROCHA et al., 1998; SELEMON et al., 1999). Em contraste com isso, a fluoxetina não teve efeito sobre o número de astrócitos no hipocampo em animais controle, podendo contrariar a diminuição do número de astrócitos induzida pelo estresse. O tratamento crônico com o lítio aumenta a expressão de GFAP e modifica a morfologia (orientação) de astrócitos (ROCHA; RODNIGHT, 1994; ROCHA et al., 1998). Os dados de um estudo demonstram que a fluoxetina pode modificar significativamente a plasticidade estrutural dos astrócitos e é muito provável que essas alterações morfológicas reflitam ou induzam mudanças funcionais dentro da interação glial-neuronal (HERTZ et al., 2015).

Ensaios relataram um efeito positivo da fluoxetina sobre a dor em diversas situações, como na fibromialgia (ARNOLD et al., 2002), dor de cabeça com tensão crônica (WALKER et al., 1998), enxaqueca (COLUCCI et al., 1999), neuropatia diabética dolorosa (MAX et al., 1992), dor musculoesquelética (SCHREIBER et al.,

2001) e síndrome da dor pélvica crônica (XIA et al., 2011), porém ainda é controverso se os inibidores da recaptação de serotonina aliviam a neuropatologia da dor. Em um estudo verificou-se também diminuição da percepção da dor em ratos com neuropatia diabética dolorosa tratados com fluoxetina, concluindo-se que o tratamento crônico com fluoxetina mostrou efeito neuroprotetor no desenvolvimento de neuropatia diabética dolorosa (TEMBHURNE; SAKARKAR, 2011).

Murad e Ayuob (2015) demonstraram que a co-administração de pioglitazona ou metformina com baixas doses de fluoxetina melhorou a alodinia mecânica, a hiperalgesia térmica e também diminuiu a expressão de GFAP em ratos submetidos à constrição crônica do nervo. Estudos sugerem que a antinocicepção induzida por fluoxetina envolve principalmente a modulação da via da serotonina através dos receptores 5-HT (1) e 5-HT (2) (ANJANEYULU; CHOPRA, 2004).

### **2.3.3 Carbamazepina**

A carbamazepina é um bloqueador neuronal dos canais de sódio voltagem-dependentes, que atua estabilizando a hiperexcitação das membranas das células nervosas. Age inibindo as descargas neuronais repetitivas e reduzindo a propagação dos impulsos excitatórios sinápticos dos neurônios despolarizados via bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes (MARQUEZ, 2003).

Na dor neuropática, a carbamazepina é utilizada para a dor paroxística da neuralgia do trigêmeo e demonstrou resultados positivos na neuropatia diabética dolorosa (ATEL et al., 2014; AZAZIAN, et al., 2014). Os mecanismos precisos de ação das drogas anticonvulsivantes em relação ao alívio da dor neuropática permanecem incertos, mas sabe-se que elas reduzem a capacidade do neurônio de disparar em alta frequência (CHONG; SMITH, 2000). Acredita-se que seu efeito na dor neuropática tem relação com a inibição do ácido gama-aminobutírico (valproato, clonazepam) ou com um efeito estabilizador nas membranas celulares neuronais. Uma terceira possibilidade é a ação por meio de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Considera-se que a carbamazepina funciona ao bloquear os canais de sódio sensíveis à tensão, o que significa que poucos desses canais estão disponíveis para abrir, tornando as células nervosas menos excitáveis (menos propensas a disparar) (WOOLF, 2004).

Semelhante aos anestésicos locais, a carbamazepina reduz a atividade espontânea em neuromas experimentais. Resultados positivos têm sido documentados na neuralgia trigeminal e na neuropatia diabética, que poderiam ser devidos a efeitos específicos na excitabilidade elétrica de axônios aferentes. No entanto, seus resultados foram negativos para a neuralgia pós-herpética e para a dor central. A carbamazepina tem sido relatada como eficaz em uma variedade de dores neuropáticas, mas os estudos disponíveis são de pequena casuística e/ou não controlados. Os efeitos adversos mais comuns da carbamazepina são a sedação excessiva e a ataxia. Existe a necessidade de monitorização regular da função hematológica e hepática. Interações medicamentosas são comuns, existindo uma ocorrência rara, porém séria, de anemia aplásica irreversível com seu uso (ROWBOTHAM, 2005).

Seu mecanismo exato de ação anticonvulsivante ainda não foi completamente esclarecido. Estudos sugerem que pode deprimir a atividade do núcleo ventral anterior do tálamo, entretanto o significado deste efeito ainda não está completamente demonstrado. Como antineurálgico pode atuar no SNC diminuindo a transmissão sináptica ou a adição da estimulação temporal que origina descargas neuronais (ARAÚJO et al., 2010).

A carbamazepina pode também exercer efeito potencializador da ação neuronal GABAérgica, por meio da inibição da geração dos potenciais de ação. O GABA, por sua vez, inibe diversos outros sistemas de neurotransmissão, funcionando como um depressor geral do SNC. Enquanto que a redução da liberação de glutamato e a estabilização das membranas neuronais podem contribuir principalmente para os efeitos antiepilépticos, sugere-se que a carbamazepina atue também em nível pré-sináptico, diminuindo a neurotransmissão sináptica, efeito provavelmente responsável pela sua ação anticonvulsivante (ARAÚJO et al., 2010).

#### **2.3.4 Amantadina**

A amantadina ou amantidina é uma amina tricíclica sintética hidrossolúvel, utilizada inicialmente como droga antiviral e, posteriormente, por sua ação antiparkinsoniana. Seu mecanismo de ação ainda é objeto de estudo contínuo. Em concentrações terapêuticas, a amantadina parece causar a liberação maciça de catecolaminas provenientes dos depósitos intraneuronais em um mecanismo de tipo

anfetamínico. Também tem sido demonstrado que tem atividade em receptores glutamatérgicos, ionotrópicos NMDA e metabotrópicos, que podem contribuir para seu efeito antiparkinsoniano e para o bloqueio serotoninérgico. Além disso, possui seletividade preferencial pelos neurônios catecolaminérgicos corticocentrais (LUCENA; GAMA, 2012).

A amantadina parece ser o primeiro bloqueador do canal de receptor NMDA com forte tendência cinética a estabilizar o canal em estado fechado. Desta forma, a amantadina funciona de forma muito semelhante ao efeito fisiológico do  $Mg^{++}$ , justificando a sua boa aceitação clínica. Além disso, apresenta perfil terapêutico distinto de outros bloqueadores NMDA que tendem a piorar ou induzir quadros psicóticos esquizofreniformes. (LUCENA; GAMA, 2012).

Evidências sobre a amantadina corroboram que a mesma possui atividade homeostática em neurônios com hipóxia aguda e crônica (HUBER et al., 1999), contribui para aumento de neurotrofinas cerebrais principalmente BDNF e GDNF (*glial derived neurotrophic factor*) (MORVANOVÁ et al., 2001) e estabiliza a membrana neuronal, diminuindo o estresse oxidativo que ocorre ativamente em pacientes esquizofrênicos durante a progressão da doença por meio da ativação das células da glia (GAMA et al., 2006; GAMA et al., 2008); consequentemente diminuindo a morte neuronal por apoptose.

A amantadina é igualmente capaz de aumentar o tônus monoaminérgico por meio do acréscimo de dopamina, noradrenalina e serotonina (FISHER et al., 2000; PAGE et al., 2000) em áreas cerebrais chaves (trato córtico-hipocampal, trato órbito-frontal e córtex pré-frontal) para os pacientes esquizofrênicos, além de modular diretamente a transmissão do glutamato através de seu agonismo parcial dos receptores de NMDA e servir como um agente anti-inflamatório, equilibrando a produção de interleucinas e prostaglandinas (WIERONSKA et al., 2002).

Estudos demonstraram efeitos positivos da amantadina na dor neuropática. Em um estudo com cães que apresentavam dor osteoartrítica, a atividade física foi melhorada pela adição de amantadina, concluindo que esta pode ser uma terapia complementar útil para o tratamento clínico da dor osteoartrítica canina (LASCELLES et al., 2008).

A amantadina mostrou resultados mistos em ensaios clínicos. Um estudo duplo-cego, randomizado e controlado com placebo foi conduzido em 15 pacientes com câncer que apresentavam dor neuropática cirúrgica. Houve uma redução de dor

em 85% dos pacientes tratados com amantadina versus 45% com placebo (PUD et al., 1998). Em contraste com esses resultados positivos, um estudo demonstrou que a maioria dos pacientes não demonstraram redução da dor (FUKUI et al., 2001).

### **2.3.5 Quetamina**

A quetamina-S é um fármaco usado para indução e manutenção da anestesia geral e, em doses sub-anestésicas, exibe efeitos analgésicos. Durante a dor neuropática há ativação dos receptores NMDA e, para que os canais sejam abertos, ocorre liberação de glutamato (neurotransmissor excitatório) e ligação simultânea da glicina. O magnésio bloqueia os canais NMDA, porém, quando esses são ativados, ele é deslocado, possibilitando a entrada de sinalizadores nociceptivos (PETRENKO et al., 2003; ZGAIA et al., 2015). A quetamina-S atua como antagonista do receptor NMDA, reduzindo a estimulação do SNC. Por sistema chave-fechadura, a droga se liga ao receptor da fenciclidina no canal NMDA e impede o influxo de glutamato por ação não-competitiva. A quetamina-S também atua em outros receptores, como os opioidérgicos e muscarínicos (WOLFF; WINSTOCK, 2006).

Estudos animais indicam que receptores glutamatérgicos do tipo NMDA presentes no corno dorsal da medula espinhal têm um importante papel no mecanismo de sensibilização central. Antagonistas do receptor NMDA freiam a hiperatividade de neurônios do corno dorsal posterior à ativação prolongada de neurônios aferentes primários e inibem o comportamento nociceptivo induzido por lesões nos tecidos periféricos ou nervos (DICKENSON, 1997). A quetamina é um potente antagonista não competitivo do receptor. O termo não-competitivo significa que essa droga não compete pelo mesmo sítio de ligação que o glutamato (BRESSAN; PILOWSKV, 2003).

Estudos clínicos randomizados mostraram que a quetamina inibe a dor aguda causada por vários estímulos nocivos, incluindo isquemia, estímulos químicos, elétricos e calor, além de ser preferencialmente utilizada em procedimentos cirúrgicos associados à dor intensa e/ou à elevada ansiedade (MARCO et al., 2000). Evidências clínicas sugerem que a quetamina inibe a sensibilização central (CAMU; VANLERSBERGH, 2002). Além disso, estudos controlados também demonstraram que tal droga inibe de forma significativa a dor espontânea de pacientes com

diferentes tipos de dor crônica, incluindo dor neuropática central e periférica, fibromialgia e dor isquêmica crônica (BELL, 2009).

Durante a última década, doses sub-anestésicas de quetamina têm sido usadas como alternativa para tratar a dor neuropática (HIROTA; LAMBERT, 1996). Contudo, muitas vezes a dose eficaz analgésica da quetamina induz efeitos adversos graves, como sensações flutuantes, alucinações, delírio e sonolência (BELL, 2009).

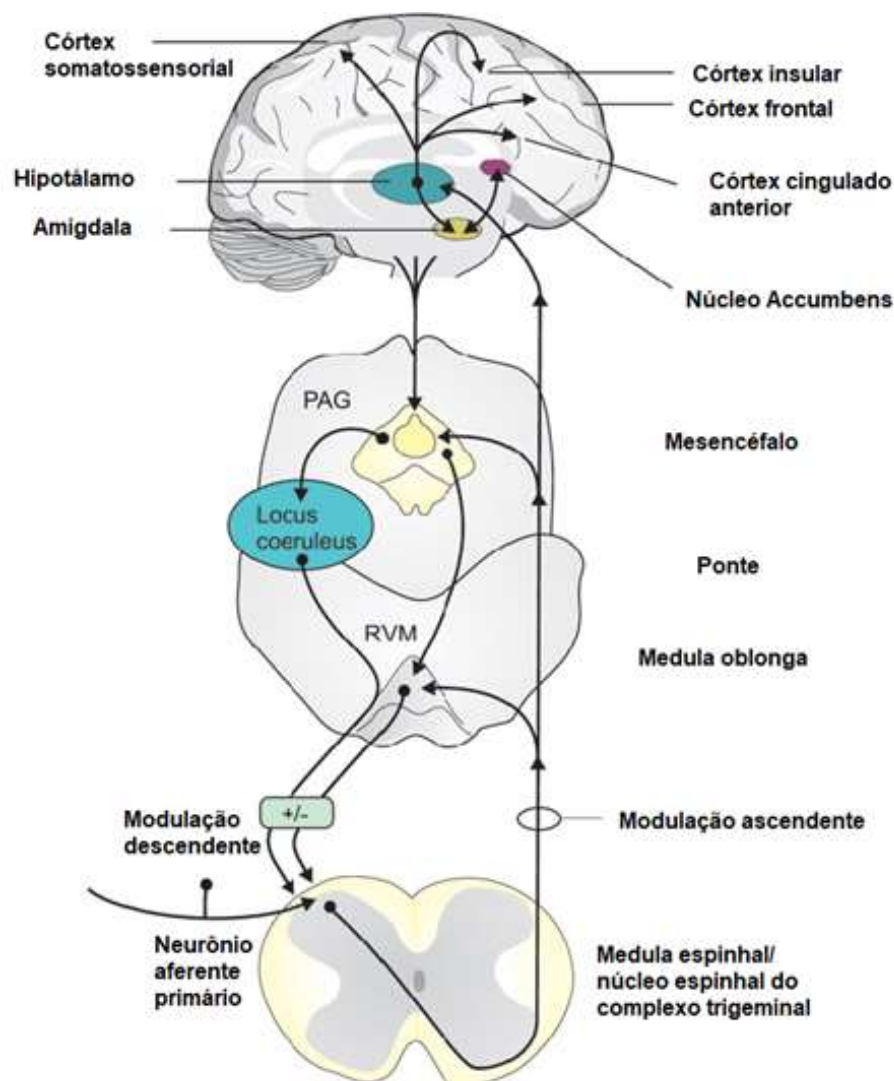
Além disso, a quetamina inibe a liberação exocitótica de vesículas astrocíticas (STENOVEC et al., 2015), indicando mecanismos de ação não neuronais adicionais. Um estudo investigou a influência da quetamina em interações de vesículas únicas com a membrana plasmática em cultura celular de astrócitos de ratos e concluiu que o efeito da quetamina no poro de fusão das vesículas pode desempenhar um papel na liberação astrogliar e na absorção de moléculas, modulando a atividade sináptica. A quetamina também age em astrócitos, inibindo a liberação de BDNF (LASIC et al., 2016).

## **2.4 Vias centrais do processamento da dor**

O córtex frontal desempenha um papel importante na representação e modulação da dor (LONER; SCHNITZLER, 2004) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) participa na via de dessensibilização da dor (DE FELICE, OSSIPOV, 2016). O hipotálamo, por sua vez, além de participar das vias de processamento da dor, apresenta barreira hematoencefálica incompleta, o que possibilita maior entrada de drogas no SNC (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). As vias centrais e regiões do SNC envolvidas na modulação e processamento da dor estão ilustradas na Figura 1.

**Fig 1. Vias e regiões do SNC envolvidas na transmissão e na modulação de sinais dolorosos.**

Os neurônios aferentes primários acoplam-se a neurônios secundários no corno dorsal da medula espinhal ou no núcleo espinhal do complexo trigeminal. Os axônios dos neurônios de segunda ordem atravessam a linha média e se projetam para o tálamo e outros alvos na medula oblonga, ponte e regiões centrais, incluindo a medula ventral rostral (RVM) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG). Os neurônios de terceira ordem, com seus corpos celulares no tálamo, projetam-se para o córtex somatossensorial, responsável pelos aspectos sensório-discriminativos (intensidade, localização e qualidade) da dor e nas áreas corticais límbicas, como córtex cingulado anterior, córtex insular e córtex frontal, envolvidos na mediação dos componentes afetivos / emocionais (aversão) da dor. Os neurônios talâmicos também se projetam para a amígdala, que interage com o núcleo accumbens, uma região envolvida tanto no processamento da dor como na mediação de recompensa. Essas regiões também dão entrada na PAG, que, por meio dos núcleos da rafe na RVM e do locus coeruleus, enviam projeções moduladoras de dor descendentes de volta às primeiras sinapses nas vias aferentes.



Fonte: Adaptado de Brodin et al. (2016).

### 2.4.1 Córtex frontal

O córtex frontal é uma estrutura que recebe projeções de áreas corticais sensoriais, bem como motoras e límbicas (UYLINGS; VAN EDEN, 1990). As funções



do córtex frontal no processamento de memórias de trabalho ou espacial, de procedimentos relacionados à atenção e controle autonômico (VERTES, 2006) estão bem documentadas. No entanto, apenas nas últimas décadas tem-se olhado para o córtex frontal como uma estrutura chave também nos processamentos emocionais.

Existem dois tipos principais de COX: a COX- 1 e a COX- 2, presentes na maioria dos tecidos. Existem também relatos da existência de um terceiro tipo de COX (COX-3), presente principalmente no córtex cerebral, que é inibida seletivamente por drogas analgésicas e antipiréticas, como a dipirona e o acetaminofeno (BASSANEZI; OLIVEIRA FILHO, 2006).

Contrariamente à visão tradicional de que o córtex cerebral não está envolvido na percepção da dor, uma extensa rede cortical associada ao processamento da dor foi revelada nas últimas décadas e é cada vez mais reconhecida como desempenhando um papel importante na representação e na modulação da dor (TALBOT et al., 1991; LONER; SCHNITZLER, 2004). Apesar de haver o reconhecimento das estruturas cerebrais envolvidas na transmissão da dor, os mecanismos cerebrais envolvidos na modulação da mesma, no entanto, ainda não são bem compreendidos. O córtex provavelmente influencia a dor por vários mecanismos. Foi proposto que o córtex cerebral possa reduzir a dor interrompendo a transmissão de informações nocivas a partir do nível da medula espinhal, ativando sistemas moduladores de dor descendentes localizados no tronco cerebral (OHARA et al., 2005). Múltiplos neurotransmissores, incluindo opioides, glutamato, GABA e dopamina, estão envolvidos na modulação da dor por essas estruturas corticais (OHARA et al., 2005; LOPEZ-AVILA et al., 2004; COFFEEN et al., 2008).

Foi observado que as áreas corticais ativadas por estímulos nociceptivos são o córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal e córtex motor suplementar. Essas observações sugeriram que a representação da dor envolve muitas regiões corticais, e a ativação de diferentes sítios é responsável pela divisão de componentes discriminatórios e afetivos da sensação dolorosa, desempenhando papéis importantes na modulação da dor. A capacidade de localizar e descrever um estímulo doloroso reside no córtex somatossensorial primário, enquanto os aspectos desagradáveis e aversivos envolvem outras áreas corticais, como córtex frontal, opercular e cingulado (OHARA et al., 2005).

O córtex frontal fornece a principal aferência prosencefálica à PAG, e está envolvido na codificação dos aspectos cognitivos como a atenção e as expectativas,

principalmente a região dorsolateral do córtex frontal, cujas funções executivas influenciam a dor de uma forma dependente do contexto (AKITSUKI, DECETY, 2009). O córtex cingulado anterior (CCA) (assim como a região anterior da ínsula) tem papel primordial na codificação dos aspectos emocionais e motivacionais da dor (RAINVILLE et al., 1997) e se projeta diretamente para a PAG. O CCA parece ser uma região que coordena os impulsos de áreas parietais, envolvidas na percepção de ameaça corporal com os sinais de áreas corticais frontais envolvidas nos planos e prioridades de resposta para comportamentos relacionados à dor (PRICE, 2000). Estudos comportamentais com animais apontam a importância do CCA no processamento do aprendizado aversivo relacionado à dor (JOHANSEN, FIELDS, 2004).

#### **2.4.2 Hipotálamo**

O hipotálamo recebe não só aferências neurais como também humorais (sinais químicos circulantes) para realizar ajustes homeostáticos do meio interno. Em torno dos ventrículos estão os órgãos circunventriculares. Nessas regiões, a barreira hematoencefálica é permeável (capilares fenestrados) e os neurônios aí situados possuem receptores moleculares para os sinais químicos circulantes (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Neurônios projetam axônios para o hipotálamo, formação reticular, substância cinzenta periaquedutal, núcleo medial e intratálâmico e estruturas do cérebro anterior que são responsáveis pelas respostas neuroendócrinas e emocionais à dor (BASBAUM; BUSHNELL, 2002).

Estudos mostram que as conexões entre a PAG e o hipotálamo são recíprocas. A coluna dorsolateral, por exemplo, é a subdivisão da PAG preferencialmente conectada com os núcleos hipotalâmicos relacionados a reações de defesa, como os núcleos hipotalâmicos anterior (AHN) e ventromedial (VMH) e o núcleo pré- mamilar dorsal (PMD) (DE OLIVEIRA, 2000). O AHN é o principal núcleo hipotalâmico ativado após estimulação somática nociva e a PAG é a estrutura responsável por coordenar as funções autonômicas e sensoriais em resposta a esses aferentes nociceptivos oriundos de diferentes domínios periféricos (PARRY et al., 2002).

Do ponto de vista da resposta supra-segmentar, o indivíduo com dor crônica apresenta possível inabilidade de aumentar a secreção de hormônios do eixo

hipotálamo-hipofisário-adrenal ou amplificar a resposta simpática ao lidar com o estresse físico e emocional. Isso repercute nos níveis de secreção do cortisol, da adrenalina, da noradrenalina, do hormônio do crescimento (GH), dos tireoidianos e dos gonadais, tornando o sistema de defesa hipoativo. Na fibromialgia ou na dor miofascial, é possível que aconteça aumento da secreção hipotalâmica de CRH com regulação dos receptores na hipófise, níveis elevados de ACTH e baixos de cortisol, e resistência periférica à ação do cortisol. O eixo hipotálamo-hipofisário parece interagir, então, com o processo doloroso em vários níveis (NEEK et al, 2002).

A hipertermia ocorre quando os leucócitos, que estão fagocitando partículas estranhas, liberam pirogênios endógenos, substâncias que se distribuem no organismo e promovem a liberação de prostaglandinas (PGE), principalmente a PGE<sub>2</sub>, que atuam sobre o hipotálamo, aumentando o limiar térmico (LIVINGSTON, 2000).

### **2.4.3 PAG**

A PAG é um sítio neural crítico, tanto para a organização, quanto para a expressão de diversos comportamentos motivados necessários para a manutenção da espécie, tais como o alimentar (VAN ERP et al., 1993), o maternal (LONSTEIN; STERN, 1997) e o sexual (SAKUMA; PAFF, 1979). Muitos são os trabalhos que demonstram o papel clássico da PAG como um sítio neural crítico para a expressão das respostas de defesa (CARRIVE, 1993; BANDLER; SHIPLEY, 1994), possivelmente por meio de suas projeções descendentes para o tronco encefálico e medula espinhal. Além disto, a PAG parece ter também funções adaptativas nas decisões entre comportamentos reprodutivos e de predação (SUKIKARA et al., 2010).

A PAG recebe aferências do hipotálamo, córtex frontal e insular, amígdala, núcleo parafascicular do tálamo, núcleo cuneiforme, locus ceruleus, formação reticular e apresenta neurônios que contêm opioides endógenos, substância P e GABA. Estimulação elétrica e administração local de morfina nesta estrutura produzem marcada analgesia, tanto em animais como em seres humanos (TERMAN; BONICA, 2001).

A PAG desempenha um papel fundamental nesse cenário, uma vez que constitui uma verdadeira interface anatômica e funcional entre o prosencéfalo, o

tronco encefálico inferior e as vias nociceptivas ascendentes, modulando tanto a informação nociceptiva que provém da medula espinal quanto integrando áreas cerebrais que atendem ao componente afetivo-motivacional da dor (BENARROCH, 2012), sendo considerada um sítio crucial para o processamento de estratégias de enfrentamento a diferentes tipos de estresse, como ameaça do ambiente externo e dor (BANDLER, SHIPLEY, 1994). A PAG modula a transmissão nociceptiva espinal através de suas conexões com outros núcleos do tronco encefálico, incluindo a porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) e o tegmento pontino dorsolateral (DLPT) (OSSIPOV et al., 2010). Este sistema envolve principalmente opioides endógenos, noradrenalina e serotonina. Neurônios motores do córtex cingulado anterior, córtex frontal, ínsula, amígdala e hipotálamo alcançam a PAG, sugerindo que o contexto emocional, o estado de atenção e expectativas podem alterar as interações entre essas estruturas modulatórias da experiência dolorosa e, assim, inibir ou facilitar a dor (DE FELICE, OSSIPOV, 2016).

As principais vias de condução da dor no SNC são o trato espinotalâmico, o trato espinorreticular e o trato espinomesencefálico (CAILLIET, 1999; MILLAN, 1999). O trato espinorreticular, também conhecido como via de condução lenta, é filogeneticamente mais antigo e se localiza medialmente no tronco encefálico. Está ligado ao Sistema Reticular Ativador Ascendente (SARA) e à Substância Cinzenta Periaquedutal Ventral (SCPV) e envia projeções difusas para o tálamo, córtex e estruturas do sistema límbico. Já o trato espinotalâmico, ou vias de condução rápida, é filogeneticamente mais novo e se localiza lateralmente no tronco cerebral. Envia projeções para o tálamo ventrobasal e daí para o córtex sensorial (RUSSO et al., 1998). Outra via importante é a representada pelo trato espinomesencefálico, que termina em algumas regiões do mesencéfalo, onde se incluem a formação reticular mesencefálica e a PAG. Esta última região mantém conexões recíprocas com o sistema límbico por intermédio do hipotálamo (BALDO, 2012).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar adultos, machos, divididos em 6 grupos de 6 animais cada e mantidos em uma unidade livre de patógenos, com ciclo invertido 12/12, claro/escuro, umidade padrão e temperatura de 22 a 23<sup>o</sup> C. Receberam água e ração peletizada *ad libitum*. Quatro animais foram alojados por caixa de 50x30x16cm, trocada três vezes por semana (foram mantidos uma semana antes do início dos estudos para aclimação). Os procedimentos com animais foram aprovados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Cruzeiro do Sul (protocolo 022/16) e da Universidade Paulista (protocolo 087/16).

##### 3.1.1 Descrição dos grupos, fármacos e doses utilizadas

- Grupo 1: Solução salina 0,9%, 1ml, via intraperitoneal, por 10 dias
- Grupo 2: fluoxetina, 10 mg/kg, via intraperitoneal, por 10 dias
- Grupo 3: carbamazepina, 40 mg/kg, via intraperitoneal, por 10 dias
- Grupo 4: dipirona, 200 mg/kg, por via intraperitoneal, por 10 dias
- Grupo 5: amantidina, 100 mg/kg, por via intraperitoneal, por 10 dias
- Grupo 6: cloridrato de quetamina S, 100 mg/kg, via intraperitoneal, por 10 dias

##### 3.1.2 Perfusão intracardíaca de solução fixadora

Os animais utilizados no estudo imuno-histoquímico para a GFAP foram perfundidos com solução perfusora de formol tamponado a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH neutro) ao término do tratamento de 10 dias com as drogas anteriormente mencionadas.

A pressão de perfusão foi fornecida por uma coluna de 1,5 m de altura do perfusato, cuidando-se para evitar a presença de bolhas de ar no sistema de perfusão quando repleto de solução fixadora.

Cada animal foi profundamente anestesiado, utilizando-se tiopental sódico (Thiopentax, 50 mg/kg, via intraperitoneal, Cristália) e, uma vez abolido o reflexo de retirada da pata frente a um estímulo pressório, foi imobilizado em decúbito dorsal em uma placa de cortiça. Foi realizada uma laparotomia medial e supra- e infraumbilical e, posteriormente, uma incisão ântero-médio-lateral do diafragma. A parede torácica foi rebatida cranialmente por meio de uma incisão longitudinal bilateral, iniciando-se no rebordo costal (à direita e à esquerda) e estendendo-se até a porção distal de ambas as clavículas, sendo as costelas seccionadas. Com a exposição dos órgãos da cavidade torácica, foi removido o tecido adiposo periaórtico para melhor visualização da artéria aorta e introduzida, na porção medial do ventrículo esquerdo, uma cânula fina conectada ao sistema de perfusão. A extremidade distal da cânula foi deslocada em direção à valva aórtica com o objetivo de alcançar a porção proximal do arco da aorta. Com a cânula devidamente colocada, foi iniciada a perfusão, ao mesmo tempo em que no átrio direito foi feita incisão para possibilitar a drenagem do sangue e da solução perfusora.

Cada animal foi perfundido por aproximadamente 15-20 minutos ou até serem perfundidos 250 ml de solução.

### **3.1.3 Estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP**

As amostras permaneceram por, no mínimo 72 horas na solução fixadora. Cortes coronais foram feitos para separação do córtex frontal, da substância cinzenta periaquedutal (PAG) e do hipotálamo, permanecendo imersos em solução fixadora de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2-7,4) para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Cortes histológicos de blocos selecionados foram colhidos em lâminas tratadas com silano (Sigma) a 4% em acetona, objetivando uma melhor aderência aos mesmos. Tais cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol absoluto, etanol a 95%, a 80%, a 70% e a 50% e, a seguir, fervidos durante 15 minutos em forno de micro-ondas convencional (potência máxima), imersos em tampão citrato 0,01 M (ácido cítrico 0,01 M, 1:3, pH 6,0). Depois de resfriados durante 20 minutos, a peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 10% de peróxido de hidrogênio 30 volumes.

Para marcação imuno-histoquímica de GFAP, o método utilizado foi o da avidina-biotina, sendo cada procedimento intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato.

Os cortes foram, então, incubados, durante 16 horas a 4°C em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal primário anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFA, codenumber ZO334, Dako), padronizado na diluição 1:1000, a qual, por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Para tal diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25mL), azida sódica a 5% em água destilada (2,5mL) e solução salina tamponada (59mL).

Posteriormente, foi realizada a incubação dos cortes por 30 minutos com anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho (Universal LSABTM 2Kit/ HRP, Rb / Mo, K0609-1 Dako) na diluição 1:400 e, após, aplicação por 30 minutos do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase, diluído em solução salina tamponada com fosfato (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb/ Mo, Dako).

A imunorreatividade foi visualizada pela aplicação sobre os cortes de diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,1% como cromógeno e peróxido de hidrogênio a 0,5%. Os cortes foram contra corados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética sob lamínula. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle negativo, submetidas a todas as etapas do procedimento, porém suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

#### **3.1.4 Quantificação da reatividade astrocitária de GFAP**

Todos os cortes submetidos à prova imuno-histoquímica foram analisados, em microscopia de luz (com objetiva de 10x), para identificação e avaliação da distribuição e do comportamento morfológico das células marcadas para GFAP (coradas em castanho).

Dez fotomicrografias de cada lâmina histológica confeccionada para a PAG, córtex frontal e hipotálamo foram aleatoriamente feitas usando a objetiva de 40 x. A área dos processos astrocitários, marcados em marrom, foi automaticamente calculada em pixels usando o software Image Pro-Plus, de forma que só as células positivas são incluídas e a marcação de fundo, excluída.

### **3.1.5 Análise estatística**

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via e teste Tukey com significância estatística estabelecida em  $p < 0.05$ . A normalidade dos dados foi verificada (teste de Bartlett). As análises estatísticas foram realizadas pelo software Prisma



## 4 RESULTADOS

Não houve mortalidade nos animais tratados com as doses e os medicamentos utilizados neste estudo.

A expressão do marcador de astrócitos GFAP (representada pela contagem total de pixels) na PAG, no hipotálamo e no córtex pode ser vista, respectivamente, nas Figuras 2, 3 e 4.

Na PAG (Fig.2), a imunorreatividade da GFAP aumentou nos grupos amantadina, fluoxetina e quetamina em relação ao grupo controle, com diferença significativa de  $p < 0,0001$  para todos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos carbamazepina e dipirona quando comparados com salina.

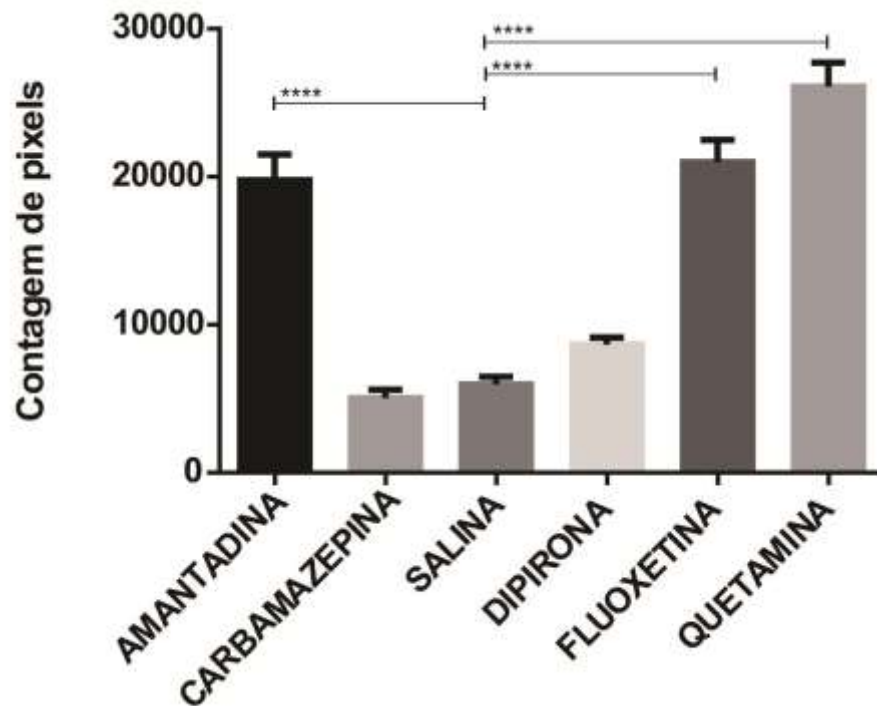
As diferenças significantes entre os distintos grupos na PAG, no hipotálamo e no córtex frontal, entre todos os grupos estão especificadas nos quadros 1, 2 e 3, respectivamente.

No hipotálamo (Fig.3), a expressão astrocitária foi aumentada em todos os grupos em relação ao grupo salina, com diferença significativa de  $p < 0,0001$  em todos os grupos.

No córtex frontal (Fig.4), pode-se observar aumento da imunorreatividade da GFAP em relação ao grupo salina nos grupos, amantadina, carbamazepina, dipirona e fluoxetina ( $p < 0,0001$ ), bem como no grupo quetamina ( $p < 0,001$ ).

A expressão do marcador de astrócitos GFAP na região da PAG, do hipotálamo e do córtex frontal está representada nas figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

Figura 2 – Contagem total de pixels da imunorreatividade de GFAP em astrócitos (representadas como média  $\pm$  erro padrão da média) na PAG dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo salina. \*\*\*\*  $p < 0,0001$



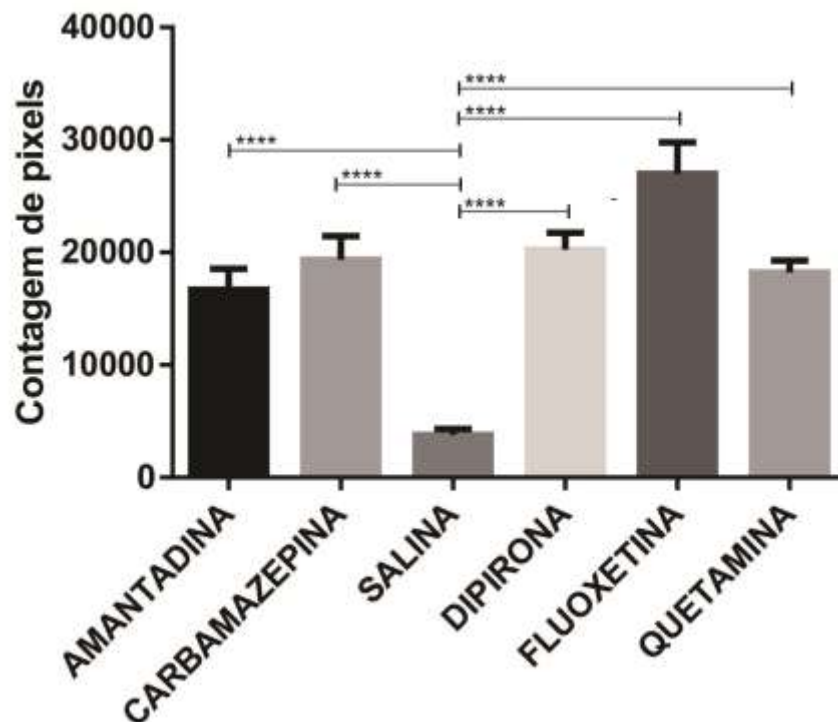
Fonte: Elaborada pela autora.

Quadro 1 – Significância estatística entre todos os grupos experimentais na PAG

Grupos	Significância
AMANTADINA vs. CARBAMAZEPINA	$p < 0,0001$
AMANTADINA vs. SALINA	$p < 0,0001$
AMANTADINA vs. DIPIRONA	$p < 0,0001$
AMANTADINA vs. FLUOXETINA	-
AMANTADINA vs. QUETAMINA	$p < 0,01$
CARBAMAZEPINA vs. SALINA	-
CARBAMAZEPINA vs. DIPIRONA	-
CARBAMAZEPINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,0001$
CARBAMAZEPINA vs. QUETAMINA	$p < 0,0001$
SALINA vs. DIPIRONA	-
SALINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,0001$
SALINA vs. QUETAMINA	$p < 0,0001$
DIPIRONA vs. FLUOXETINA	$p < 0,0001$
DIPIRONA vs. QUETAMINA	$p < 0,0001$
FLUOXETINA vs. QUETAMINA	$p < 0,5$

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3 – Contagem total de pixels de imunorreatividade de GFAP em astrócitos (representadas como média  $\pm$  erro padrão da média) no hipotálamo dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo salina. \*\*\*\*  $p < 0,0001$



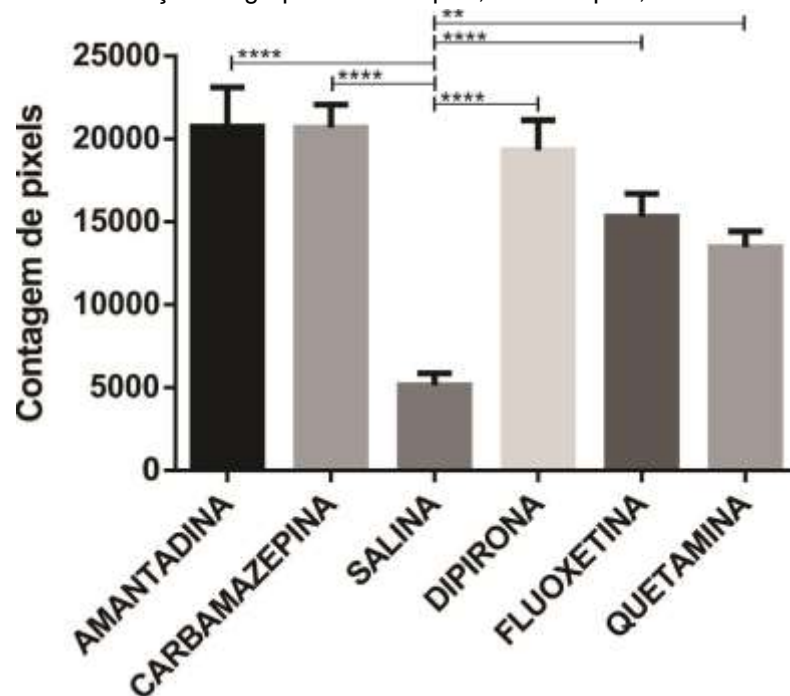
Fonte: Elaborada pela autora.

Quadro 2 – Significância estatística entre todos os grupos experimentais no hipotálamo.

Grupos	Significância
AMANTADINA vs. CARBAMAZEPINA	-
AMANTADINA vs. SALINA	$p < 0,0001$
AMANTADINA vs. DIPIRONA	-
AMANTADINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,001$
AMANTADINA vs. QUETAMINA	-
CARBAMAZEPINA vs. SALINA	$p < 0,0001$
CARBAMAZEPINA vs. DIPIRONA	-
CARBAMAZEPINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,05$
CARBAMAZEPINA vs. QUETAMINA	-
SALINA vs. DIPIRONA	$p < 0,0001$
SALINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,0001$
SALINA vs. QUETAMINA	$p < 0,0001$
DIPIRONA vs. FLUOXETINA	-
DIPIRONA vs. QUETAMINA	-
FLUOXETINA vs. QUETAMINA	$p < 0,01$

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 – Contagem total de pixels de imunoreatividade de GFAP em astrócitos (representadas como média  $\pm$  erro padrão da média) no córtex frontal dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo salina. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$



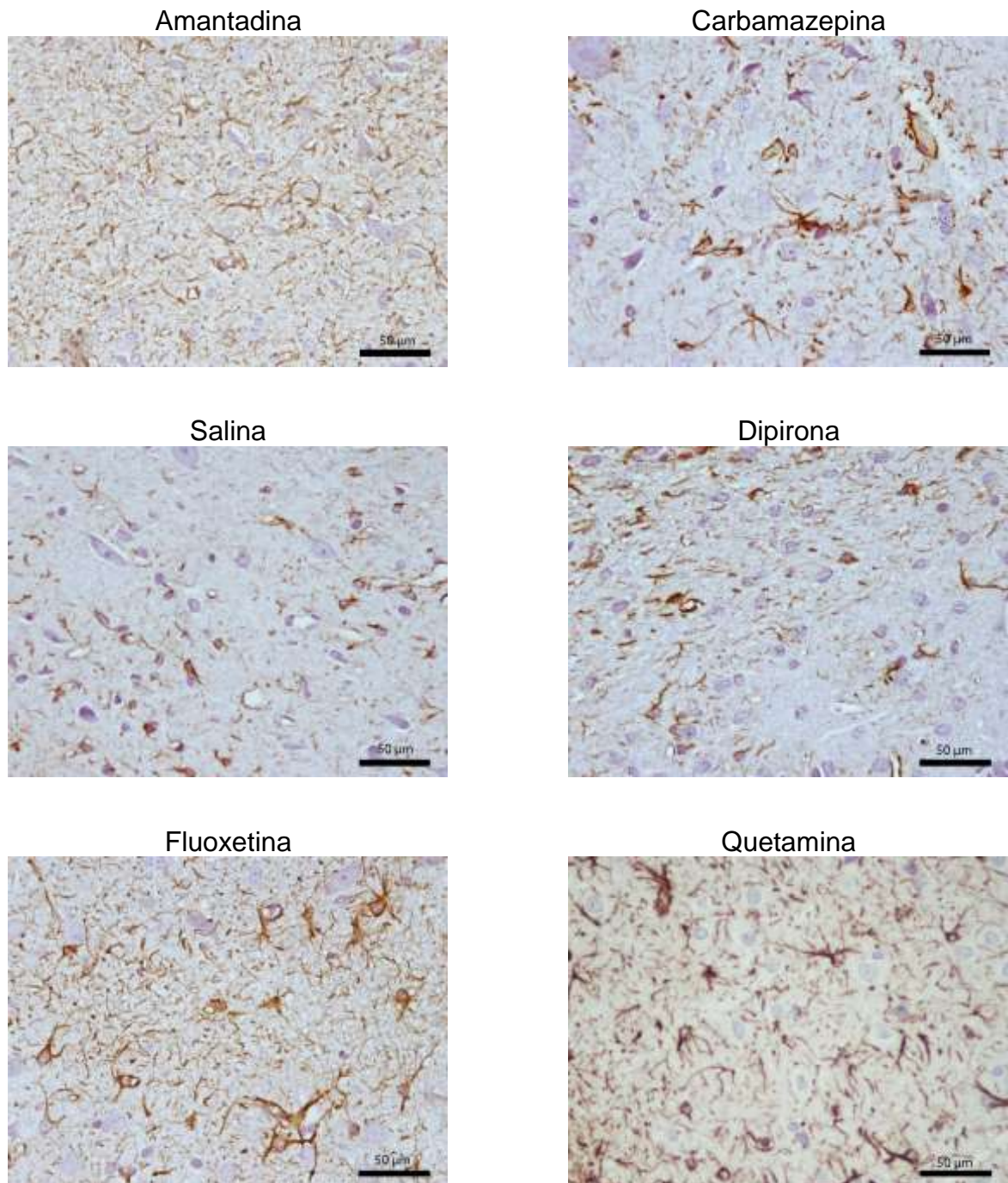
Fonte: Elaborada pela autora.

Quadro 3 – Significância estatística entre todos os grupos experimentais no córtex frontal.

.Grupos	Significância
AMANTADINA vs. CARBAMAZEPINA	-
AMANTADINA vs. SALINA	$p < 0,0001$
AMANTADINA vs. DIPIRONA	-
AMANTADINA vs. FLUOXETINA	-
AMANTADINA vs. QUETAMINA	$p < 0,05$
CARBAMAZEPINA vs. SALINA	$p < 0,0001$
CARBAMAZEPINA vs. DIPIRONA	-
CARBAMAZEPINA vs. FLUOXETINA	-
CARBAMAZEPINA vs. QUETAMINA	$p < 0,05$
SALINA vs. DIPIRONA	$p < 0,0001$
SALINA vs. FLUOXETINA	$p < 0,0001$
SALINA vs. QUETAMINA	$p < 0,001$
DIPIRONA vs. FLUOXETINA	-
DIPIRONA vs. QUETAMINA	-
FLUOXETINA vs. QUETAMINA	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 – Imunocoloração astrocitária para GFAP na PAG dos diferentes grupos experimentais. Obj. 40x

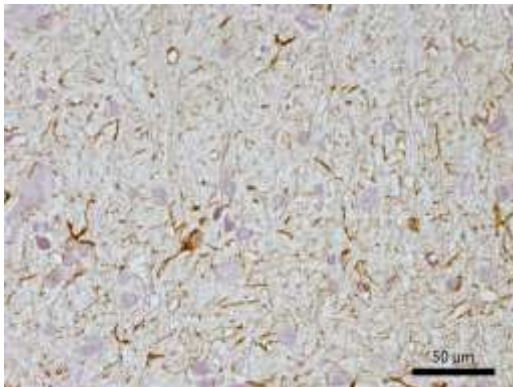


Fonte: Acervo da autora.

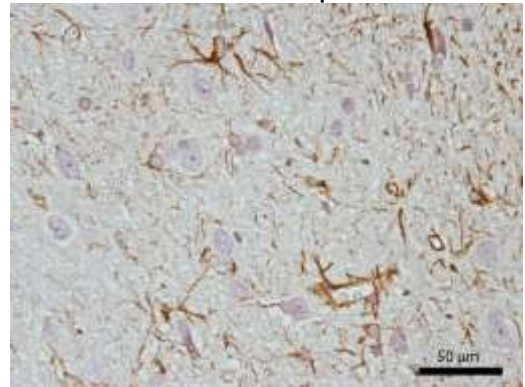


Figura 6 – Imunocoloração astrocitária para GFAP no hipotálamo dos diferentes grupos experimentais. Obj. 40x

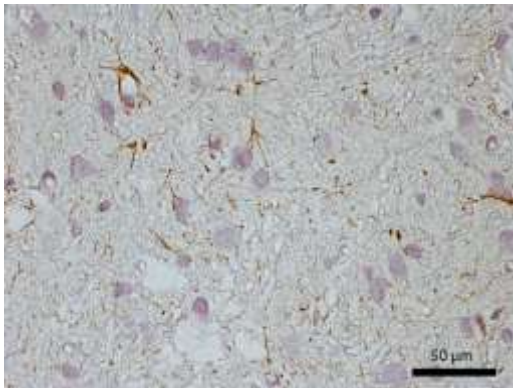
Amantadina



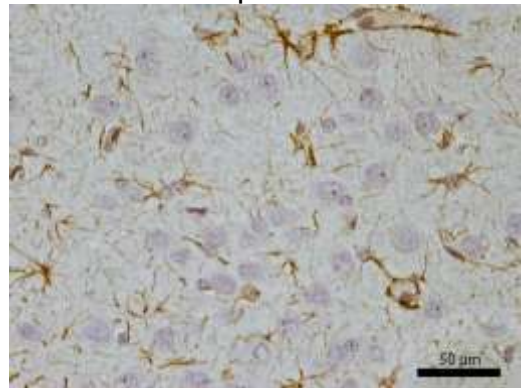
Carbamazepina



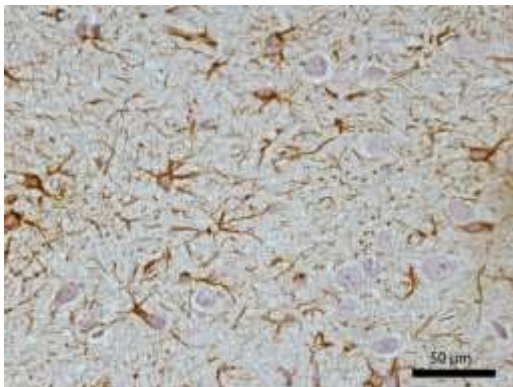
Salina



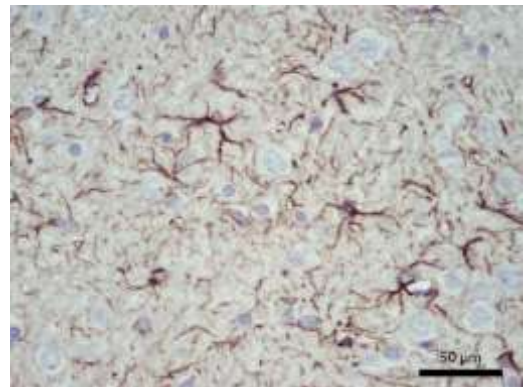
Dipirona



Fluoxetina

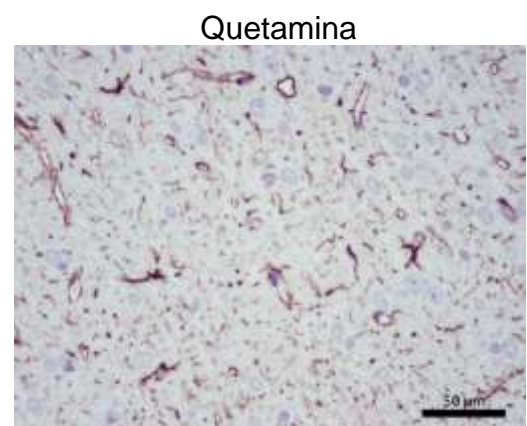
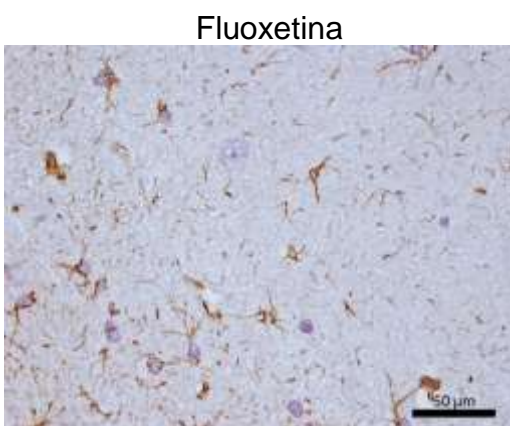
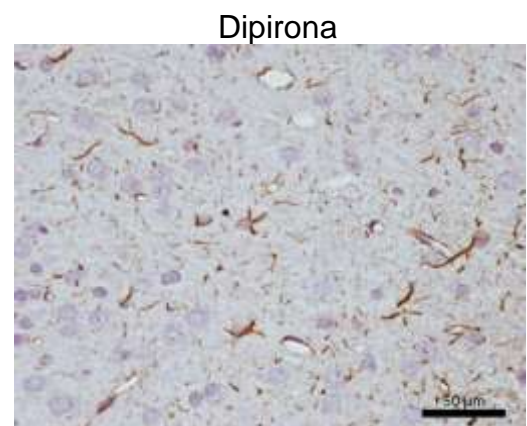
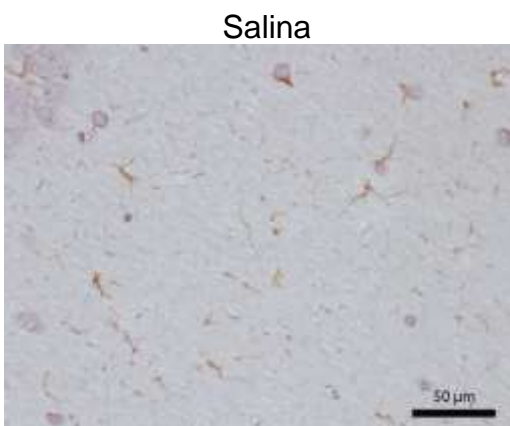
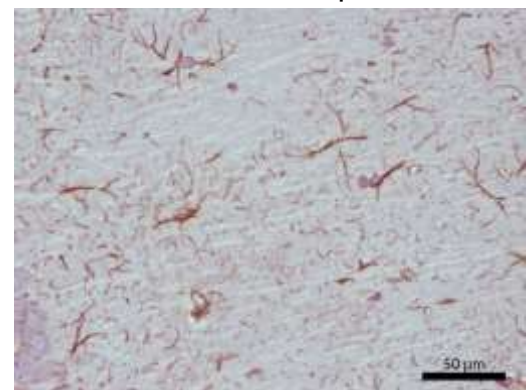
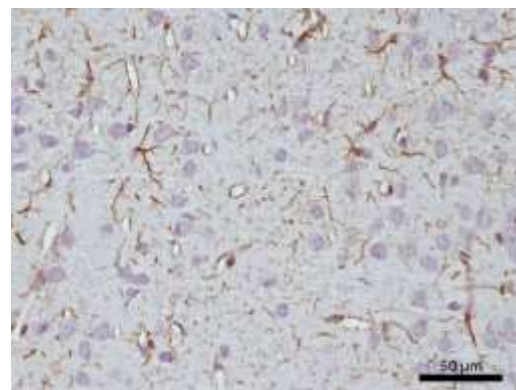


Quetamina



Fonte: Acervo da autora.

Figura 7 – Imunocoloração astrocitária para GFAP no córtex frontal dos diferentes grupos. Obj. 40x



Fonte: Acervo da autora.

## 5 DISCUSSÃO

Um número variado de eventos, incluindo danos ao SNC, infecções e estados de dor intensa, conduz à hipertrofia tanto da micróglia quanto dos astrócitos, com o aumento concomitante da produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e outras substâncias que potencialmente aumentam a sinalização da dor. Números aumentados destas células e de seus marcadores de expressão, como a GFAP astrocitária, podem ser utilizados para identificar a ativação das células gliais (MCMAHON et al., 2005).

Quando astrócitos e micróglia não estão ativados, não parecem ser importantes reguladores da transmissão da dor. No entanto, quando a glia torna-se ativa, a nocicepção é afetada, estimulando a sensação dolorosa. Células do sistema imune periféricas sinalizam para o SNC, induzindo respostas à doença, incluindo aumento da responsividade à dor, hipertermia, aumento do sono, diminuição da ingestão de comida e água, entre outras (WATKINS et al., 2003).

A expressão elevada de GFAP é uma das características primárias associadas a astrócitos reativos no contexto de lesão e inflamação (BURDA; SOFRONIEW, 2014). A astrogliose reativa é uma resposta a um espectro de mudanças, incluindo ganho e perda de função astrocítica, dependente do tipo e da gravidade da injúria, e pode resultar em benefícios ou prejuízos sobre o tecido neural circundante. Na astrogliose severa, os astrócitos reativos invadem domínios individuais dos astrócitos vizinhos, com a formação de uma cicatriz glial (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Foram propostas duas vias de astrogliopatias: a astrogliose reativa, na qual os astrócitos podem ter função neuroprotetora, e um segundo caminho, caracterizado como astrocitopatia, que inclui degeneração, com perda de função e remodelação patológica de astrócitos. As consequências dessas mudanças morfológicas e bioquímicas incluem a incapacidade de mediar a homeostase do glutamato nas sinapses, com redução de moléculas de sinalização e fatores tróficos, metabolismo de glicose alterado, entre outras alterações (PEKNY et al., 2016).

Mudanças na expressão de GFAP podem ser observadas em doenças neuropsiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, esquizofrenia e uso de drogas e substâncias diversas. Dessa forma, é descrito que tal expressão varia amplamente em resposta a diferentes drogas e situações (KIM et al., 2017, no prelo).



Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi o de observar a resposta astrocitária no córtex frontal, no hipotálamo e na substância cinzenta periaquedutal (PAG) após administração de doses de curta duração de fluoxetina, dipirona, carbamazepina, amantadina e quetamina, por meio da expressão do marcador astrocitário GFAP (proteína glial fibrilar ácida). É importante mencionar que os ratos utilizados neste estudo estavam aparentemente saudáveis e não foram submetidos a qualquer estímulo nocivo, inflamação ou dano ao SNP/SNC ou em tecidos periféricos.

De acordo com nossos resultados, pudemos observar que todas as drogas administradas aumentaram a expressão da GFAP no hipotálamo e no córtex frontal em relação ao grupo salina. Na PAG, apenas a amantadina, a fluoxetina e a quetamina aumentaram essa expressão, enquanto que não houve diferença significativa nos animais tratados com a carbamazepina e dipirona em relação ao grupo salina.

Foi revelado que antidepressivos produzem uma normalização da plasticidade estrutural do hipocampo, alterando o volume da área, o número de células (por exemplo, diminuindo a apoptose ou induzindo a gênese celular), volume das células e provocando alterações morfológicas dos dendritos e axônios (BOLDRINI et al., 2009; BOLDRINI et al., 2013).

Durante a dor neuropática há ativação dos receptores NMDA e para que os canais sejam abertos, ocorre liberação de glutamato e ligação simultânea da glicina. O magnésio bloqueia os canais NMDA, porém quando há ativação, é deslocado possibilitando a entrada de sinalizadores nociceptivos (PETRENKO et al., 2003; ZGAIA et al., 2015).

Sabe-se que a interação entre o astrócitos e neurônios é crucial para a modulação das sinapses glutamatérgicas excitatórias (JESSEN, 2004), regulando a quantidade de glutamina como o fator essencial para a liberação neuronal de glutamato e liberando o fator D-serina (BEN ACHOUR; PASCUAL, 2010). Além disso, foi demonstrado que a GFAP tem um papel importante na regulação do transporte de glutamato neuronal e astrocítico (HUGHES et al., 2004).

As proteínas receptoras NMDA foram identificadas em astrócitos corticais (CONTI et al., 1999), em células astrogliais do locus ceruleus (VAN BOCKSTAELE; COLAGO, 1996), e da medula espinhal (ZIAK et al., 1998), em uma subpopulação de astrócitos do hipocampo (PORTER; MCCARTHY, 1995) e nas células gliais

cerebelares de Bergmann (MULLER et al., 1993). Um estudo mais recente forneceu evidências definitivas para a existência da expressão funcional de receptores NMDA em astrócitos primários humanos (LEE et al., 2010).

Uma das principais tarefas dos astrócitos é a síntese e a liberação de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (ALTHAUS; RICHTER-LANDSBERG, 2000), e a dependência do efeito antidepressivo da quetamina no hipocampo em relação aos níveis de BDNF foi apresentada (MONTEGGIA et al., 2004). Consequentemente, uma explicação possível para o efeito terapêutico rápido da quetamina seria a ativação rápida de astrócitos, com estimulação substancial da síntese de BDNF por astrócitos hipertróficos ativados (ARDALAN et al., 2017).

Ardalan et al. (2017) observaram que a quetamina modula parâmetros comportamentais como imobilidade, atuando como um antidepressivo potente, além de modular vários parâmetros estruturais relacionados à plasticidade astrogliar após 24 horas. Foi demonstrado que uma dose única de quetamina tem efeito rápido na soma e na ramificação astrocítica de ratos em um modelo de depressão.

Um estudo demonstrou que a administração crônica de 20 mg/kg de quetamina aumentou significativamente a imunorreatividade da GFAP nas camadas moleculares e granulares do cerebelo e diminuiu na camada celular de Purkinje em comparação aos animais tratados com solução salina, demonstrando que a administração repetida de quetamina causa alterações estruturais e imuno-histoquímicas no córtex cerebelar e sugerindo, assim, que o uso de pequenas doses é muito mais seguro (ASKER et al., 2016).

Em um estudo, foi utilizado o modelo de dor por ligadura de nervo espinhal para investigar os efeitos antinociceptivos da quetamina administrada por via intratecal e foi observado que a ativação astrocitária de GFAP induzida pela ligadura foi suprimida pela quetamina (MEI et al., 2010).

Estudos sugeriram que os efeitos benéficos sobre a dor inflamatória são mediados por NMDA, enquanto aqueles em dor aguda e não inflamatória envolvem um sistema inibidor descendente da PAG e também diferem com base na fonte da dor. Além do bloqueio do receptor NMDA, a quetamina também interage com vários outros receptores, incluindo caminhos opioidérgicos, colinérgicos e monoaminérgicos, todos os quais poderiam desempenhar um papel na resposta analgésica (STRIGO et al., 2005).

Em estudos recentes, foi demonstrado que os antagonistas não competitivos do receptor NMDA, tais como quetamina, potencializam a ação analgésica da morfina na dor inflamatória e também evitam o desenvolvimento de tolerância, quando administrados por via intraperitoneal (HALDER et al., 2009; TANDON et al., 2010). No entanto, Smith et al. (1985) demonstraram a ineficácia da quetamina (nas doses de 0,1-100 mg) quando administrada diretamente na PAG em provocar uma resposta antinociceptiva. Em outro estudo, porém, foi administrada uma dose elevada de quetamina (100 mg) na PAG e observou-se diminuição da resposta dolorosa. Além disso, a co-administração da morfina com quetamina na PAG aumentou a resposta analgésica no animais. Essas descobertas insinuam o papel de receptores de NMDA juntamente com receptores de opioides presentes na PAG na evocação de resposta analgésica na dor neuropática (MEHTA et al., 2012).

Sugere-se que a amantadina, assim como a quetamina, tenha ação bloqueadora do receptor NMDA. Foi relatado que a amantadina apresentou efeitos neuroprotetores significativos (OSSOLA et al., 2011; GIACINO et al., 2012). Um desses efeitos foi demonstrado em estudos de cultura celular, nos quais a amantadina aumentou a produção do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), que pode inibir a ativação microglial e a neuroinflamação (OSSOLA et al., 2011; ROCHA et al., 2012).

Um estudo demonstrou que uma baixa dose de amantadina é suficiente na modulação da excitabilidade do córtex motor em humanos. Embora a amantadina tenha vários mecanismos de ação, o antagonismo do receptor NMDA parece ser o efeito mais relevante na excitabilidade cortical (REIS et al., 2006). De acordo com nossos resultados, tanto a quetamina como a amantadina aumentaram a expressão de GFAP em todas as áreas analisadas com significâncias similares, sugerindo que ambas podem compartilhar mecanismo de ação similar na ativação dos astrócitos.

A fluoxetina exerce um efeito direto sobre astrócitos, uma vez que os mesmos expressam vários subtipos de receptores 5-HT, como, por exemplo, receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (CHEN et al., 1995; AZMITIA et al., 1996; KONG et al., 2002). Especialmente os receptores 5-HT<sub>1A</sub> são abundantemente expressos no hipocampo (AZMITIA et al., 1996). A sua ativação é sugerida como um componente crítico no mecanismo de ação dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SANTARELLI et al., 2003).

Estudos anteriores tentaram identificar o papel dos astrócitos como um dos mecanismos celulares subjacentes ao efeito terapêutico da fluoxetina. Ao estudar a regulação da expressão do subtipo de receptor 5-HT nos astrócitos, após o tratamento com fluoxetina, descobriu-se que esta tem um efeito considerável na função glutamatérgica astrocítica (LI et al., 2011). No entanto, alguns estudos relataram resultados diferentes sobre a alteração morfológica de astrócitos após o tratamento com fluoxetina. Por exemplo, foi descrito que o estresse reduziu o volume de astrócitos, enquanto o tratamento com fluoxetina não teve efeito preventivo sobre o encolhimento somal dos astrócitos (CZEH et al., 2006).

Um estudo demonstrou que o tratamento com fluoxetina em ratos de 90 dias apresentou aumento significativo na expressão da proteína GFAP no estriado (putâmen), no córtex frontal e no hipocampo (BOCK et al., 2012). Já Fatemi et al. (2004) investigaram o efeito da fluoxetina no córtex pré-frontal de ratos adultos, não encontrando alteração da expressão de GFAP. Em nosso estudo, foi demonstrado que a fluoxetina teve capacidade de aumentar a expressão de GFAP em todas as áreas analisadas, possuindo efeito sobre astrócitos, que sabidamente, expressam receptores 5-HT.

De acordo com nossos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos carbamazepina e dipirona em relação ao grupo salina na região da PAG. A PAG contém uma rede rica em GABA (REICHLING; BASBAUM, 1990), contendo também receptores benzodiazepínicos e GABAérgicos (MENNINI; GOBBI, 1990). Foi relatado que a PAG é um dos principais locais alvo para a atividade antinociceptiva da carbamazepina e que os sistemas GABAérgicos estão envolvidos nesta ação da carbamazepina (BEHBEHANI et al., 1990).

Foi observado o efeito da carbamazepina na morfologia e na expressão da GFAP no hipocampo de ratos, após administração diária por gavagem de doses terapêuticas durante uma semana, 1 mês e 3 meses. Em comparação com o grupo controle, a imunorreatividade da GFAP e o número de astrócitos aumentaram significativamente após 3 meses, concluindo-se que as alterações da expressão astrocitária induzida pela carbamazepina dependem do tempo de administração (XINGSE; XIQING, 2006).

Achados de um estudo revelam que o GABA exerce um controle inibitório substancial e talvez tônico na atividade da PAG. Tal influência pode ser importante na modulação da atividade relativa na PAG e, portanto, o envolvimento desta

estrutura acaba por influenciar as funções de analgesia e nocicepção (BEHBEHANI et al., 1995).

O mecanismo de ação da dipirona se deve à inibição da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, pela inibição reversível da enzima ciclooxigenase (COX 1 e 2) e ativação dos sistemas opioidérgico e canabinoide. A dipirona é capaz de inibir uma terceira isoenzima da ciclooxigenase formada a partir do mesmo gene da COX-1, denominada de COX-3, expressa principalmente no córtex cerebral, mecanismo central pelo qual o fármaco exerceria suas ações analgésicas e antipiréticas. (CHANDRASEKHARAM et al., 2002)

A microinjeção de dipirona na PAG provoca antinocicepção em ratos, ativando circuitos opioidérgicos endógenos na PAG e a medula ventromedial rostral (HERNANDEZ et al., 2001; VASQUEZ et al., 2005). Na via central, os agonistas opióides, endógenos ou não, atuam sobre a PAG, o bulbo rostroventromedial e o corno dorsal da medula espinhal, ativando a via de controle descendente da dor, em parte, por ativar os canais de potássio e inibir canais de cálcio dependentes de voltagem (MILLAN, 2002). Periféricamente, tem-se proposto que agonistas  $\mu$  – opióides inibem a ativação da adenilato ciclase em neurônios aferentes primários, enquanto agonistas de receptores  $\delta$  e  $\kappa$  opióides inibem a secreção de substâncias pró-inflamatórias por neurônios simpáticos (KIM et al., 2006).

O fato de que a dipirona, um analgésico não opioide, ativa circuitos opioidérgicos pode estar relacionado com o resultado encontrado em nosso estudo, pois já havia sido demonstrado que opióides diminuem a expressão astrocitária de GFAP no tronco encefálico (AMARAL et al., 2016).

Nossos resultados demonstram que todas as drogas administradas aumentaram a expressão da GFAP no hipotálamo e no córtex frontal em relação ao grupo tratado com salina. Na PAG, apenas a amantadina, a fluoxetina e a quetamina aumentaram essa expressão. Esses resultados sugerem que circuitos opioidérgicos e GABAérgicos exercem um controle inibitório substancial e talvez tônico da atividade da PAG. A quetamina e a amantadina aumentaram a expressão de GFAP em todas as áreas analisadas com significâncias similares, sugerindo que ambas compartilham o mesmo mecanismo de ação na ativação dos astrócitos.

## 6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que todas as drogas empregadas no estudo aumentaram a expressão astrocitária de GFAP no hipotálamo e no córtex frontal em relação ao grupo salina, porém na PAG apenas amantadina, fluoxetina e quetamina aumentaram essa expressão, não havendo diferença significativa nos animais tratados com carbamazepina e dipirona em relação ao grupo injetado com salina.

Mais estudos devem ser feitos a fim de esclarecer os efeitos desses fármacos em astrócitos de outras regiões do SNC envolvidas com a modulação da dor, tanto na ausência e na presença de estímulos nocivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, R. et al. Activity of dipyrone on intraplatelet arachdonic acid metabolism an in vitro study. **Pharmacological Research**, v.21, p.43-50, 1989.

AKITSUKI, Y.; DECETY, J. Social context and perceived agency affects empathy for pain: an event-related fMRI investigation. **Neuroimage**, v.47, p.722-734, 2009.

ALLAMAN, I. et al. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. **Psychopharmacology**, v.216, p.75-84, 2011.

ALTHAUS, H.H, RICHTER-LANDSBERG, C. Glial cells as targets and producers of neurotrophins. **International Review of Cytology**, v.197, p.203–277, 2000.

AMARAL, G.F. et al. Astrocytic expression of GFAP and serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in rats treated with different pain relievers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52, p.623-633, 2016.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Fluoxetine attenuates thermal hyperalgesia through 5-HT<sub>1/2</sub> receptors in streptozotocin-induced diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v.497, p.285-292, 2004.

ARAÚJO, D.S.; SILVA, H.R.R.; FREITAS, R.M. Carbamazepina: Uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.7, p.30- 45, 2010.

ARDALAN, M. et al. Rapid antidepressant effect of ketamine correlates with astroglial plasticity in the hippocampus. **British Journal of Pharmacology**, v.174, p.483-492, 2017.

ARNOLD L. M. et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind, flexible-dose study of fluoxetine in the treatment of women with fibromyalgia. **The American Journal of Medicine**, v.112, p.191–197, 2002.

ASKER, S.A.; MAZROA, S.A.; SABRI, Y. Histological and immunohistochemical implications of ketamine protracted doses as a novel candidate in antidepressant treatment on adult rat cerebellar cortex. **International Journal of Advanced Research**, v.4, p.39-50, 2016.

ATEL, N. et al. A study of the use of carbamazepine, pregabalin and alpha lipoic acid in patients of diabetic neuropathy. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.13, p.1-7, 2014.

ATTWELL, D. et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. **Nature**, v.468, p.232-243, 2010.

AZAZIAN, N. et al. Evaluation of the efficacy and safety of pregabalin, venlafaxine, and carbamazepine in patients with painful diabetic peripheral neuropathy A randomized, double-blind trial. **Neurosciences**, v.19, p.192-198, 2014.

AZMITIA, E.C. et al. Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. **Neuropsychopharmacology**, v.14, p.35-46, 1996.

BALDO, M.V.C. Somestesia. In: AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p.265-278.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?. **Trends in Neuroscience**, v.17, p.379-389, 1994.

BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; BROADWELL, R.D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**, v.2, p.241-248, 1995.

BAO, Y.H. et al. Gabapentin attenuates morphine tolerance through interleukin-10. **NeuroReport**, v.25, p.71-76, 2014.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, editors. **Principles of Neuroscience**. New York: Appleton and Lange; 2000. p.472-491.

BASBAUM, A.; BUSHNELL, M.A. Pain: Basic mechanisms. In: Giamberardino MA (ed.), **Pain 2002 - an updated review: Refresher course syllabuss**. Seattle: IASP Press, 2002. p.3-7.

BASSANEZI, B.S.B.; OLIVEIRA FILHO, A.G.D.E. Analgesia pós-operatória. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v.33, p.116-122, 2006.

BEHBEHANI, M.M. et al. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. **Pain**, v.40, p.195-204, 1990.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v.46, p.575-605, 1995.

BEIRITH, A. et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v.345, p.233-245, 1998.

BELL, R.F. Ketamine for chronic non-cancer pain. **Pain**, v.141, p.210-214, 2009.

BEN ACHOUR, S.; PASCUAL, O. Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. **Neurochemistry International**, v.57, p.440-445, 2010.



BENARROCH, E.E. Periaqueductal grey: an interface for behavioral control. **Neurology**, v.78, p.210-217, 2012.

BENNETT, M.I et al. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v.122, p.289-294, 2006.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and the reaction to injury**. Austin: R.G. Landes, 1984. 108 p.

BOCK, N. et al. Chronic fluoxetine administration during different postnatal development stages leads to stage dependent changes of Glial Fibrillary Acidic Protein expression in rat brain. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v.2, p.292-312, 2012.

BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v.34, p.2376-2389, 2009.

BOLDRINI, M. et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. **Neuropsychopharmacology**, v.38, p.1068-1077, 2013.

BOSTOCK H. et al Temperature-dependent double spikes in Nociceptors of neuropathic pain patients. **Brain**, v.128, p.2154-2163, 2005.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.25, p.177-83, 2003.

BRODIN E. et al. Neurobiology: General considerations – from acute to chronic pain. **Den norske tannlegeforenings Tidende**, v.126, p.28-33, 2016.

BURDA, J.E.; SOFRONIEW, M.V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v.81, p.229-248, 2014.

BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B.B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, p.973-1101, 2011.

CAHOY, J. D. et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. **Journal of Neuroscience**, v.28, p.264-278, 2008.

CAILLIET, R. **Dor: Mecanismos e tratamento**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. p.5-6.

CAMPOS, C. et al. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **European Journal of Pharmacology**, v.378, p.339-347, 1999.

CAMU, F.; VANLERSBERGH, C. Pharmacology of systemic analgesics. Best practice & Research clinical. **Anaesthesiology**, v.16, p.475-488, 2002.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neural organization. **Behavior Brain Research**, v.58, p. 27-47, 1993.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, Y. et al. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT<sub>2C</sub> receptor in glial cells. **Brain Research Bulletin**, v.38, p.153-159, 1995.

CHIANG, C.Y. et al. Endogenous ATP involvement in mustard oil-induced central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). **Journal of Neurophysiology**, v.94, p.1751-1760, 2005.

CHIANG, C.Y.; SESSLE, B.J.; DOSTROVSKY, J.O. Role of astrocytes in pain. **Neurochemical Research**, v.37, p.2419–2431, 2012.

CHONG, M.S.; SMITH, T.E. Anticonvulsants for the management of pain. **Pain Reviews**, v.7, p.129-149, 2000.

COFFEEN, U. et al. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. **European Journal of Pain**, v.12, p.535-543, 2008.

COLBURN, R.W. et al. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. **Journal of Neuroimmunology**, v.79, p.163-175, 1997.

COLUCCI D'AMATO, C. et al. Fluoxetine for migraine prophylaxis: a double-blind trial. **Headache**, v.39, p.716-719, 1999.

CONTI, F. et al. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. **Cerebral Cortex**, v.9, p.110-120, 1999.

COYLE, D.E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glia**, v.23, p.75-83, 1998.

CZECH, B. et al. Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.1616-1626, 2006.

DE FELICE, M.; OSSIPOV M.H. Cortical and subcortical modulation of pain. **Pain Management**, v.6, p.111-120, 2016.

DE KEYSER, J. et al. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v.267, p.3-16, 2008.

DE OLIVEIRA, R.W., DEL BEL, E.A., GUIMARÃES, F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, v. 51, p. 457-464, 2000.

DERBYSHIRE, S. W. G.; OSBORN, J. Offset analgesia is mediated by activation in the region of the periaqueductal grey and rostral ventromedial medulla. **Neuroimage**, v.47, p.1002-1006, 2009.

DE WAAL, E.J.; VAN DER LAAN, J.W.; VAN LOVEREN, H. Effects of prolonged exposure to morphine and methadone on in vivo parameters of immune function in rats. **Toxicology**, v.129, p.201-210, 1998.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.M. (eds) **The pharmacology of Pain**. Berlin: Springer Verlag, 1997. p.167-210.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v.36, p.180-190, 2001.

DUAN, S. et al. P2X7 receptor mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.1320-1328, 2003.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v.54, p.15-36, 1993.

EIPPERT, F.; TRACEY, I. The spinal cord is never at rest. **eLife**, v.3, p.1-3, 2014.

EROL, K. et al. The role of inflammation and COX-derived prostanoids in the effects of bradykinin in isolated rat aorta and urinary bladder. **Inflammation**, v.35, p.420-428, 2012.

FAIRHURST, M. et al. Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. **Pain**, v.128, p.101-110, 2007.

FATEMI, S.H. et al. Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects with major depression, but not schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v.69, p.317-323, 2004.

FELLIN, T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. **Journal of Neurochemistry**, v.108, p.533-544, 2009.

FERNAUD-ESPINOSA, I.; NIETO-SAMPEDRO, M.; BOVOLenta, P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso and isomorphic gliotic tissue. **Glia**, v.8, p.277-291, 1993.

FISHER, A.; STARR, M.S. Opposite effects of glutamate antagonists and antiparkinsonian drugs on the activities of DOPA decarboxylase and 5-HTP decarboxylase in the rat brain. **Brain Research**, v.868, p.268-274, 2000.

FUKUI, S.; KOMODA, Y.; NOSAKA, S. Clinical application of amantadine, an NMDA antagonist, for neuropathic pain. **Journal of Anesthesia**, v.15, p.179-181, 2001.

GAMA, C.S. et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.30, p.512-515, 2006.

GAMA, C.S. et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.30, p.337-340, 2008.

GAO, Y.J, JI, R.R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacology & Therapeutics**, v.126, p.56-68, 2010.

GARCIA, J.B.S. et al. Dores neuropáticas centrais. **Revista Dor**, v.17, p.67-71, 2016.

GARRISON, C.J.; DOUGHERTY, P.M.; CARLTON, S.M. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. **Experimental Neurology**, v.129, p.237-243, 1994.

GENÇ, E. et al. The effect of chronic administration of sumatriptan and dipyrone on serotonergic system in the rat brain: an imuhistochemical study. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.120, p.264-269, 2009.

GHILARDI, J.R. et al. Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injuryinduced hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v.24, p.2727-2732, 2004.

GIACINO, J.T. et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury. **The New England Journal of Medicine**, v.366, p.819-826, 2012.

GODOY, M.C.M. et al.  $\alpha$ 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not for dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, v.496, p.93-97, 2004.

GOMES, F.C.A.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.619-631, 1999.

HALASSA, M.M.; HAYDON, P.G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annual Review of Physiology**. v.72, p.335-355, 2010.

HALDER, S. et al. Evaluation of interactions of ketamine with morphine in morphine-naïve and tolerant rats in formalina induced inflammatory pain. **Indian Journal of Pain**, v.23, p.333-338, 2009.

HASHIZUME, H. et al. 2000. Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. **Spine**, v.25, p.1206–1217. 2000.

HERNANDEZ, N.; VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. **Brain Research**, v.896, p.175–178, 2001.

HERTZ, L. et al. Chronic SSRI stimulation of astrocytic 5-HT<sub>2B</sub> receptors change multiple gene expressions/editings and metabolism of glutamate, glucose and glycogen: a potential paradigm shift. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.9, p.25, 2015.

HIEMKE, C.; HÄRTTER, S. Pharmacokinetic of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology Therapy**, v.85, p.11-28, 2000.

HIROTA, K.; LAMBERT, D.G. Ketamine: Its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anaesthesia**, v.77, p.441-444, 1996.

HUBER, T.J.; DIETRICH, D.E.; EMRICH, H.M: Possible use of amantadine in depression. **Pharmacopsychiatry**, v.32, p.47-55, 1999.

HUGHES, E.G. et al. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v.124, p.114-123, 2004.

HUTCHINSON, M.R.; SOMOGYI, A.A. (S)-(+)-methadone is more immunosuppressive than the potent analgesic (R)-(-)-methadone. **International Immunopharmacology**, v.4, p.1525-1530, 2004.

INOUC, K.; TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v.57, p.1469-1479, 2009.

JASIECKA, A.; MASLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J.J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.5, p.14-23, 2014.

JESSEN, K.R. Glial cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.1861-1867, 2004.

JOHANSEN, J.P., FIELDS, H.L. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. **Nature Neuroscience**, v.7, p.398-403, 2004.

KENIS, G.K.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v.5, p.401-412, 2002.

KIM, K.S. et al. Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.3908-3913, 2006.

KIM, R. et al. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2017. (No prelo)

KONG, E.K. et al. Up-regulation of 5-HT<sub>2B</sub> receptor density and receptor-mediated glycogenolysis in mouse astrocytes by long-term fluoxetine administration. **Neurochemical Research**, v.27, p.113-120, 2002.

LACROIX, S. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF, implications for neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, v.31, p.12533-12542, 2011.

LAMM, C.; DECETY, J.; SINGER, T. Meta-analytic evidence for common and distinct neural networks associated with directly experienced pain and empathy for pain. **Neuroimage**, v.54, p.2492-2502, 2011.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. **Philadelphia:Saunders**, v.30, p.703-728, 2000.

LARSSON, M.; BROMAN, J. Synaptic plasticity and pain, role of ionotropic glutamate receptors. **Neuroscientist**, v.17, p.256-273, 2011.

LASCELLES, B.D. et al. Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.53-59. 2008.

LASIC, E. et al. Subanesthetic doses of ketamine stabilize the fusion pore in a narrow flickering state in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v.138, p.909-917, 2016.

LATREMOLIERE, A; WOOLF, C. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, v.10, p.895-892, 2009.

LEE, M.C. et al. Characterisation of the Expression of NMDA Receptors in Human Astrocytes. **PLoS ONE**, v.5, e14123, 2010.

LEE, M.K et al. Behavioral evidence for the differential regulation of p-p38 MAPK and p-NF-kappa B in rats with trigeminal neuropathic pain. **Molecular Pain**, v.7, p.57, 2011.

LEE, M. C.; TRACEY, I. Imaging pain: a potent means for investigating pain mechanisms in patients. **British Journal of Anaesthesia**, v.111, p.64-72, 2013.

LI, N. et al. Serotonin activates dendritic cell function in the context of gut inflammation. **The American Journal of Pathology**, v.178, p.662–671, 2011.

LIU, J.S. et al. Modulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v.20, p.5292-5299, 2000.

LIVINGSTON, A. Mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Small Animal Practice**, v.30, p.773-782, 2000.

LONER, M.; SCHNITZLER, A. Cortical representation of pain. **Nervenarzt**, v.75, p.962-969, 2004.

LONSTEIN, J.; STERN, J.M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-Fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. **The Journal of Neuroscience**, v.17, p.3364-3378, 1997.

LOPEZ-AVILA, A. et al. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. **Pain**, v.111, p.136-43, 2004.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. et al. The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.91, p.196-201, 2008.

LUCENA, D.F; GAMA, S.C. **O Uso da Amantadina na esquizofrenia**. Programa de pós-graduação em ciências médicas: Psiquiatria INCT em medicina translacional, 2012.

LYNCH, M.E.; WATSON, P.N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. **Pain, Research and Management**, v.11, p.11-38, 2006.

MARCO, J.P. et al. Analgesia y sedación en urgencias. **Emergências**, v.12, p.272-279, 2000.

MARQUEZ, J.O. Anticonvulsivantes no tratamento das dores neuropáticas. In: Teixeira MJ. **Dor contexto interdisciplinar**. Curitiba: Editora Maio, 2003. p. 641-644.

MAX, M. B. et al. Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. **The New England Journal of Medicine**, v.326, p.1250-1256, 1992.

McMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, v.192, p.444-462, 2005.

MEHTA, A.K. et al. Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone and N-methyl-D-aspartate: Role of opioid and N-methyl-D-aspartate receptors. **Human & Experimental Toxicology**, v.31, p.51-56, 2012.

MEI, X.P. et al. Combining ketamine with astrocytic inhibitor as a potential analgesic strategy for neuropathic pain ketamine, astrocytic inhibitor and pain. **Molecular Pain**, v.6, p.50, 2010.

MENNINI, T.; GOBBI, M. Regional distribution of low-affinity GABA receptors coupled to benzodiazepine receptor subtypes in rat brain: An autoradiographic evaluation. **European Journal of Pharmacology**, v.189, p.143-148, 1990.

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

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v.46, p.142-153, 1997.

MIDDELDORP, J.; HOL, E.M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v.93, p.421-443, 2011.

MIKA, J. et al. Differential activation of spinal microglial and astroglial cells in a mouse model of peripheral neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v.623, p.65-72, 2009b.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.



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

MILLIGAN, E.D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Research**, v.861, p.105-116, 2000.

MILLIGAN, E.D. et al. Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. **Pain**, v.126, p.294-308, 2006.

MOISSE, K.; STRONG, M. J. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1762, p.1083-1093, 2006.

MONTEGGIA, L.M. et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.10827-10832, 2004.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, function and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v.31, p.145-167, 1994.

MORENO, R.A. et al. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p.42-43, 1999.

MORVANNOVA, M. et al. The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.18, p.247-258, 2001.

MULLER, T. et al. NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. **Neuroreport**, v.4, p.671-674, 1993.

MURAD, H.; AYUOB, N. Co-Administration of Pioglitazone Improves Fluoxetine's Antinociceptive, Neuroprotective, and Antidepressant Effects in Chronic Constriction Injury in Rats. **Pain Physician**, v.18, p.609-620, 2015.

NEECK, G. Pathogenic mechanisms of fibromyalgia. **Ageing Research Reviews**, v.1, p.243-255, 2002.

OHARA, P.T.; VIT, J.P.; JASMIN, L. Cortical modulation of pain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.44-52, 2005.

OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, p.37-87, 2010.

OSSOLA, B. et al. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia. **Neuropharmacology**, v.61, p.574-582, 2011.

PAGE, G. et al. Increased dopamine uptake in striatal synaptosomes after treatment of rats with amantadine. **European Journal of Pharmacology**, v.403, p.75-80, 2000.

PARRY, D.M. et al. Noxious somatic inputs to hypothalamic-midbrain projections neurons: a comparison of the columnar organization of somatic and visceral inputs to the periaqueductal gray in the rat. **Experimental Physiology**, v.87, p.117-122, 2002.

PEKNY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica**, v.131, p.323-345, 2016.

PETRENKO, A. B. et al. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. **Anesthesia and Analgesia**, v.97, p.1108-1116, 2003.

PEZET, S.; MCMAHON, S.B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annual Review of Neuroscience**, v.29, p.507-538, 2006.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: **Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais**. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook, 2005. p.30-74.

PORTER, J. T; MCCARTHY, K. D. GFAP positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroleptanalgesics with increases in  $[Ca^{2+}]_i$ . **Glia**, v.13, p.101-112, 1995.

PRICE, D.D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, v. 288, p. 1769-1771, 2000.

PUD, D. et al. The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial. **Pain**, v.75, p.349-354, 1998.

QIN, M. et al. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Neuroscience Research**, v.55, p.442-450, 2006.

QUEIROZ, G. et al. Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. **Neuroscience**, v.78, p.1203-1208, 1997.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J.A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.306, p.624-630, 2003.

RAIJ, T.T. et al. Brain correlates of subjective reality of physically and psychologically induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.2147-2151, 2005.

RAINVILLE, P. et al. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. **Science**, v. 277, p. 968-971, 1997.

REICHLING, D.B.; BASBAUM, A.I. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. **Journal of Comparative Neurology**, v.302, p.370-377, 1990.

REIS, J. et al. Modulation of human motor cortex excitability by single doses of amantadine. **Neuropsychopharmacology**, v.31, p.2758-2766, 2006.

REZENDE, R.M. et al. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**, v.153, p.760-768, 2008.

ROCHA, E. et al. Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. **Neuroreport**, v.9, p.3971-3974, 1998.

ROCHA, E.; RODNIGHT, R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v.63, p.1582-1584, 1994.

ROCHA, S.M. et al. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. **Neurobiology of Disease**, v.47, p.407-415, 2012.

ROMEIRO, L.A.S.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Novas estratégias terapêuticas para o tratamento da depressão: uma visão da química medicinal. **Química Nova**, v.26, p.350, 2003.

ROMERO-SANDOVAL, A. et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Research**, v.1219, p.116-126, 2008.

ROUACH, N. et al. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. **Science**, v.5, p.1551-555, 2008.

ROWBOTHAN, M.C. Treatment of Neuropathic Pain: Perspective on Current Options. In: **Pain 2005. An Updated Review. Refresher Course Syllabus**. Seattle: IASP Press, 2005. p.107-119.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.123-133, 1998.

SACERDOTE, P. Opioid and the immune system. **The Journal of Palliative Medicine**, v.20, p.9-15, 2006.

SAKUMA, Y.; PAFF, D.W. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. **American Journal of Physiology**, v.237, p.278-284, 1979.

SAWYNOK, J. Adenosine and ATP receptors. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.177, p.309-328, 2006.

SCHREIBER, S. et al. A randomized trial of fluoxetine versus amitriptyline in musculo-skeletal pain. **Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences**, v.38, p.88-94, 2001.

SEIFERT, G. et al. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, p.194-206, 2006.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v.301, p.805-809, 2003.

SELEMON, L.D.; LIDOW, M.S.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. **Biological Psychiatry**, v.46, p.161-172, 1999.

SIEBEL, J.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. **Brain Research**, v.1003, p.61-67, 2004.

SINGER, T. et al. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v.303, p.1157-1162, 2004.

SMITH, D.J. et al. Ketamine analgesia is not related to an opiate action in the periaqueductal gray region of the rat brain. **Pain**, v.21, p.253-265, 1985.

SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v.119, p.7-35, 2010.

STENOVEC, M. et al. Ketamine inhibits ATP-evoked exocytotic release of brain-derived neurotrophic factor from vesicles in cultured rat astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v.53, p.6882-6896, 2015.

STIPURSKY, J. et al. Neuron glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. **Life Science**, v.89, p.524-531, 2011.

STRIGO, I.A. et al. The effects of racemic ketamine on painful stimulation of skin and viscera in human subjects. **Pain**, v.113, p.255-264, 2005.

STUESSE, S.L. et al. Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. **Experimental Brain Research**, v.137, p.219-227, 2001.

SUKIKARA, M.H. et al. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behavioural Brain Research**, v.209, p.226-233, 2010.

TALBOT, J.D. et al. Multiple representations of pain in human cerebral cortex. **Science**, v.251, p.1355-1358, 1991.

TANGA F.Y. et al. Role of astrocytic S100beta in behavioral hypersensitivity in rodent models of neuropathic pain. **Neuroscience**, v.140, p.1003-1010, 2006.

TANDON, O.P. et al. Peripheral interaction of opioid and NMDA receptors in inflammatory pain in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.54, p.21-31, 2010.

TATSUO, M.A. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, v.18, p.399-405, 1994.

TEMBHURNE, S.V.; SAKARKAR, D.M. Effect of Fluoxetine on an Experimental Model of Diabetes-induced Neuropathic Pain Perception in the Rat. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, p.621-625, 2011.

TERMAN, G.; BONICA, J.; Spinal Mechanisms and their modulation. In: Loeser J., Butler S., Chapman C., Turk D. **Bonicas Management of Pain**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p.73-152.

TRANQUILLI, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.399-402.

TSUBOI, Y. et al. Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. **European Journal of Neuroscience**, v.34, p.292-302, 2011.

UNGVARI, Z.; PACHER, P.; KOLLER, A. Serotonin reuptake inhibitor fluoxetine decreases arteriolar myogenic tone by reducing smooth muscle [Ca<sup>2+</sup>]. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.35, p.849-854, 2000.

UYLINGS, H.B.M.; VAN EDEN, C.G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. **Progress in Brain Research**, v.85, p.31-62, 1990.

VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Practice**, v.10, p.167-184, 2010.

VALLEJO, R.; de LEON-CASASOLA, O.; RAMSUN, B. Opioid therapy and immunosuppression: a review. **The American Journal of Family Therapy**, v.11, p.354-365, 2004.

VAN DE SANDE-LEE, S.; VELLOSO, L.A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.56, p.341-350, 2012.

VAN ERP, A.M.M. et al. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced electrically in the hypothalamic paraventricular area in the rat. **Behavior Brain Research**, v.59, p.95-101, 1993.

VAN BOCKSTAELE, E.J.; COLAGO, E.E.; VALENTINO, R.J. Corticotropin-releasing factor-containing axon terminals synapse onto catecholamine dendrites and may presynaptically modulate other afferents in the rostral pole of the nucleus locus coeruleus in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v.364, p.523-534, 1996.

VANEGAS, H. et al. PAG microinjected dipyrone (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. **Brain Research**, v.759, p.171-174, 1997.

VAZQUEZ, E. et al. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. **Brain Research**, v.1048, p.211-217, 2005.

VEGA-AVELAIRA, D.; MOSS, A.; FITZGERALD, M. Age-related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, p.617-662, 2007.

VERTES, R.P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v.142, p.1-20, 2006.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature Reviews Neuroscience**, v.6, p.626-640, 2005.

WALKER, Z. et al. Antidepressant treatment of chronic tension-type headache: a comparison between fluoxetine and desipramine. **Headache**, v.38, p.523-528, 1998.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.521, p.1-21, 2003.

WIEROŃSKA, J.M. et al. Antidepressant-like effect of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist in the olfactory bulbectomized rats. **Amino Acids**, v.23, p.213-216, 2002.

WINKELSTEIN, B.A.; DELEO, J.A. Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain. **Brain Research**, v.956, p.294-301, 2002.

WOOLF, C.J. Central sensitization, implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v.152, p.s2-s15, 2011.

WOOLF, C.J. et al. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **The Journal of Comparative Neurology**, v.360, p.121-134, 1995.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control to ward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v.140, p.441-451, 2004.

WOLFF, K. WINSTOCK, A.R. Ketamine: from medicine to misuse. **CNS Drugs**, v.20, p.199-218, 2006.

XIA, D. et al. Fluoxetine ameliorates symptoms of refractory chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. **Chinese Medical Journal**, v.124, p.2158-2161, 2011.

XIE, Y.F. et al. Involvement of glia in central sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, p.634-664, 2007.

XINGSE, L.; XIQING, C. Effects of carbamazepine on the morphology of astrocytes and GFAP expression in hippocampus of rats. **Basic Medical Sciences and Clinics**, v.26, p.1104-1107, 2006.

ZGAIA, A.O. et al. The role of ketamine in the treatment of chronic cancer pain. **Clujul Medical**, v.88, p.457-461, 2015.

ZHANG, R. et al. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. **Pain**, v.118, p.125-136, 2005.

ZHANG, X. et al. Brain-derived neurotrophic factor-activated astrocytes produce mechanical allodynia in neuropathic pain. **Neuroscience**, v.199, p.452-460, 2011.

ZHUO, M.; WU, G.; WU, L.J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. **Molecular Brain**, v.4, p.31-64, 2011.

ZIAK, D.; CHVATAL, A.; SYKOVA, E. Glutamate-, kainate- and NMDA-evoked membrane currents in identified glial cells in rat spinal cord slice. **Physiological Research**, v.47, p.365-75, 1998.