

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**RAQUEL VIEIRA NIELLA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO MAROPITANT EM  
MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR LESÃO CONSTRICTIVA  
CRÔNICA EM RATOS**

**ILHÉUS – BAHIA  
2020**

**RAQUEL VIEIRA NIELLA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO MAROPITANT EM  
MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR LESÃO CONSTRITIVA  
CRÔNICA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Profº Dr. Mário Sérgio Lima de Lavor

**ILHÉUS – BAHIA  
2020**

N668

Niella, Raquel Vieira.

Avaliação dos efeitos antinociceptivos do maropitant em modelo de neuropatia periférica induzida por lesão constrictiva crônica em ratos / Raquel Vieira Niella. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.

65 f.: il.; anexos.

Orientador: Mário Sérgio Lima de Lavor.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Animais - Doenças. 2. Analgesia. 3. Dor – Tratamento.  
4. Medula espinhal. I. Título.

CDD 636.089

**RAQUEL VIEIRA NIELLA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO MAROPITANT EM  
MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO  
CRÔNICA EM RATOS**

Ilhéus – BA, 28/02/2020

---

Mário Sérgio Lima de Lavor – Dsc  
UESC /DCAA  
(Orientador)

---

Fabiana Lessa Silva – Dsc  
UESC

---

Edison Rogério Cansi – Dsc  
UFSB

**ILHÉUS – BAHIA  
2020**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em todas as realizações da minha vida, me dando força e amparo.

Agradeço a meus queridos pais, Givaldo e Eliana, que sempre estiveram presentes na minha vida, apoiando todas as minhas decisões. Obrigada pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e por abrirem mão de muitas coisas em prol de mim. Ao meu irmão Yuri e cunhada Aynna pelo carinho, apoio e ajuda sempre que necessário. Aos meus queridos avós, que sempre acreditaram em mim e deram forças, obrigada pelas orações. Todos moram no meu coração e, mesmo longe, nunca deixo de pensar em cada um de vocês. Com certeza, sem esta família maravilhosa, nada disso seria possível.

Agradeço a Mateus, por tanto incentivo, paciência, carinho e amor durante esse ano cansativo e desgastante de trabalhos e estudos durante a maior parte da semana.

Ao meu orientador, Prof. Mário Sérgio Lima de Lavor, obrigada por ter acreditado e investido em mim, pela orientação e pelo apoio em todo o meu período como aluna de Iniciação Científica e agora de Mestrado. Exemplo profissional, gratidão pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade, paciência e atenção dedicada. Serei eternamente grata.

À minha colega de equipe e agora de pós-graduação, Janaina Maria Xavier Correa, por toda a colaboração durante o período de experimento, de laboratório, de análises estatísticas, que não foram poucas... Correções e sugestões de trabalhos e sempre me aconselhando a fazer a melhor opção. Você é uma parceira e tanto, obrigada por toda disponibilidade, carinho e atenção.

Aos funcionários do Hospital Veterinário e da UESC pela colaboração e disponibilidade, em especial à Márcia, que fez com que meus longos dias de experimentos se tornassem menos desgastante e mais alegres. Obrigada por toda a ajuda, apoio e amizade dos alunos de iniciação e mestrado, especialmente a Claire, Larissa, João Felipe e Laíse.

Ao Prof. Carlos Priminho Pirovani, por ter nos acolhido tão bem e permitido utilizar o laboratório do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), bem como suas alunas Ariana, Tainara e Adriana, por estarem sempre disponíveis a ajudar e ensinar.

Não poderia deixar de citar os infindáveis dias de imunoistoquímica realizados no

CME. Agradeço imensamente ao Prof<sup>o</sup> Juneo Freitas Silva por todo conhecimento compartilhado, disponibilidade e incentivo durante essa etapa. E aos meus colegas Luciano, Sophia e Larissa por toda ajuda, companheirismo e perseverança, foi um enorme prazer adquirir esse conhecimento ao lado de vocês. Nunca esqueceremos a mais famosa: “Imuno é assim mesmo, gente”.

Aos componentes titulares Prof<sup>a</sup>. Fabiana Lessa e Prof<sup>o</sup> Edison Rogério Cansi, pela prontidão em compor a banca para avaliação desta dissertação e colaborarem para o enriquecimento desse trabalho.

A ZOETIS pela disponibilidade do fármaco para desenvolvimento da pesquisa, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz. Ao CNPQ pela concessão de bolsa de estudo e à FAPESB pelo financiamento de maneira indireta.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e aos que contribuíram para minha formação como pessoa e profissional. Serei eternamente grata.

# **AValiação DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO MAROPITANT EM MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR LESÃO CONSTRICTIVA CRÔNICA EM RATOS**

## **RESUMO**

O maropitant é um antagonista seletivo dos receptores da neurocinina-1 (NK1) que bloqueia a ação da substância P no sistema nervoso central e periférico e acredita-se que ele possa ser utilizado para o controle da dor neuropática. Objetivou-se avaliar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios produzidos pela administração do maropitant em ratos submetidos ao modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático. Foram utilizados 84 ratos submetidos à anestesia geral inalatória com sevoflurano para o procedimento de lesão constrictiva crônica (LCC). O tratamento e avaliações foram realizados sete dias após a LCC com a neuropatia estabelecida. Para tanto, o experimento foi dividido em três etapas: na primeira etapa, para determinar a curva dose-resposta, os animais foram divididos em oito grupos (n=7): GCP – LCC e solução salina 3 ml/kg/24q; GCN – exposição e solução salina 3 ml/kg/24q; GM3 - LCC e maropitant 3 mg/kg/24q; GM6 - LCC e maropitant 6 mg/kg/24q; GM15 - LCC e maropitant 15 mg/kg/24q; GM30 - LCC e maropitant 30 mg/kg/24q; GM50 - LCC e maropitant 50 mg/kg/24q e grupo Naive. As avaliações do limiar nociceptivo mecânico foram realizadas com trinta minutos, uma hora e duas horas após os tratamentos. Na segunda etapa, os animais receberam as doses efetivas de maropitant (GM15 e GM30), foram avaliados durante doze horas após aplicação do tratamento com intervalos de 2 horas, durante sete dias consecutivos. E na terceira etapa foi avaliado o efeito do tratamento na ativação microglial (IBA-1) e na atividade da Catalase. Em relação a curva dose-resposta a DE<sub>50</sub> foi 4,1 mg/kg, com aumento do limiar mecânico de 23,96%; 28,28%; 130,33% e 145,83% nas doses de 3, 6, 15 e 30 mg/kg, respectivamente. A dose de 50 mg/kg apresentou toxicidade em 100% dos animais. O grupo que recebeu Maropitant na dose 30 mg/kg/24q apresentou aumento significativo do LNM em relação ao controle positivo a partir de 30 minutos de avaliação, com diferença significativa comparada ao grupo que recebeu 15 mg/kg/24q após duas horas de avaliação. Essa ação antinociceptiva promovida pelo fármaco perdurou durante dez horas após aplicação e foi capaz de promover redução na ativação microglial marcada por IBA-1, assim como da atividade

enzimática e expressão da catalase. Conclui-se que o uso do maropitant na dose de 30 mg/kg foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo mecânico com duração de dez horas consecutivas, e apresentou diminuição da atividade glial e da catalase no mecanismo de neuropatia induzido por constrição nervosa em ratos.

**Palavras-chave:** Analgesia. Dor neuropática. Glia. Hiperalgisia. Medula espinal.



# EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF MAROPITANT IN A CHRONIC CONSTRICTION-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY MODEL IN RATS

## ABSTRACT

Maropitant is a selective antagonist of neurokinin-1 (NK1) receptors that blocks the action of substance P in the central and peripheral nervous system and is believed to be used to control neuropathic pain. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects produced by the administration of maropitant in rats submitted to the neuropathic pain model due to chronic sciatic nerve constriction. 84 rats submitted to general inhalation anesthesia with sevoflurane were used for the procedure of chronic constrictive injury (CCI). Treatment and evaluations were carried out seven days after CCI with established neuropathy. Therefore, the experiment was divided into three stages: in the first stage, to determine the dose-response curve, the animals were divided into eight groups (n = 7): PCG - CCI and saline solution 3 ml/kg/24q; NCG - exposure and saline solution 3 ml/kg/24q; MG3 - CCI and maropitant 3 mg/kg/24q; MG6 - CCI and maropitant 6 mg/kg/24q; MG15 - CCI and maropitant 15 mg/kg/24q; MG30 - CCI and maropitant 30 mg/kg/24q; MG50 - CCI and maropitant 50 mg/kg/24q and Naive group. The assessments of the mechanical nociceptive threshold were performed at thirty minutes, one hour and two hours after treatments; in the second stage, the animals received the effective doses of maropitant (MG15 and MG30), were evaluated for twelve hours after application of the treatment at 2-hour intervals, for seven consecutive days. After establishing the curve and time, the effect of treatment on microglial activation (IBA-1) and Catalase activity was evaluated. Regarding the dose-response curve, the ED<sub>50</sub> was 4.1 mg/kg, with an increase in the mechanical threshold of 23.96%; 28.28%; 130.33% and 145.83% at doses of 3, 6, 15 and 30 mg/kg, respectively. The 50 mg/kg dose showed toxicity in 100% of the animals. The group that received Maropitant at a dose of 30 mg/kg/24q showed a significant increase in relation to the positive control after 30 minutes of evaluation, with a significant difference compared to the group that received 15 mg/kg/24q after two hours of evaluation. This antinociceptive action promoted by the drug lasted for ten hours after application and was able to promote a reduction in microglial activation marked by IBA-1, as well as enzyme activity and catalase

expression. It was concluded that the use of maropitant at a dose of 30 mg/kg was able to increase the mechanical nociceptive threshold for ten consecutive hours, and showed a decrease in glial and catalase activity in the neuropathy mechanism induced by nervous constriction in rats.

**Keywords:** Analgesia. Glia. Hyperalgesia. Neuropathic pain. Spinal cord.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema geral do modelo experimental e determinação da curva dose-resposta.....33
- Figura 2**- Esquema da segunda etapa do experimento.....34
- Figura 3** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital após uma hora de aplicação do tratamento. (A) LCC e Maropitant 3 mg/kg (GM3); (B) LCC e Maropitant 6 mg/kg (GM6); (C) LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e (D) LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN = grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP.....38
- Figura 4** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital após duas horas de aplicação do tratamento. (A) LCC e Maropitant 3 mg/kg (GM3); (B) LCC e Maropitant 6 mg/kg (GM6); (C) LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e (D) LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP.....39
- Figura 5** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico através do analgesímetro digital após duas horas de aplicação do tratamento. LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP.....40
- Figura 6**- Eficácia das doses do Maropitant. Média e erro padrão médio do LNM dos ratos com neuropatia estabelecida e ao final do tratamento nas diferentes doses (n=7; \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,0001$ , comparado entre os grupos).  
.....40
- Figura 7** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico através do analgesímetro digital durante 12 horas após aplicação do tratamento. (A) Dia 1; (B) Dia 4; (C) Dia 8. LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle

positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao GCP.....42

**Figura 8** - Expressão proteica de IBA-1 na medula espinal de ratos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de IBA-1 em (A) Grupo controle negativo; (B) Grupo controle positivo; (C) Naive e (D) Grupo maropitant 30 mg. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (Média  $\pm$  SEM; n=6; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ). Aumento de 40x...45

**Figura 9** - Expressão proteica de CAT na medula espinal de ratos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de CAT em (A) Grupo controle negativo; (B) Grupo controle positivo; (C) Naive e (D) Grupo maropitant 30 mg. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (média  $\pm$  SEM; n=6; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ). Aumento de 40x.....46

**Figura 10** - Média e erro padrão médio da CAT em ratos (n=7) submetidos à exposição do nervo (Controle negativo) e LCC associado ao tratamento com salina (Controle positivo) e com maropitant (Maropitant 30 mg) ( $P = 0,002$ ). .....47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Avaliação do limiar nociceptivo mecânico durante 12 horas após tratamento com maropitant na dose de 15 e 30 mg/kg. Dados representam Média  $\pm$  Erro padrão médio. ....43
- Tabela 2**- Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB). ....65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro(s)
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP	Adenosina trifosfato
Aβ	Alfa beta
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAM	Concentração alveolar mínima
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
DE <sub>50</sub>	Dose efetiva capaz de ter efeito em 50% da população
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCP	Grupo controle positivo
GCRP	Proteína relacionada ao gene da calcitonina
GM15	Grupo maropitant 15 mg/kg/24q
GM3	Grupo maropitant 3 mg/kg/24q
GM30	Grupo maropitant 30 mg/kg/24q
GM50	Grupo maropitant 50 mg/kg/24q
GM6	Grupo maropitant 6 mg/kg/24q
GPx	Glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IASP	International Association for the Study of Pain
IBA	Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1
IV	Intravenosa
Kg	Quilograma
LCC	Lesão constrictiva crônica
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina
LNM	Limiar nociceptivo mecânico
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm	Milímetro

NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NK1	Receptor de neurocinina 1
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus Celsius
RPM	Rotação por minuto
SC	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TFK	Tampão fosfato de potássio
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
V%	Volume por cento

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos específicos: .....	17
3. CAPÍTULO I.....	18
3.1 Fisiopatologia da Dor .....	19
3.2 Dor Neuropática.....	21
3.2.1. O sistema imunológico na dor neuropática .....	24
3.2.2. Estresse oxidativo .....	25
3.3. Modelo experimental de dor neuropática – Lesão Constrictiva Crônica (LCC).....	26
3.4 Maropitant.....	28
4. CAPÍTULO II.....	29
4.1. INTRODUÇÃO.....	30
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.2.1. Animais.....	31
4.2.2 Lesão Constrictiva Crônica do nervo ciático (LCC) .....	32
4.2.3 Limiar Nociceptivo Mecânico: analgesímetro digital .....	32
4.2.4 Procedimentos experimentais .....	33
4.2.4.1 Ensaio 1 - Determinação da curva dose-resposta.....	33
4.2.4.2 Ensaio 2 - Avaliação do efeito analgésico e tempo de ação do Maropitant .....	34
4.2.4.3 Ensaio 3 – Avaliação da ativação glial e atividade da catalase após tratamento com Maropitant.....	34
4.2.6 Análise estatística .....	37
4.3 RESULTADOS .....	38
4.3.1 Ensaio 1 - Determinação da curva dose-resposta.....	38
4.3.2 Ensaio 2 - Avaliação do efeito analgésico e tempo de ação do Maropitant .....	41
4.3.3 Ensaio 3 - Avaliação da ativação glial e catalase após tratamento com Maropitant .....	44
4.4 DISCUSSÃO.....	48
4.5 CONCLUSÃO .....	52
5. COSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO I - PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA .....	64



## 1. INTRODUÇÃO

Uma nova definição para dor foi proposta, em que “a dor é uma experiência angustiante associada a dano tecidual real ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais” (WILLIAMS; CRAIG, 2016). Fisiologicamente, funciona como sinalização de uma lesão, desencadeando reações de proteção, tendo importante função de defesa. Porém, a dor não é somente uma sensação desagradável, mas uma complexa modalidade sensorial essencial para sobrevivência (PATEL, 2010).

Conforme a duração, a dor pode ser classificada como aguda, que possui função protetiva importante para a sobrevivência, alertando o indivíduo sobre iminente dano tecidual; ou crônica, quando persiste por três meses ou mais. Dor crônica não tem finalidade protetiva, é considerada doença Perse, trazendo sérias consequências ao indivíduo, comprometendo a qualidade de vida do paciente (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012).

De acordo com a patogênese, a dor pode ser principalmente nociceptiva e patológica. A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares. A dor patológica refere-se a neuropática e é definida como uma dor que pode se desenvolver devido à danos no sistema nervoso central e/ ou sistema nervoso periférico (BENNET et al., 2006).

Com prevalência de 10 - 18% na população mundial, a dor neuropática é uma das principais modalidades de dor crônica (AUSTIN, 2012). Um estudo sugere que 1,5 bilhões de pessoas sofram com dor crônica no mundo. No Brasil, mais de 1/3 da população relata que a dor crônica compromete as atividades habituais e mais de 3/4 considera que limita as atividades cotidianas, relações sociais e familiares (COLLOCA et al., 2017). Devido à dor, cerca de 50% a 60% dos indivíduos tornam-se parcial ou totalmente incapacitados, transitória ou permanentemente (ARONOFF, 2016).

A dor neuropática é comum em pacientes humanos e animais em afecções como o câncer, após acidentes automobilísticos, cirurgias, lesão medular, neuralgia pós-herpética, dentre outras. É capaz de gerar dores principalmente à noite, prejudicando o sono, o trabalho e atividade física, principalmente em quem tem alodinia. Dessa forma os pacientes podem desenvolver depressão com redução na

qualidade de vida, tornando o tratamento mais difícil e cansativo (VAN HECKE et al., 2014).

O avanço recente da ciência do bem-estar animal aguçou o senso crítico sobre a necessidade de prevenção e tratamento adequado da dor crônica nos animais. Nesse contexto, dificuldades no diagnóstico e na avaliação precisa da dor representam desafios para o médico veterinário e o eventual desconhecimento acerca dos fármacos analgésicos disponíveis para o controle da dor crônica dificultam o manejo adequado, que tem importância direta sobre o bem-estar e a recuperação do paciente (MATHEWS et al., 2014).

Existem medicamentos para o tratamento da dor neuropática, porém, muitas vezes não são eficazes ou têm efeitos adversos que prejudicam a qualidade de vida e podem ainda desenvolver tolerância (MAINTJES, 2012). Os estudos envolvendo a fisiopatologia da dor crônica tem se tornado cada vez mais frequentes pois, clinicamente, há um grande interesse na utilização de fármacos capazes de prevenir que dores agudas se tornem crônicas ou de modular os eventos neurológicos e, com isso, a necessidade de novos agentes terapêuticos (POSSO et al., 2016).

A inflamação neurogênica desempenha um papel na resposta a lesão secundária após uma lesão no sistema nervoso central (SNC), incluindo lesão traumática e acidente vascular cerebral. A substância P (SP) é um neurotransmissor e um neuromodulador, capaz de ligar-se a receptores NK1, responsável por modular a resposta dolorosa e inflamatória e sua liberação é dependente da frequência e amplitude do insulto (CORRIGAN et al., 2015). Nessa perspectiva, acredita-se que a inibição da ação da SP com antagonista NK1 seja benéfica para modular o processo inflamatório e nociceptivo de dores crônicas.

Estudos têm demonstrado que a utilização do maropitant (Cerenia; Pfizer Animal Health), antagonista seletivo do receptor NK1 promove potencialização da anestesia inalatória em ratos, por reduzir a concentração alveolar mínima (CAM), o que sugere uma possível ação analgésica (AGUADO et al., 2015), além da ação antiinflamatória em modelo de pancreatite aguda induzida (TSUKAMOTO et al., 2018).

Neste contexto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) O uso do maropitant é capaz de proporcionar efeito antinociceptivo em modelo de lesão nervosa constritiva crônica em ratos.

- 2) A utilização do maropitant promove uma redução dos eventos inflamatórios que desencadeiam os processos neurodegenerativos na dor neuropática periférica.
- 3) A utilização do maropitant é capaz de diminuir a ativação microglial desencadeada durante a dor neuropática periférica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios do maropitant, em diferentes doses, em ratos submetidos a modelo experimental de dor neuropática por lesão constrictiva crônica.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Determinar uma curva dose resposta do maropitant mediante o limiar nociceptivo mecânico;
- Determinar o período hábil do efeito antinociceptivo do maropitant na neuropatia periférica induzida pela constrição nervosa;
- Verificar o efeito do tratamento com maropitant na ativação microglial e na atividade da catalase na neuropatia periférica.

### **3. CAPÍTULO I**

#### **FISIOPATOLOGIA DA DOR**

### 3.1 Fisiopatologia da Dor

A dor é uma experiência multidimensional, que envolve componentes sensoriais, afetivo-emocional e cognitivo, que está associada a dano real ou potencial de tecidos. Devido à sua complexidade e subjetividade, compreender e avaliar a dor torna-se uma tarefa primordial aos profissionais de saúde (PATEL, 2010).

As terminações nervosas periféricas chamadas nociceptores captam os estímulos nocivos e os transmitem para o corno dorsal da medula espinal através das fibras nervosas A-delta e C. Na medula, ocorre o processo de modulação e, em seguida, neurônios de projeção transmitem o estímulo para centros supra-espinais como mesencéfalo, diencefalo e córtex cerebral (BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores estão presentes em diferentes tecidos como pele, músculos, articulações, vasos, meninges, ossos e vísceras (KLAUMANN et al., 2008) e são sensibilizados quando o estímulo excede o limiar de ativação (MUIR III, 2009). Podem ser estimulados por qualquer agente nocivo aos tecidos e são sensíveis à temperatura, à vibração, à distensão e a substâncias químicas liberadas por células danificadas (MOFFAT; RAE, 2011). Dessa maneira, a dor pode ser provocada por pressões excessivas, pela ação cáustica de agentes químicos, pela temperatura acima de 45°C ou pelo frio intenso (JENSEN, 2008; TRACEY, 2017).

As fibras A-delta são mielinizadas de médio diâmetro e transmitem de maneira rápida a informação de dor aguda, chamada de primeira dor. As fibras C não são mielinizadas, têm diâmetro pequeno e transmitem de maneira lenta os potenciais de ação responsáveis pela segunda dor, descrita como uma sensação de queimação ou ardor. As fibras A $\beta$  possuem maior diâmetro, têm condução rápida e transmitem os estímulos mecânicos inócuos como o toque e pressão (BASBAUM et al., 2009).

A transmissão da informação algica no sistema nervoso central ocorre nas sinapses entre as fibras aferentes primárias com os interneurônios, neurônios proprioespinais e neurônios de projeção. É efetuada por neurotransmissores que possuem receptores específicos nos neurônios da medula espinal. Os principais neurotransmissores excitatórios são o glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e aspartato (BEAR et al., 2008).

Essas substâncias agem em receptores excitatórios pós-sinápticos como o N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA),

neurocinina (NK) e cainato. Os primeiros receptores que são ativados são o AMPA, cainato e NK; quando o estímulo doloroso se torna persistente, os receptores NMDA são ativados (BASBAUM et al., 2009; BELL, 2018).

Em seguida, os neurônios de projeção das vias ascendentes transmitem a informação sensorial para centros supra-espinais através dos tratos espinotalâmicos e espinoreticular. Os neurônios da via ascendente carreando as informações nociceptivas inervam o tálamo, mesencéfalo, diencéfalo e córtex cerebral onde ocorre a percepção e formulação de uma resposta (BOURNE et al., 2014).

Existe um sistema de analgesia endógeno que compreende as vias descendentes antinociceptivas noradrenérgicas e serotoninérgicas, opioides e a liberação de neurotransmissores inibitórios como a glicina e o GABA. Essas vias atuam modificando a liberação de neurotransmissores como GABA e glicina, enquanto os opioides agem em receptores opioides específicos (ELISSON, 2017).

Após lesão em um tecido, ocorre liberação local e difusa de íons  $K^+$  e  $H^+$ , ATP, prostaglandinas, bradicininas e fatores de crescimento dos nervos, ativando assim os nociceptores periféricos (SOMMER, 2016). A resposta inflamatória produzida ativa mastócitos, linfócitos, neutrófilos, os quais liberam substâncias vasoativas como histamina e substância P, que sensibilizam ainda mais os nociceptores, resultando em uma hiperalgesia primária. Esse processo é conhecido como sensibilização periférica e ativa nociceptores silenciosos de alto limiar das fibras aferentes primárias (BELL, 2018).

Com a sensibilização periférica e aumento da excitabilidade das fibras aferentes  $A\beta$  e C, ocorrem mudanças no corno dorsal da medula espinal. Os neurotransmissores inibitórios como GABA e glicina são inibidos, ocorrem mudanças neuroquímicas do receptor NMDA, neurocininas e morte de interneurônios. Devido ao aumento da excitabilidade das fibras A-delta e C, aumenta a despolarização pós-sináptica no corno dorsal mediada após ativação do receptor NMDA pelo glutamato e dos receptores da neurocinina pela substância P. As fibras  $A\beta$  passam a transmitir informação dolorosa. Essas mudanças são conhecidas como sensibilização central e levam à hiperalgesia secundária, caracterizada por dor ao redor da área lesionada e alodinia, quando um estímulo inócua passa a produzir dor (HELLYER et al., 2012).

A dor pode ser dividida em dois tipos: dor aguda e dor crônica. A dor aguda é temporária, geralmente surge após um evento traumático ou inflamatório, como

cirurgia, corte acidental com instrumento cortante e outros tipos de lesões. Já a dor crônica é caracterizada por um processo algico que perdura por um longo período, usualmente mais de três meses. Esta dor não tem função fisiológica e passa a ter um caráter debilitante, diminuindo a qualidade de vida do paciente. Seja ele humano ou animal, é um desafio por não responder de maneira adequada aos tratamentos convencionais (MAINTJES, 2012; ELLISON, 2017).

A dor ainda pode ser classificada em somática, que é proveniente da pele, músculos, articulações, ossos ou ligamentos (CHERUBINO et al., 2012) e dor visceral, que ocorre em órgãos abdominais e torácicos. Em medicina veterinária, o conhecimento sobre a dor visceral ainda é escasso (CATANZARO et al., 2016). Em humanos, a dor visceral é descrita como mal localizada, difusa, profunda e pontiaguda (ELLISON, 2017).

A dor pode ser classificada quanto aos mecanismos fisiopatológicos em dor nociceptiva, e neuropática. Na nociceptiva, as vias nociceptivas se encontram preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores de tecidos cutâneos (Dor somática) ou profundos (Dor visceral) e induz respostas protetoras para impedir o agravamento da lesão pelo estímulo nocivo (KLAUMANN et al., 2008). Já na neuropática, as vias nociceptivas apresentam alterações na estrutura e / ou função, resultante de lesão seletiva do trato neoespinotalâmico (Dor central) ou resultante de lesões no sistema nervoso periférico (Dor periférica) (MCKUNE et al., 2012).

### **3.2 Dor Neuropática**

Originalmente, o termo dor neuropática foi utilizado para descrever apenas a dor proveniente de neuropatias periféricas e a dor central para lesões do sistema nervoso central (TREEDE et al., 2008). No entanto, posteriormente definiu-se que a dor neuropática é uma dor crônica causada por uma consequência direta de lesão ou disfunção dos axônios ou corpo dos neurônios que cause interrupção da bainha de mielina, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (MIYAZAKI; YAMAMOTO, 2012).

Danos ou doenças dos axônios e da bainha de mielina prejudicam a habilidade de conduzir impulsos nervosos, causando hipoestesia (sensação reduzida ao estímulo

de dor) e dormência, juntamente com o déficit da função motora (MATHEWS, 2008). Em particular, a dor neuropática é caracterizada por estímulo de dor persistente independente (dor espontânea) seguido de percepção sensorial anormal, tal como hiperalgesia (aumento da intensidade da resposta a estímulos nocivos), disestesia (sensação anormal desagradável de dor) e alodinia (dor em resposta a estímulos inócuos) (BARON et al., 2010).

A ocorrência de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) e na medula espinal contribui para o desenvolvimento da dor neuropática. A lesão de tecidos ou nervos não apenas ativa as fibras nociceptivas produzindo dor aguda como também inicia uma série de mudanças nas propriedades dos nociceptores (WOOLF, 2011). As alterações geradas no potencial de membrana celular levam à ativação de canais iônicos, aumento na liberação de neurotransmissores, facilitação na transmissão excitatória, e ativação dos neurônios da medula espinal (sensibilização central) (KLAUMANN et al., 2008).

Após lesão de nervo, alguns pacientes desenvolvem alterações na distribuição e conformação de canais iônicos, especialmente canais de sódio, que promovem aumento da excitabilidade axonal das fibras C nociceptivas. Tal excitabilidade é, muitas vezes, gerada longe do foco da lesão inicial, sendo chamada de descargas ectópicas, mas é capaz de acarretar o surgimento de sintomas de características neuropática (JENSEN, 2008).

Além de causar alterações periféricas como, por exemplo, perda de força muscular, as lesões no SNP também podem alterar regiões subcorticais, desencadeando estímulos prolongados em aferentes primários. Dessa forma, promovem sensibilização, podendo ocasionar uma redução do limiar nociceptivo ou aumento das respostas aos impulsos aferentes, contribuindo assim para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (SIQUEIRA et al., 2001).

Após a lesão, ocorrem processos inflamatórios que desencadeiam um estado hiperexcitável conhecido como sensibilização periférica. Na maioria dos pacientes, esse estado desaparece à medida que a cura ocorre e a inflamação diminui. No entanto, quando a nocicepção persiste devido a estímulos contínuos de lesões ou doenças em andamento (por exemplo, no diabetes), as alterações nos neurônios aferentes primários podem persistir (COHEN; MAO, 2014).



Como a expressão gênica é capaz de afetar as características celulares, pode resultar em uma alteração no fenótipo da fibra nervosa, de modo que os neuromoduladores geralmente expressos nas fibras C (como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina C, substância P) passam a ser expressos em outras fibras. Dessa forma, estímulos inócuos passam a ser percebidos como estímulos nocivos por neurônios do corno dorsal da medula espinal (UEDA, 2006; NICKEL et al., 2012).

Além disso, a lesão do nervo periférico aumenta a excitabilidade neuronal na medula espinal, ativando os receptores excitatórios de glutamato e induzindo a regulação negativa dos transportadores de glutamato espinal, responsáveis pela manutenção da homeostase sináptica do glutamato. Essa disponibilidade regional aumentada de glutamato secundária à perda de transportadores pode resultar na ativação persistente e aprimorada de receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) e metabotrópicos (receptor metabotrópico de glutamato 2), levando a limiares de ativação mais baixos e aumento da excitabilidade neuronal e da neurotoxicidade (GUO et al., 2002).

À medida que o conhecimento sobre a fisiopatologia da dor neuropática aumenta, surgem vários alvos diferentes para uma terapêutica eficaz. Contudo, o problema ainda é identificar o mecanismo predominante em um indivíduo em particular e direcioná-lo adequadamente. Na prática, vários mecanismos diferentes podem coexistir e mudar ao longo do tempo, e a resposta de um indivíduo a um medicamento permanece imprevisível (COLLOCA et al., 2017).

O tratamento é complexo porque os pacientes com dor não respondem da mesma forma aos medicamentos. Além disso, cada indivíduo deve ser tratado de maneira única e de acordo com a causa primária e o tipo de dor que apresenta. Para identificar os tratamentos eficazes para as diversas condições álgicas, são necessários estudos em modelos experimentais de nocicepção (BOSCAN et al., 2011; NIYON et al., 2013; TODOROVIC; JEVTOVIC-TODOROCIV, 2013).

Apesar de estudos envolvendo algumas medicações, a grande maioria não é eficaz e ainda não há uma terapêutica específica. Autores relataram o uso de antidepressivos (KAUTIO et al., 2008), gabapentina (MELLEGGERS et al., 2001), anticonvulsivantes (EISENBERG et al., 2001), opióides e canabioides (TONIOLO, 2015). A terapêutica pode ser utilizada em associação ou isoladamente, a maioria dos

fármacos têm efeitos colaterais severos, por esse motivo devem ser utilizadas com cautela (BARON et al., 2010).

### **3.2.1. O sistema imunológico na dor neuropática**

Tradicionalmente, para a fisiopatologia da dor neuropática, consideram-se mecanismos neuronais, como amplificação das respostas dolorosas e aumento da atividade dos neurônios da medula espinal. Entretanto, há evidências crescentes sobre a participação de células não-neuronais em sua gênese, como as do sistema imunológico, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (THACKER et al., 2007; CLARK et al., 2013).

As alterações estruturais e químicas das fibras nervosas não são as únicas responsáveis pela perpetuação da dor neuropática. Por algum tempo se considerou que os mediadores inflamatórios produzidos pelas células imunológicas poderiam contribuir para a persistência da dor, porém surgiram evidências indicando uma comunicação entre os sistemas imunológico e nervoso (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 2002; MIGUEL et al., 2012).

A interferência das células imunológicas no processo de inflamação, caracterizado pelo edema, calor, rubor e dor já foi compreendida e, a partir de então, os antiinflamatórios passaram a fazer parte da terapia com sucesso. No entanto, dados mais recentes indicam que tais células podem desempenhar um importante papel na modulação da dor associada a lesões em nervos periféricos e no sistema nervoso central (INOUE; TSUDA, 2018).

As células da glia modulam a neurotransmissão nas sinapses e constituem 70% das células no sistema nervoso central, e dentre elas os astrócitos e microglia desempenham um importante papel no aparecimento, propagação e potencialização da dor neuropática (WAKE et al., 2013).

Um aumento no número de células microgliais no corno dorsal da medula após uma lesão nervosa periférica foi registrado desde o final da década de 70 (GILMORE; SKINNER, 1979) e, posteriormente, vários modelos de dor neuropática em roedores foram estabelecidos, com relatos de uma correlação entre ativação microglial e comportamentos de dor (GUAN et al., 2016).

A lesão inicial de uma fibra nervosa também obedece à cascata inflamatória que resulta no aumento da perfusão sanguínea local, no aumento da permeabilidade

capilar e na concentração e ativação das células imunológicas inatas. No entanto, substâncias imuno-ativas liberadas no local da lesão podem iniciar uma reação imunológica sistêmica que pode influenciar a ativação de células gliais, que tem grande importância na nocicepção (VALLEJO et al., 2010).

A ativação da microglia e dos astrócitos após uma lesão nervosa periférica envolve a liberação, pelos neurônios, de neurotransmissores como a proteína relacionada geneticamente à calcitonina (CGRP), substância P, glutamato, o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina e trifosfato de adenosina (ATP). Além disso, a ativação da microglia é capaz de promover a secreção de vários peptídeos sinalizadores, como citocinas, fatores neurotróficos e quimiocinas, que levam à ativação dos astrócitos vizinhos. Tal ativação parece ter um importante papel na gênese da dor neuropática (MIGUEL et al., 2012).

Apesar de a microglia se distribuir de forma homogênea no sistema nervoso central, somente as células gliais localizadas na medula espinhal são ativadas após uma lesão nervosa periférica (VALLEJO et al., 2010). A ativação dessas células produz alterações em marcadores de superfície e em proteínas de membrana (SMITH, 2018).

### **3.2.2. Estresse oxidativo**

As reações metabólicas que utilizam oxigênio produzem radicais livres, os quais são removidos por moléculas antioxidantes endógenas. Quando ocorre um desequilíbrio na proporção de agentes pró e antioxidantes ocasionando dano a macromoléculas importantes para homeostase celular, esse processo é chamado de estresse oxidativo (BAINS; HALLS, 2012).

O estresse oxidativo surge quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante. Como resultado, certas biomoléculas são oxidadas, levando a modificações estruturais e funcionais. Os danos oxidativos são, em sua maior parte, induzidos por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) abrangem coletivamente os radicais de oxigênio, tais como superóxido, hidroxil, peróxil, alcóxil e os derivados não-radicaais potencialmente oxidantes, como exemplo, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (VISAVADIYA et al., 2012).

Esse processo de produção de oxidantes ocorre principalmente nas mitocôndrias, com a ajuda de enzimas da citocromo oxidase mitocondrial, como o citocromo P450. Os produtos desses processos provavelmente contribuem para a progressão da lesão nervosa e a patogênese da neuropatia por lesão constrictiva crônica (LIAKOPOULOS et al., 2017).

A produção de  $H_2O_2$  em excesso é um indicador de estresse oxidativo mitocondrial. Para compensar a formação de EROs através da cadeia de transporte de elétrons, a mitocôndria apresenta um sistema antioxidante composto por Superóxido Dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e vitaminas C e E (CHAN, 1996 e 2001).

A CAT é uma hemoproteína amplamente distribuída nos peroxissomas e membranas mitocondriais do organismo, encontradas principalmente em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Ela catalisa a degradação de  $H_2O_2$ , cujo maior perigo está em sua interação com metais formando o radical  $OH\cdot$  (NISHIKAWA et al., 2009).

Os neurônios da medula espinal possuem óxido nítrico sintase (NOS) e o aumento bilateral da atividade desta enzima após estímulo nocivo sugere participação do óxido nítrico (NO) no processamento da informação nociceptiva. Essa molécula, por sua vez, parece participar também de mecanismos antinociceptivos, porém, um excesso na sua produção promove dano tecidual pela alta produção de radicais livres (LING; KUO, 2018).

Um estudo sugere que o aumento dos disparos dos nociceptores após dor neuropática e a consequente ativação de células na medula espinal ocasiona, nesta região do SNC, acréscimos na respiração mitocondrial e influxo de cálcio no meio intracelular, com consequente aumento na produção de ERO e NO (CURY et al., 2011).

### **3.3. Modelo experimental de dor neuropática – Lesão Constrictiva Crônica (LCC)**

Com a finalidade de estudar os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento da dor neuropática e possibilitar a investigação de possíveis estratégias terapêuticas para o tratamento desta, diferentes métodos são empregados em modelos animais.

Os modelos experimentais de dor neuropática induzem alterações comportamentais nos roedores, como hiperalgesia, alodinia e dor espontânea, similares aos sintomas observados durante a dor neuropática em humanos. Estudos que utilizam estas ferramentas e descrevem os diversos processos fisiopatológicos periféricos e centrais que ocorrem após a lesão do nervo podem servir como base para delinear os mecanismos da dor neuropática e o desenvolvimento de novos tratamentos (MORAES, 2010).

Estes modelos podem ser divididos em: 1) Modelo de dor central, os quais consistem em lesão da medula espinhal (KIM, CHUNG, 1992), podendo ser provocada por agentes fotoquímicos, contusão ou agentes citotóxicos; 2) Modelo de neuropatia periférica induzida por doença, acarretada por *Diabetes Mellitus* ou neuralgia pós-herpética (STRAUS et al., 1988); ou 3) Modelos de lesão de nervos espinais, como neuroma, gerados por lesão por constrição crônica (LCC) (BENNETT; XIE, 1988), por ligadura de nervos espinais (BASBAUM, 1974), ligadura parcial do nervo ciático (SELTZER et al., 1990) secção de nervos (rizotomia) (BACKONJA, 2003; WANG; WANG, 2003), dentre outros. Destes, a lesão por constrição crônica do nervo ciático, desenvolvido por Bennett e Xie (1988), é provavelmente o modelo mais utilizado para o estudo da dor neuropática, devido às suas semelhanças com as respostas comportamentais humanas.

Neste modelo, os animais desenvolvem respostas comportamentais, sendo estas sugestivas de dor espontânea, tais como: autotomia, proteção do membro afetado, lambertura excessiva e deslocamento do peso corporal para o membro sadio. Além disso, quando estimulados, os animais passam a apresentar hiperalgesia mecânica e térmica, bem como alodinia mecânica e ao frio (BENNETT; XIE, 1988).

A lesão do nervo periférico produz dor neuropática persistente manifestada como hiperalgesia e alodinia, que se assemelha às condições dolorosas em pacientes que sofrem de dor neuropática induzida por trauma (KOMIRISHETTY et al., 2016). Além disso, estudos indicam que a LCC também afeta a estrutura e a função dos neurônios na medula espinhal através das vias neuroinflamatórias e do estresse oxidativo, contribuindo assim para os mecanismos centrais da hiperalgesia (WEI et al., 2013; LI et al., 2014).

### 3.4 Maropitant

O citrato de maropitant é um antagonista seletivo dos receptores da neurocinina-1 (NK1) expressos em neurônios dorsais da medula espinhal, que bloqueia a ação da substância P no sistema nervoso central e periférico. É amplamente utilizado na Medicina Veterinária por ser comprovadamente eficaz e seguro na prevenção da êmese (SWALLOW et al., 2017).

Diversos neurotransmissores e seus receptores correspondentes estão envolvidos na retransmissão dos sinais de dor no corno dorsal da medula espinhal e cérebro. A substância P atua como um neurotransmissor e como um neuromodulador associado ao processo inflamatório e à dor (LIN et al., 2012). Acredita-se que a ativação do receptor NK1 potencialize a ação excitatória do NMDA e ativação das células da glia e mantenha a excitabilidade neuronal no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999).

Pesquisas tem sido realizada para verificar a atividade analgésica de medicamentos que antagonize o receptor NK1, levando em conta que ele está envolvido com a fisiopatologia da dor. Estudos sugerem potencial analgésico em cães que foram anestesiados e receberam infusão contínua de maropitant, sendo capaz de reduzir em 16% a CAM do sevoflurano (AVILLAR et al., 2012). Achados clínicos semelhantes foram observados por Niyom et al. (2013), com redução de 15% do requerimento de sevoflurano quando gatas foram submetidas ao pinçamento do pedículo ovariano, e promoveu um maior conforto pós-operatório com redução na quantidade de resgates analgésicos (CORREA et al., 2019).

Além disso, estudos anteriores realizados em ratos utilizando o maropitant mostraram eficácia no tratamento de dermatite ulcerativa (WILLIAMS-FRITZE et al., 2011), ação anti-inflamatória em modelo de pancreatite induzida (TSUKAMOTO et al., 2018) e redução da CAM associada com amitriptilina com minociclina (AGUADO et al., 2015). Esses resultados sugerem uma ação analgésica do medicamento na dor aguda, no entanto, ainda são necessários mais estudos que demonstrem sua eficiência na modulação da dor crônica.

## **4. CAPÍTULO II**

### **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO MAROPITANT, ANTAGONISTA DE RECEPTOR NK1, NO TRATAMENTO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR LESÃO CONSTRICTIVA CRÔNICA EM RATOS**

## 4.1. INTRODUÇÃO

A dor neuropática é uma condição crônica debilitante que pode se desenvolver devido a danos no sistema somatossensorial central ou periférico resultando em respostas nociceptivas anormais (AUSTIN, MOALEM-TAYLOR, 2012; COLLOCA et al., 2017).

A substância P (SP) é um neuropeptídeo que pertence à família das taquicininas, responsável por regular diversas funções biológicas por meio da ligação ao seu receptor altamente específico neuroquinina-1 (NK1) (GARCIA-RECIO, GASCÓN, 2015). Os receptores NK1 estão presentes nas vias de dor no sistema nervoso periférico e central e quando associados a substância P, são responsáveis por importantes funções homeostáticas como inflamação, emese, controle da pressão arterial e estímulos dolorosos (BOSCAN et al., 2011; NIYOM et al., 2013; BARBARESI et al., 2014; MASHAGHI et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que uma lesão no sistema nervoso periférico desencadeada por um trauma promove um quadro de inflamação neurogênica, e que a constante estimulação das vias nociceptivas leva a uma intensa liberação dos neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P, ATP) na medula espinal, que são responsáveis também pela ativação microglial (GRUBB, 2010). Nessa perspectiva, acredita-se que a inibição da ação da SP através do uso de um antagonista NK1 seja benéfica para modular o processo neuroinflamatório em dores crônicas (CORRIGAN et al., 2015).

Trabalhos prévios demonstram que, após a lesão de nervos periféricos ocorre o desencadeamento do quadro de estresse oxidativo a nível celular, além de uma intensa proliferação e ativação microglial, bem como aumento da expressão de proteínas de superfície consideradas marcadores de ativação dessas células, como IBA-1. Além disso, diversas evidências suportam que a ativação microglial é um importante processo patológico e está relacionada com a patogênese da dor neuropática (CALVO et al., 2012; GRACE, 2014; JI et al., 2016).

O maropitant é um antagonista seletivo do receptor NK1 amplamente utilizado como antiemético em cães (PUENTE-REDONDO et al. 2007a; BENCHAOUI et al. 2007) e em gatos (TREPANIER, 2010; MARTIN-FLORES et al., 2016) e estudos



demonstraram que a sua utilização no tratamento da dor aguda foi eficiente nessas espécies (MARQUEZ et al., 2015; CORRÊA et al., 2019).

Estudos já verificaram a segurança e a farmacocinética da administração subcutânea e intraperitoneal de maropitant em ratos, bem como sua ação anti-inflamatória (TSUKAMOTO et al., 2018; WILLIAMS-FRITZE et al., 2011).

Acredita-se que o maropitant, ao atuar em receptor NK1 bloqueando a ação da substância P, possa fornecer efeito analgésico e promover inibição da ativação microglial no processo crônico. Além disso, que sua ligação com receptor possa estar envolvida na manutenção da dor neuropática, justificando o desenvolvimento e administração de antagonistas para o seu manejo (CORRIGAN et al., 2015).

O objetivo desse estudo foi determinar uma curva dose resposta, bem como o período hábil de efeito do maropitant sobre o limiar nociceptivo mecânico e verificar a participação da catalase e da ativação microglial no tratamento da neuropatia periférica.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Animais**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil, protocolo 027/2015.

Foram utilizados 84 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com aproximadamente 200 g de peso e 45 dias de vida, provenientes da Estação de Recria e Manutenção de Animais de Laboratório da UESC. Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação do Hospital Veterinário da UESC em caixas de polipropileno forradas com maravalha em ambiente com temperatura controlada (22° C) e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), recebendo ração comercial (Nuvilab®) e água ad libitum.

Os animais foram submetidos a um período de adaptação experimental durante uma semana com o intuito de equalizar todas as condições ambientais e alimentares de modo a não interferir nos resultados da pesquisa. Após o período de adaptação pré-experimental, os animais passaram por uma avaliação basal do limiar

nociceptivo mecânico com o analgesímetro digital (EFF-301, Insight Equipamentos).

#### **4.2.2 Lesão Constrictiva Crônica do nervo ciático (LCC)**

Para indução de dor neuropática, adotou-se o modelo de lesão constrictiva crônica (LCC) do nervo ciático descrito por Bennet e Xie (1988). Para isso, os animais foram submetidos a anestesia geral inalatória com sevofluorano (Sevofluorano 1 mg/mL, Cristália), em concentração inicial de 4 V% para indução anestésica, seguida de 2,5 V% durante a manutenção anestésica.

Todos os animais receberam cefalotina sódica (Ceflen®, Agila Especialidades Farmacêuticas Ltda, Brasil) na dose de 60 mg/kg/SC como antibioticoterapia profilática. Após a tricotomia da região glútea do membro posterior direito e antisepsia com iodopovidona, foi feita uma incisão na região, sendo a musculatura entre o íliaco e o músculo glúteo divulsionada e o nervo ciático exposto. Três ligaduras no nervo ciático foram feitas com fio de poliamida (5-0) e, em seguida, a musculatura foi aproximada com sutura com fio de poliamida (4-0).

#### **4.2.3 Limiar Nociceptivo Mecânico: analgesímetro digital**

A avaliação do LNM na pata dos ratos foi feita pelo método de pressão crescente previamente descrita por Cunha et al. (2004) no período de adaptação experimental para determinação do limiar basal dos animais e após a LCC. O analgesímetro digital é um aparelho composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (0,1 - 1000g). Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips10 µL (T-300, Axygen), que estimula diretamente a pata do animal. O teste consistiu do experimentador aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provocou uma resposta de flexão característica. A pressão registrada no aparelho no momento do reflexo do animal foi considerada como o LNM. Durante as avaliações, os animais foram mantidos em caixas de MDF independentes, com assoalho formado por uma rede constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro.

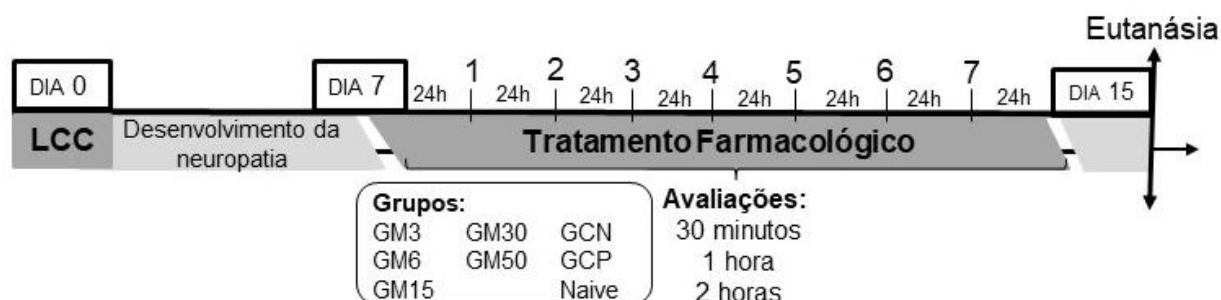
Essas caixas foram mantidas a cerca de 75 cm da superfície de uma bancada,

de modo que a estimulação da pata traseira dos animais fosse realizada. Antes de iniciar a avaliação, os animais permaneceram nessas caixas por trinta minutos para a adaptação. A sensibilidade mecânica foi obtida pela média de pelo menos três medidas de cada pata, realizadas com intervalos de aproximadamente 5 minutos.

#### 4.2.4 Procedimentos experimentais

##### 4.2.4.1 Ensaio 1 - Determinação da curva dose-resposta

Após a mensuração dos valores basais referentes a estímulos mecânicos, seguida do procedimento cirúrgico, o desenvolvimento da neuropatia foi avaliado após sete dias com o analgesímetro digital. Após confirmação da neuropatia estabelecida,



**Figura 1** - Esquema geral do modelo experimental e determinação da curva dose-resposta. através da redução do limiar nociceptivo mecânico, o tratamento era iniciado (dia 1 da neuropatia) (Figura 1).

Os tratamentos foram realizados a cada 24 horas pela via intraperitoneal (IP) durante 7 dias consecutivos. A avaliação do limiar nociceptivo mecânico foi realizada com trinta minutos, uma hora e duas horas após aplicação do tratamento.

Os animais foram divididos em oito grupos (n=7): GM3 – LCC e maropitant 3 mg/kg/24q; GM6 - LCC e maropitant 6 mg/kg/24q; GM15 – LCC e maropitant 15 mg/kg/24q; GM30 – LCC e maropitant 30 mg/kg/24q; GM50 – LCC e maropitant 50 mg/kg/24q, Grupo Controle Positivo (GCP) – LCC e 3 ml/kg/24q de solução salina (NaCl 0,9%), Grupo Controle Negativo (GCN) - submetidos a exposição do nervo sem

ligaduras no mesmo e 3 ml/kg/24q de solução salina (NaCl 0,9%), e o Grupo Naive - não foram submetidos à LCC e/ou tratamentos.

Todos os animais foram eutanasiados oito dias após o início do tratamento com sobredose de propofol (Propotil® 1%, Bio Chimico®) na sobredose de 150 mg/kg.

#### 4.2.4.2 Ensaio 2 - Avaliação do efeito analgésico e tempo de ação do Maropitant

Após análise dos resultados da curva dose-resposta e definição das doses mais efetivas, foi realizado a avaliação do tempo de ação e período hábil da medicação. Os tratamentos também foram realizados a cada 24 horas pela via IP durante 7 dias consecutivos e a avaliação do limiar nociceptivo mecânico foi realizada durante 12 horas após aplicação do tratamento iniciando com trinta minutos, uma hora e continuando com intervalos de 2 horas (Figura 2).



**Figura 2-** Esquema da segunda etapa do experimento.

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=7): GM15 – LCC e maropitant 15 mg/kg/24q; GM30 – LCC e maropitant 30 mg/kg/24q; Grupo Controle Positivo (GCP) – LCC e 3 ml/kg/24q de solução salina (NaCl 0,9%) e o Grupo Naive - não foram submetidos à LCC e/ou tratamentos. A eutanásia ocorreu oito dias após o início do tratamento da mesma maneira que no ensaio 1.

#### 4.2.4.3 Ensaio 3 – Avaliação da ativação glial e atividade da catalase após tratamento com Maropitant

Após eutanásia dos animais utilizados no ensaio 1 e 2, foi coletada 9 mm da medula espinal da região lombosacral de todos os animais, através do método asséptico de hidropropulsão. Esse material foi dividido em dois cortes de 4,5 mm onde

metade foi armazenado no -80°C para atividade enzimática e a outra parte para realização da técnica de imunistoquímica.

### Imunistoquímica

A medula espinal coletada (4,5 mm) foi armazenada em paraformoldeído 4% em geladeira durante 24 horas, seguido de solução de álcool 70% durante uma semana, e após esse período, o material foi processado pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Posteriormente foram obtidos cortes histológicos de 4 micrómetros de espessura com auxílio de micrótomo, os quais foram montados em lâminas gelatinizadas previamente.

As secções histológicas da medula foram submetidas à técnica imunistoquímica utilizando os anticorpos anti-IBA-1 (Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1) (sc-32725; Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA; 1:300) e anti-CAT (sc-271803; Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA; 1:300).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) (ANEXO I) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C utilizando solução de ácido cítrico (P.M. 192,13) com pH 6,0. Seguido de 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp.®, Fremont, CA. USA).

As lâminas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário, a incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos e o bloqueio com estreptavidina peroxidase por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA) e por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS (SILVA, 2014).

Foi realizada uma avaliação quantitativa da expressão imunistoquímica de IBA-1 e CAT na medula em seis animais/grupo e determinada a área de imunomarcção utilizando o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Imagens da medula espinal foram fotografadas em microscópio (Leica DM 2500) utilizando a câmera digital (Leica DFC 295) (Leica Microsystems, Germany). Para avaliar o efeito do maropitant sobre o mecanismo de ativação glial, foi feita a análise morfométrica da imunocoloração para IBA-1, bem

como a contagem de células positivas para IBA-1. Para a análise, “color deconvolution” e “thresholding” das imagens foram realizadas. Os dados foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em pixels (SILVA, 2014).

#### Preparo do extrato bruto da amostra

As amostras que haviam sido armazenadas na  $-80^{\circ}\text{C}$  após o experimento foram processadas adicionando tampão fosfato de potássio TFK (50 mM, pH 7,0). Sonicadas (Cole-Parmer Ultrasonic Processador®) sob amplitude de 70% com 8 pulsos de 5 segundos (ON) e intervalos de 10 segundos (OFF) no total 40 segundos com amostras sempre mantidas no gelo. Foram centrifugadas (Eppendorf®, Centrifuge 5417R) a 13400 rpm sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ) por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado novamente à  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior.

#### Quantificação de proteína tecidual pelo método de Bradford

A dosagem de proteína foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado na reação de proteína com Azul G Brilhante. Foi utilizada uma placa de Elisa colocando 150  $\mu\text{L}$  de BSA 0,1 mg/mL, 50  $\mu\text{L}$  de TFK (50 mM, pH 7,0) e 40  $\mu\text{L}$  de TFK com 10  $\mu\text{L}$  da amostra (1:20), sempre realizada em triplicata, seguido de 200  $\mu\text{L}$  de Coomassie Blue G250 (Sigma B-0770). Após incubação por 15 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Paradigm - Multi-Mode Detection Platform) no comprimento de onda de 595nm. A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de BSA a 0,1 mg/mL.

#### Avaliação da catalase

A dosagem da atividade da CAT foi realizada de acordo com uma adaptação do método proposto por Aebi (1984), a partir do preparo do extrato bruto das amostras da medula espinal armazenadas ao  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1800  $\mu\text{L}$  de solução TFK (50 mM, pH 7,0), calibrando o branco e adicionado 120  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30mM. A análise cinética foi iniciada após a adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e após 45 segundos de leitura foi adicionado 9  $\mu\text{L}$  da amostra e a taxa de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi medida pelo espectrofotômetro (Thermo Scientific®,

Evolution 60) a 240nm durante 150 segundos, em intervalos de 15 segundos. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína.

#### **4.2.6 Análise estatística**

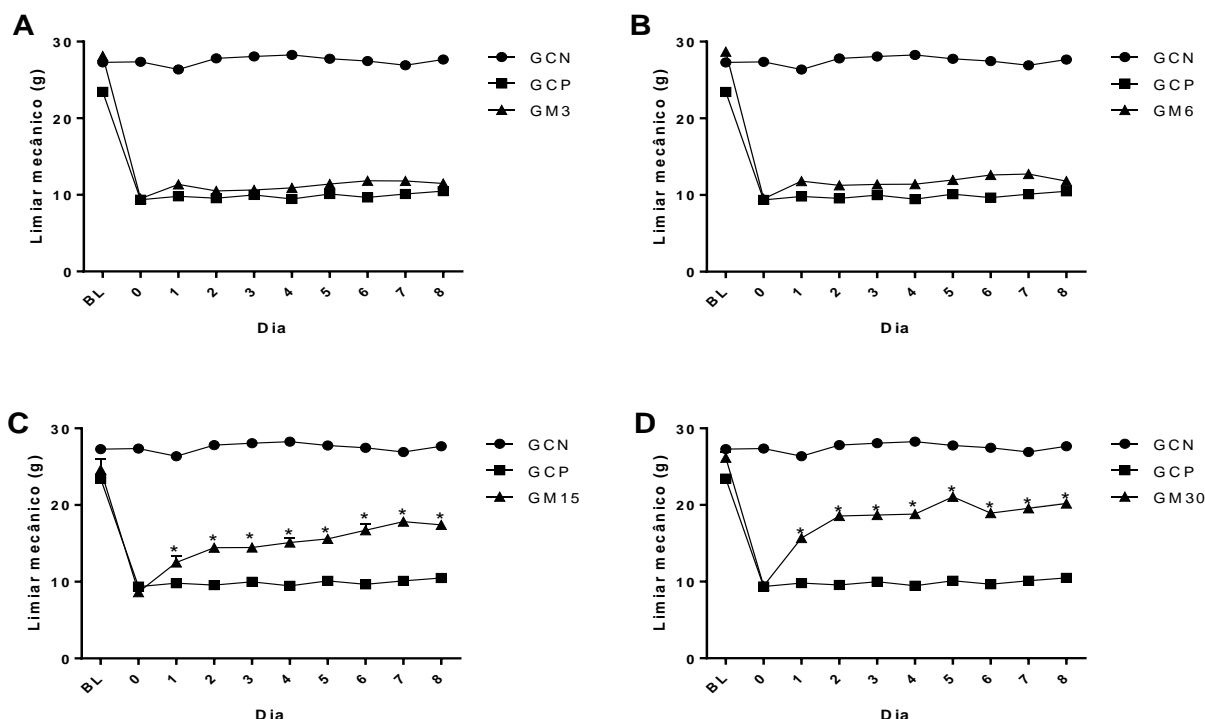
A análise estatística foi realizada utilizando o Graph Pad Prism Software versão 5.01. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados do limiar nociceptivo mecânico foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni e para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Os dados da imunistoquímica e da atividade enzimática foram analisados verificando a normalidade dos resíduos pelo teste *Bartlett's* e os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [ $x = \text{Log}(y+1)$ ]. Os dados, então, foram submetidos à análise paramétrica. Os dados que não seguiram distribuição normal foram analisados através do teste de Kruskal Wallis. A  $DE_{50}$  das doses utilizadas no experimento foi calculada a partir de uma curva dose-resposta usando regressão não linear. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Ensaio 1 - Determinação da curva dose-resposta

A LCC resultou no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, demonstrada pela a diminuição do limiar nociceptivo mecânico após sete dias do procedimento cirúrgico em todos os animais, exceto os que tiveram somente exposição do nervo (GCN). As doses de 3 e 6 mg/kg/24q de maropitant não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) comparada ao GCP durante os três momentos iniciais de avaliação durante os dias do período experimental (Figuras 3A, 3B, 4A e 4B). Na avaliação após 30 minutos, a dose de 15 mg/kg/24q não apresentou diferença significativa comparada ao grupo controle positivo ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a dose de 30 mg/kg/24q foi significativamente diferente do controle positivo ( $p = 0,018$ ).

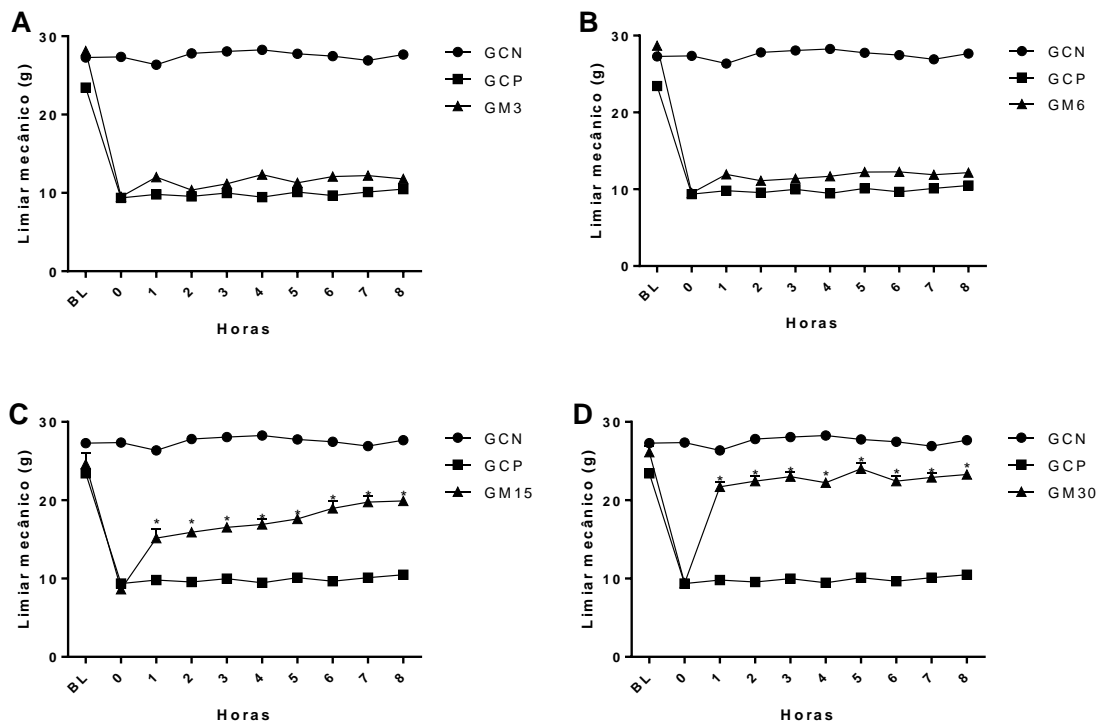
Após uma hora de aplicação, o grupo maropitant 15 e 30 mg/kg/24q apresentaram diferença significativa comparados ao GCP ( $p = 0,027$  e  $0,001$ , respectivamente), porém, as doses de 15 e 30 mg/kg/24q não foram diferentes entre si nesse momento de avaliação ( $p > 0,05$ ) (Figuras 3C e 3D).



**Figura 3** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital após uma hora de aplicação do tratamento. (A) LCC e Maropitant 3 mg/kg (GM3); (B) LCC e Maropitant 6 mg/kg (GM6); (C) LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e (D) LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN = grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP.

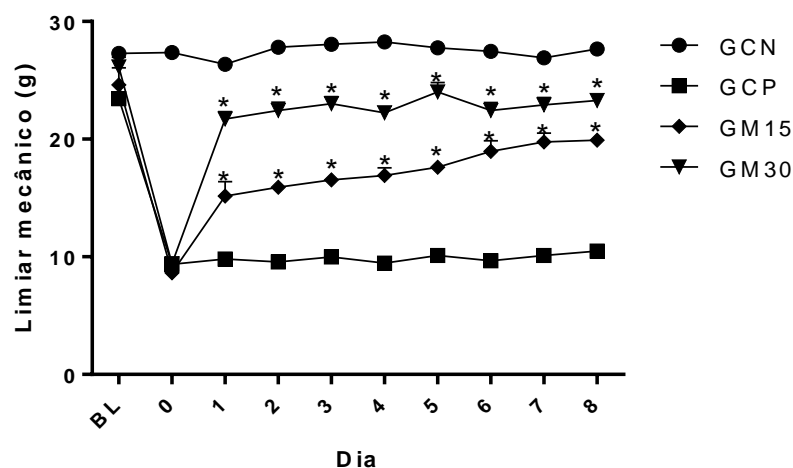


O aumento do limiar nociceptivo mecânico após neuropatia estabelecida foi ainda mais evidente na avaliação após duas horas de administração do tratamento com o antagonista de receptor NK1. O Grupo maropitant 15 e 30 mg/kg/24q se mantiveram diferentes do GCP ( $p = 0,004$ ;  $p = 0,0001$ , respectivamente) (Figuras 4C e 4D).



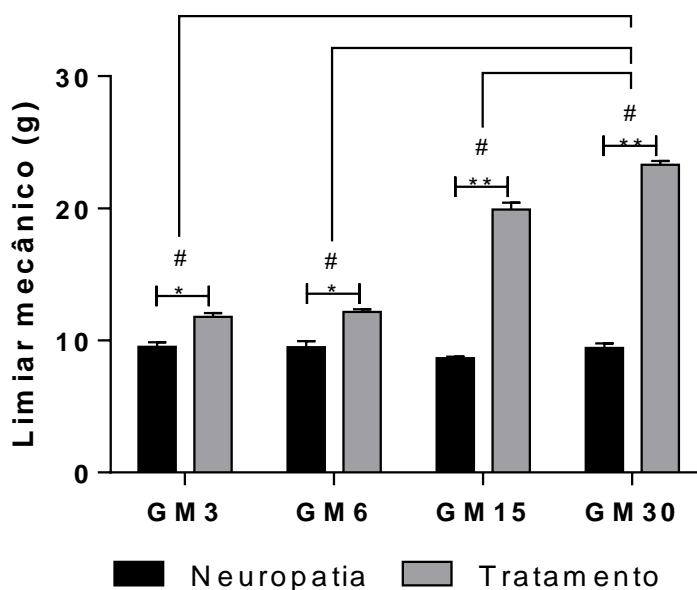
**Figura 4 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico com analgesímetro digital após duas horas de aplicação do tratamento.** (A) LCC e Maropitant 3 mg/kg (GM3); (B) LCC e Maropitant 6 mg/kg (GM6); (C) LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e (D) LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP

As doses de 15 e 30 mg/kg/24q foram capazes de aumentar o limiar nociceptivo mecânico (Figura 5), entretanto, com duas horas de aplicação elas diferiram entre si, sendo que a dose de 30 mg/kg/24q superior à dose de 15 mg/kg/24q ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico através do analgesímetro digital após duas horas de aplicação do tratamento. LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM \*  $p < 0,05$  comparado ao GCP.

O limiar nociceptivo mecânico obtido ao final do tratamento foi (média  $\pm$  erro padrão médio)  $11,79 \pm 0,28$ ;  $12,17 \pm 0,18$ ;  $19,91 \pm 0,52$  e  $23,28 \pm 0,29$  nos grupos maropitant 3, 6, 15 e 30 mg, respectivamente (Figura 6). A  $DE_{50}$  (dose efetiva capaz de ter efeito em 50% da população) foi de 4,1 mg/kg. O aumento do LNM em relação ao basal observado foi de 23,96; 28,28; 130,33 e 145,83% nas doses de 3, 6, 15 e 30 mg de maropitant, respectivamente, em relação a neuropatia.



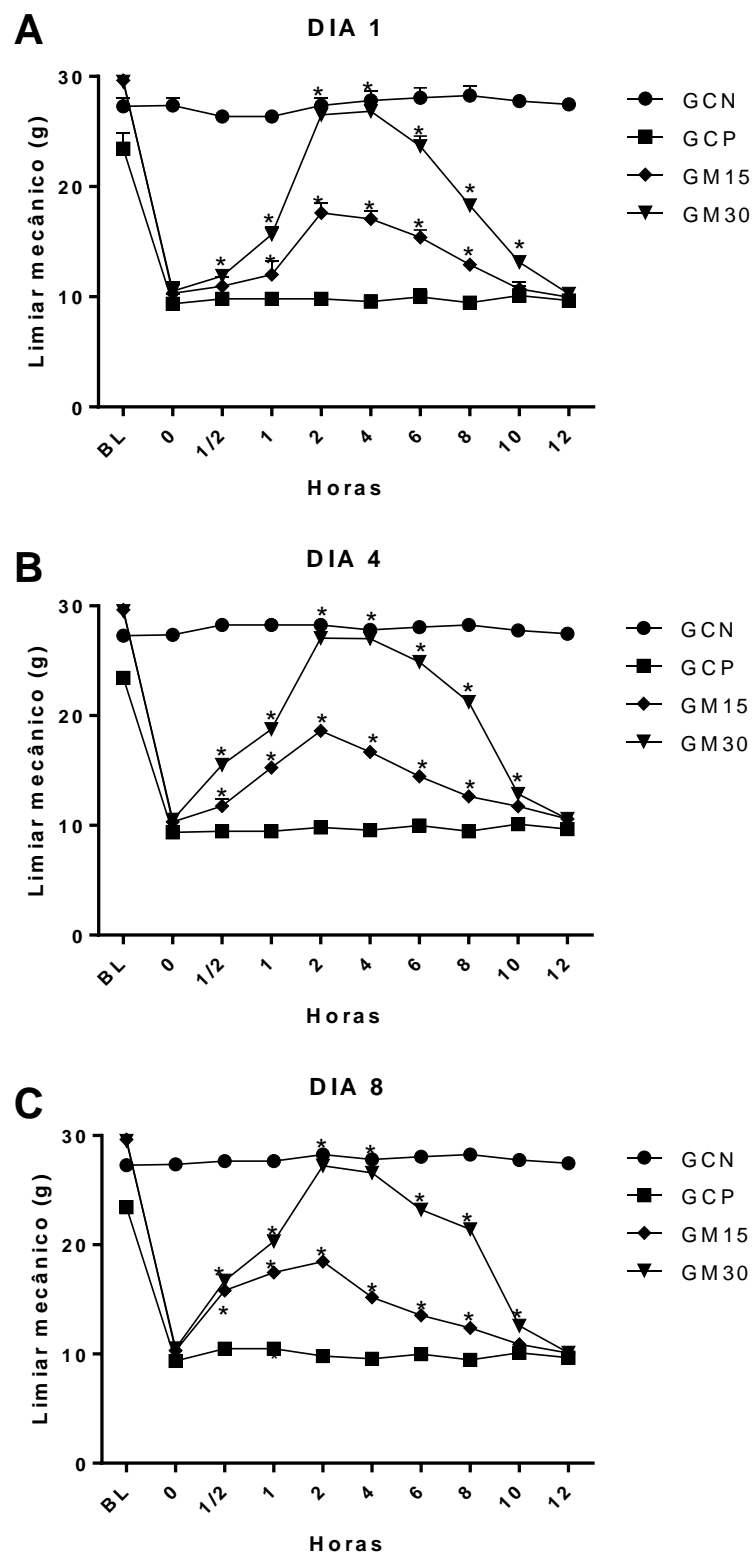
**Figura 6**- Eficácia das doses do Maropitant. Média e erro padrão médio do LNM dos ratos com neuropatia estabelecida e ao final do tratamento nas diferentes doses ( $n=7$ ; \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,0001$ , comparado entre os grupos).

A dose de 50 mg/kg/24q promoveu letalidade em 100% dos animais tratados (7 animais). Em média quinze minutos após a primeira aplicação, os animais começaram a apresentar prostração, depressão respiratória, tremores generalizados, seguidos de parada cardíaca.

#### **4.3.2 Ensaio 2 - Avaliação do efeito analgésico e tempo de ação do Maropitant**

Quanto ao efeito analgésico e tempo de ação do maropitant, verificou-se que já a partir de 30 minutos de aplicação, o GM15 apresentou aumento significativo do LNM comparado ao GCP ( $P < 0,0001$ ), com duração de 8 horas após aplicação, durante oito dias de tratamento e avaliação.

De forma semelhante, houve um aumento significativo do LNM no GM30 ( $P < 0,0001$ ) comparado ao GCP aos 30 minutos, mas apresentando duração de 10 horas consecutivas durante os oito dias de avaliação. Quando foram comparados os dois grupos tratados com maropitant, observou-se uma diferença significativa entre eles no decorrer das 10 horas de avaliação após tratamento. Dessa forma, o tratamento de escolha para dor neuropática em ratos, seria maropitant na dose 30 mg, já que o mesmo apresentou maior capacidade de aumentar o LNM nos animais lesionados e por promover o efeito antinociceptivo mais duradouro (Figura 7 e Tabela 1).



**Figura 7** - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico através do analgesímetro digital durante 12 horas após aplicação do tratamento. (A) Dia 1; (B) Dia 4; (C) Dia 8. LCC e Maropitant 15 mg/kg (GM15) e LCC e Maropitant 30 mg/kg (GM30). BL = basal; 0 = dia 1 da neuropatia; GCP = grupo controle positivo; GCN= grupo controle negativo. Valores representam média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao GCP.

**Tabela 1** – Avaliação do limiar nociceptivo mecânico durante 12 horas após tratamento com maropitant na dose de 15 e 30 mg/kg. Dados representam Média ± Erro padrão médio.

GRUPOS	AVALIAÇÕES (HORAS)	DIA 1	DIA 4	DIA 8
<b>GCP</b>	0,5	9,80 ± 0,23 <sup>A</sup>	9,46 ± 0,22 <sup>A</sup>	10,48 ± 0,08 <sup>A</sup>
	1	9,80 ± 0,23 <sup>A</sup>	9,46 ± 0,22 <sup>A</sup>	10,48 ± 0,08 <sup>A</sup>
	2	9,80 ± 0,22 <sup>A</sup>	9,8 ± 0,22 <sup>A</sup>	9,8 ± 0,23 <sup>A</sup>
	4	9,56 ± 0,24 <sup>A</sup>	9,56 ± 0,25 <sup>A</sup>	9,56 ± 0,24 <sup>A</sup>
	6	10,00 ± 0,30 <sup>A</sup>	10 ± 0,30 <sup>A</sup>	10 ± 0,30 <sup>A</sup>
	8	9,46 ± 0,21 <sup>A</sup>	9,46 ± 0,22 <sup>A</sup>	9,46 ± 0,21 <sup>A</sup>
	10	10,11 ± 0,34 <sup>A</sup>	10,11 ± 0,34 <sup>A</sup>	10,11 ± 0,34 <sup>A</sup>
	12	9,66 ± 0,14 <sup>A</sup>	9,67 ± 0,14 <sup>A</sup>	9,66 ± 0,14 <sup>A</sup>
<b>GM15</b>	0,5	10,96 ± 0,29 <sup>B</sup>	11,76 ± 0,61 <sup>B</sup>	15,8 ± 0,31 <sup>B</sup>
	1	12,50 ± ,63 <sup>B</sup>	15,27 ± 0,46 <sup>B</sup>	17,45 ± 0,36 <sup>B</sup>
	2	17,61 ± 0,33 <sup>B</sup>	18,62 ± 0,10 <sup>B</sup>	18,46 ± 0,03 <sup>B</sup>
	4	17,05 ± 0,25 <sup>B</sup>	16,68 ± 0,15 <sup>B</sup>	15,18 ± 0,11 <sup>B</sup>
	6	15,39 ± 0,24 <sup>B</sup>	14,46 ± 0,12 <sup>B</sup>	13,54 ± 0,23 <sup>B</sup>
	8	12,92 ± 0,12 <sup>B</sup>	12,65 ± 0,12 <sup>B</sup>	12,38 ± 0,10 <sup>B</sup>
	10	10,70 ± 0,22 <sup>CA</sup>	11,73 ± 0,16 <sup>CA</sup>	10,89 ± 0,05 <sup>CA</sup>
	12	9,77 ± 0,15 <sup>CA</sup>	10,59 ± 0,15 <sup>CA</sup>	10,07 ± 0,09 <sup>CA</sup>
<b>GM30</b>	0,5	11,88 ± 0,15 <sup>C</sup>	15,51 ± 0,32 <sup>C</sup>	16,7 ± 0,22 <sup>C</sup>
	1	15,66 ± 0,23 <sup>C</sup>	18,76 ± 0,09 <sup>C</sup>	20,3 ± 0,27 <sup>C</sup>
	2	26,51 ± 0,33 <sup>C</sup>	27,06 ± 0,23 <sup>C</sup>	27,23 ± 0,09 <sup>C</sup>
	4	26,83 ± 0,33 <sup>C</sup>	27,00 ± 0,13 <sup>C</sup>	26,58 ± 0,09 <sup>C</sup>
	6	23,67 ± 0,33 <sup>C</sup>	24,9 0,27 <sup>C</sup>	23,20 ± 0,1 <sup>C</sup>
	8	18,29 ± 0,17 <sup>C</sup>	21,22 ± 0,17 <sup>C</sup>	21,41 ± 0,10 <sup>C</sup>
	10	13,15 ± 0,17 <sup>C</sup>	12,87 ± 0,09 <sup>C</sup>	12,59 ± 0,11 <sup>C</sup>
	12	10,26 ± 0,14 <sup>AB</sup>	10,58 ± 0,17 <sup>AB</sup>	10,11 ± 0,06 <sup>AB</sup>

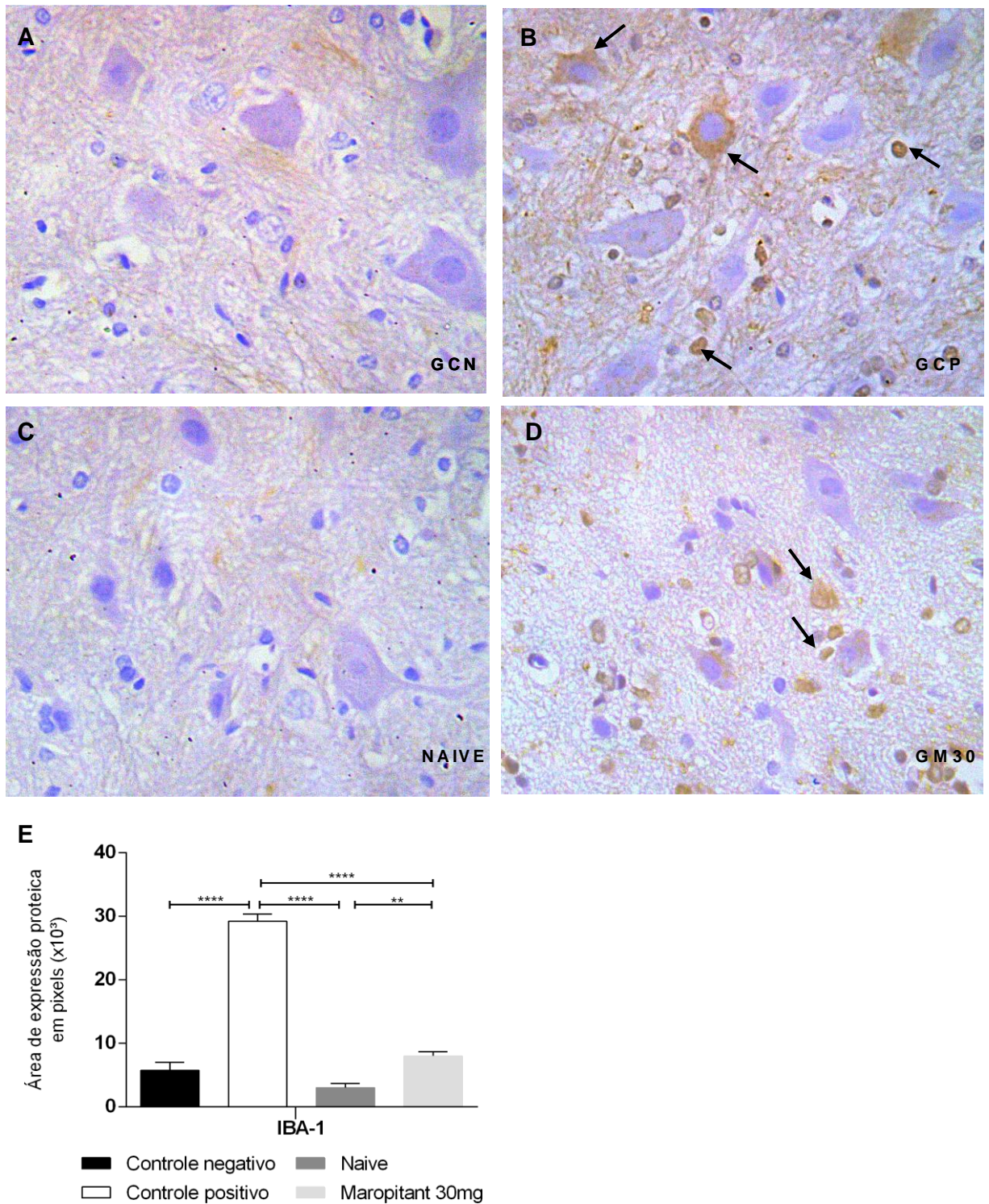
GCP – Grupo Controle Negativo; GM15 – Grupo Maropitant 15 mg/kg; GM30 – Grupo Maropitant 30 mg/kg. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

### **4.3.3 Ensaio 3 - Avaliação da ativação glial e catalase após tratamento com Maropitant**

A marcação de células positivas para IBA-1 estava presente em todos os grupos experimentais (Figura 8 A - D), visto que as células microgлияis estão presentes em condições fisiológicas normais no organismo animal, podendo ter sua ativação exacerbada em processos patológicos.

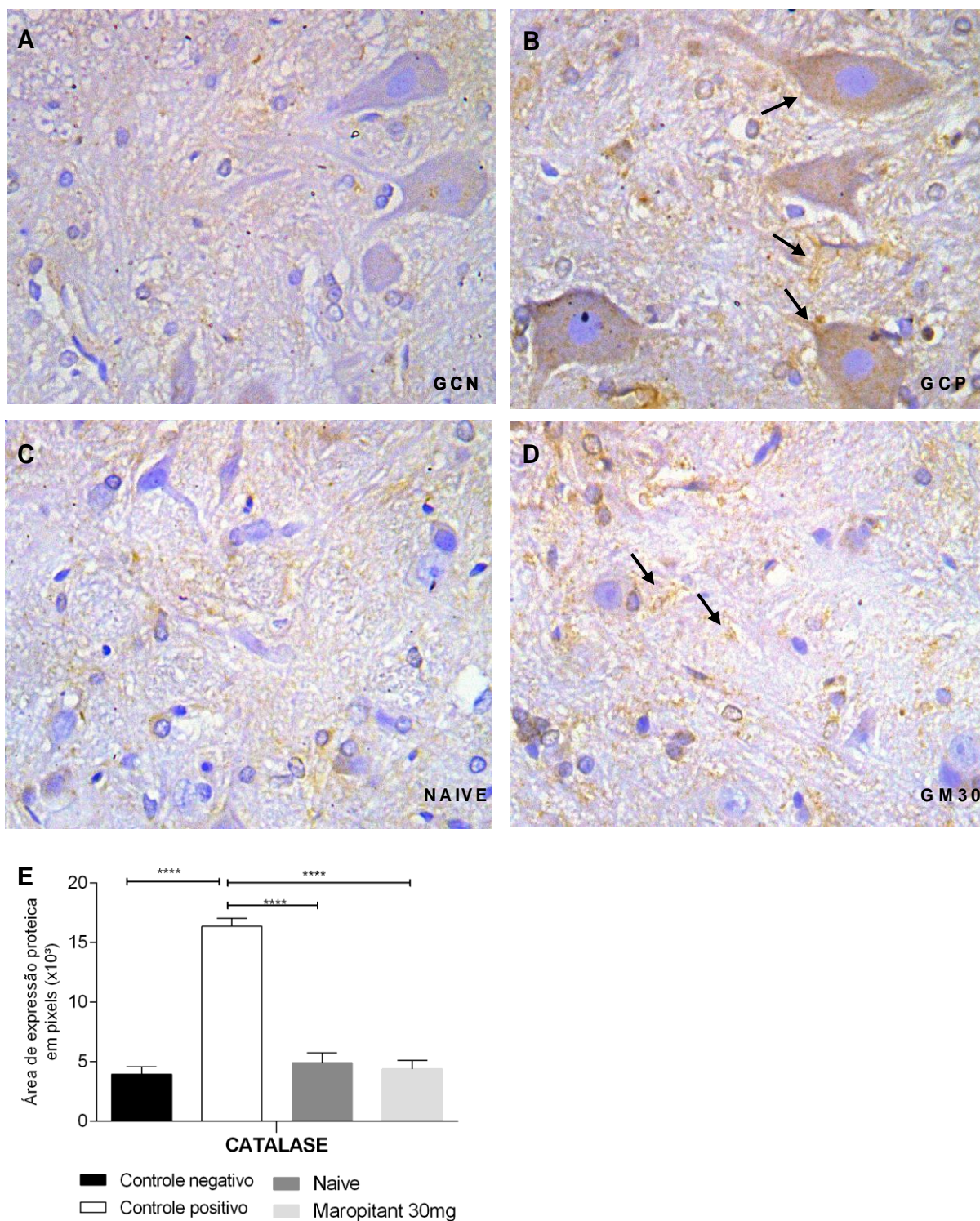
Foi observado um aumento significativo ( $p=0,0001$ ) de células imunopositivas para IBA-1 na medula dos animais do GCP (Figura 8 B), comparado ao restante dos grupos, indicando maior ativação microglial nos animais com neuropatia estabelecida. Além disso, nesse estudo foi demonstrada uma redução significativa de células imunopositivas de IBA-1 no grupo que recebeu tratamento com maropitant na dose de 30 mg (Figura 7 D), apresentando diferença significativa com o GCP e o Naive ( $p = 0,037$ ).

Em relação à catalase, com a técnica de imunistoquímica observou-se aumento da atividade enzimática na medula espinal dos animais do GCP evidenciado pelo aumento de células imunopositivas (Figura 9 B), com diferença significativa comparado aos três grupos experimentais. Com a utilização do tratamento com maropitant houve uma redução significativa ( $p<0,0001$ ) da área de expressão proteica no grupo tratado chegando a níveis do grupo naive.



**Figura 8** - Expressão proteica de IBA-1 na medula espinal de ratos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de IBA-1 em (A) Grupo controle negativo; (B) Grupo controle positivo; (C) Naive e (D) Grupo maropitant 30 mg. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (Média  $\pm$  SEM; n=6; \*\*P < 0,01; \*\*\*\*P < 0,0001). Aumento de 40x.

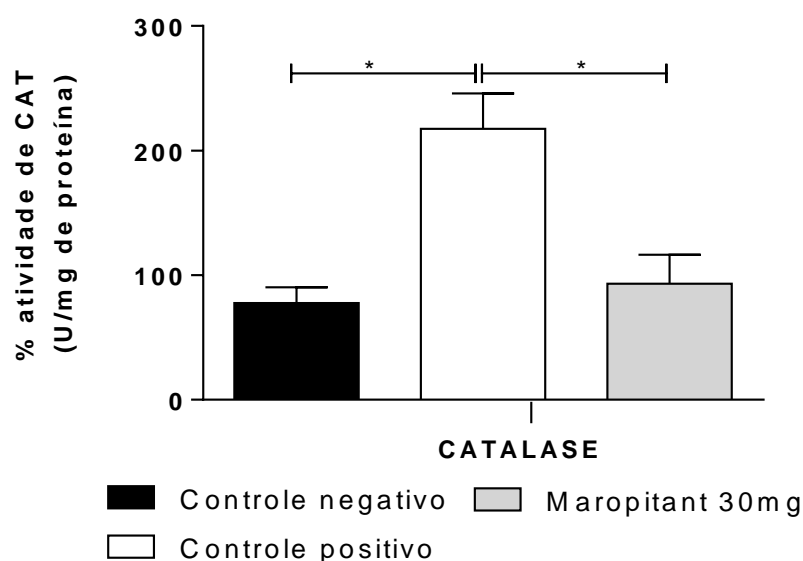




**Figura 9** - Expressão proteica de CAT na medula espinal de ratos. (A-D) Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica de CAT em (A) Grupo controle negativo; (B) Grupo controle positivo; (C) Naive e (D) Grupo maropitant 30 mg. (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão medular de IBA-1 (média  $\pm$  SEM; n=6; \*\*\*\*P < 0,0001). Aumento de 40x.



Confirmando o resultado obtido na imunoistoquímica, a atividade da enzima antioxidante endógena (CAT) também foi avaliada e observou-se um aumento significativo no GCP comparado aos grupos GCN e GM30. Portanto, é possível notar que o tratamento da neuropatia periférica com 30 mg de maropitant foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, com uma diminuição da atividade enzimática antioxidante, chegando a níveis do grupo controle negativo (Figura 10).



**Figura 10** - Média e erro padrão médio da CAT em ratos (n=7) submetidos à exposição do nervo (Controle negativo) e LCC associado ao tratamento com salina (Controle positivo) e com maropitant (Maropitant 30 mg) (P = 0,002).

#### 4.4 DISCUSSÃO

A lesão constrictiva crônica do nervo ciático é um dos modelos experimentais mais utilizados para reproduzir os sinais da dor neuropática. Este modelo produz hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia, bem como outras alterações pertinentes à dor neuropática como aumento de mediadores inflamatórios e pronunciada inflamação (BENNETT; XIE, 1988; BOUHASSIRA; ATTAL, 2016).

A terapia farmacológica é o recurso mais eficaz para o tratamento de dores crônicas, porém a terapêutica atual disponível encontra-se associada a reações adversas que interferem na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (DUTRA et al., 2016). Assim, a busca por novas propostas terapêuticas para o tratamento de dor crônica é um campo de pesquisa relevante.

As doses de maropitant para esse trabalho foram selecionadas com base em estudos anteriores em ratos. Estudos relataram que a utilização de 5 mg/kg foi capaz de reduzir lesões de dermatite ulcerativa (WILLIAMS-FRITZE et al., 2011), 8 mg/kg apresentou ação anti-inflamatória em um modelo de pancreatite aguda induzida (TSUKAMOTO et al., 2018) e 30 mg/kg por via intraperitoneal promoveu redução da CAM associada com amitriptilina com minociclina (AGUADO et al., 2015).

Este estudo foi o primeiro a avaliar o tratamento com maropitant através do limiar nociceptivo mecânico utilizando o modelo experimental de dor neuropática induzida por LCC em ratos. Quando comparadas as médias de sensibilidade mecânica obtidas antes e sete dias após a cirurgia (Figura 3), observou-se uma redução significativa do limiar e hiperalgesia mecânica após LCC, semelhante ao observado em estudos com mesmo modelo experimental em ratos (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2012; MIYAZAK; YAMAMOTO, 2012; RIGO et al., 2017).

Por se tratar do primeiro estudo com o maropitant para o tratamento de dor neuropática em ratos, o período inicial de avaliação do efeito na curva dose-resposta foi baseado em um estudo prévio conduzido por Puentes-Redondo et al. (2007b), que observaram que o pico plasmático do fármaco em gerbil era de duas horas. No nosso estudo foram verificadas que as doses de 15 mg/kg e 30 mg/kg foram eficazes, sendo a de 30 mg/kg mais duradoura na redução da hiperalgesia.

Levando em consideração alguns estudos que descrevem a farmacodinâmica do Maropitant como antiemético e outros novos efeitos, nosso trabalho foi o primeiro

estudo a investigar o período de duração do maropitant em ratos com neuropatia periférica. Estudo em gerbil avaliando a capacidade do maropitant de penetrar no SNC e inibir o batimento do pé induzido por agonista NK1 relata ação do maropitant em 100% efetivo às 2 horas de aplicação e diminuição em 50% do seu efeito após 8 horas de administração (PUENTE-REDONDO et al., 2007b).

Verificamos que a dose de 30 mg/kg foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo significativamente durante 10 horas nos animais com neuropatia. Semelhante ao tempo de duração em outras espécies, citados em estudos anteriores relataram o efeito antiemético em cães através da via intravenosa por até 8 horas (KENWARD et al. 2017), pela via subcutânea por até 23 horas (PUENTE-REDONDO et al., 2007a) e menor incidência de vômitos com aprepitant em seres humanos durante as primeiras 48 horas de pós-operatório (THERNEAU et al., 2017). Além disso, estudo realizado em coelhos relataram que o tempo de ação do maropitant por via IV e SC de  $10,4 \pm 1,6$  horas e  $13,1 \pm 2,44$  horas, respectivamente (OZAWA et al., 2019) e em gerbil o aprepitant atenuou o comportamento de prurido nos animais tratados (CONSTANTINI et al., 2015). Já a meia-vida de eliminação em cavalos ( $10,37 \pm 2,07$  horas) foi intermediária entre cães (4,4-5,6 horas) e gatos (16,5 horas) (BENCHAOUI et al., 2007; HICKMAN et al., 2008; KENWARD et al., 2017; BERRYHILL et al., 2019).

Juntamente com sua ação antiemética, descobertas sugeriram que o maropitant possuía ação periférica, incluindo ação analgésica em gatos (CORREA et al., 2019), antipruriginosa (WILLIAMS-FRITZE et al., 2011) e antidiarreica em ratos (CHAMBERS et al., 2017) em tratamentos realizados de forma contínua.

O efeito tóxico do maropitant (50 mg/kg) em 100% dos animais tratados no nosso estudo corrobora com um estudo piloto que apresentou efeitos colaterais graves, seguido de morte de um animal com a mesma dose utilizada (AGUADO et al., 2015).

Pode-se afirmar que no modelo de LCC assim como na neuropatia pós-cirúrgica, o processo inflamatório é determinante para o desenvolvimento e manutenção da dor. Dessa maneira, imediatamente após a lesão, ocorre pressão mecânica e inflamação periférica, que induz uma axonopatia significativa das fibras mielinizadas e não mielinizadas (COLLOCA et al., 2017). Mediadores inflamatórios secretados pelas fibras lesadas desencadeiam atividade espontânea nas fibras

intactas e, conseqüentemente, o comportamento relacionado à dor neuropática (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2016).

A administração de 30 mg/kg de maropitant, via intraperitoneal, foi capaz de aliviar os comportamentos nociceptivos de forma mais eficaz, associados à lesão neuropática em ratos. Esse resultado coaduna com dados anteriores, nos quais o tratamento com antagonista de receptor NK1 resultaram em atenuação do comportamento antinociceptivo, indicando que a SP e seu receptor NK1 participam do início e da persistência da hiperalgesia (LAGRAIZE et al., 2010).

A ação antinociceptiva do maropitant nos animais com dor neuropática está relacionada com o mecanismo de ação do fármaco e sua capacidade de antagonizar um dos receptores que estão envolvidos no processo nociceptivo. De forma que, Chen et al. (2014) observaram que em ratos submetidos à LCC ocorre uma inconsistente internalização do receptor NK1, com conseqüente aumento da liberação de substância P, o que propicia a manutenção do quadro algico na neuropatia periférica.

Os resultados demonstraram que houve uma maior ativação microglial marcada por IBA-1 nos animais do grupo controle positivo. Sabe-se que o número de células da micróglia no corno dorsal da medula espinal é capaz de aumentar com sete dias após a LCC (KALIN et al., 2018), o que gera a microgliose e que a expressão de IBA-1 é aumentada em condições patológicas (BIESMANS et al., 2013). Dessa maneira, o mecanismo central da dor crônica após lesão nervosa ou inflamação, não envolve apenas a plasticidade dos neurônios, mas também a alteração da função das células gliais da medula espinal como micróglia e astrócitos (ZHUO et al., 2011).

De fato, as células microgliais se tornam hipertrofiadas e aumentam a expressão da molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (IBA-1). Além disso, astrócitos e microglia também liberam vários mediadores inflamatórios que, por sua vez, aumentam a excitabilidade dos neurônios nociceptivos espinais enquanto reforçam a ativação glial, contribuindo assim para a sensibilização neuronal e hipersensibilidade comportamental observada na dor neuropática (INOUE; TSUDA, 2018).

Sugere-se que isso possa acontecer devido a dois mecanismos, o primeiro é devido a uma proliferação da micróglia residente na medula espinal, e o segundo devido à infiltração de monócitos circulantes derivados da medula óssea que se

diferenciam em células semelhantes à micróglia (ECHEVERRY et al., 2011; BRUTTGER et al., 2015).

No presente trabalho a ativação microglial foi reduzida com a administração de 30 mg de maropitant, sugerindo um possível efeito antiinflamatório. Alguns estudos atribuem essa nova aplicação clínica dos antagonistas de receptores NK1 como agentes antiinflamatórios ao fato da SP ser um mediador inflamatório conhecido no processo inflamatório agudo, cujo o receptor é expresso em células inflamatórias, como macrófagos e células dendríticas (TULUC et al., 2009). Foi relatado que os antagonistas de receptores NK1 exibem efeitos antiinflamatórios em vários modelos de doenças inflamatórias, incluindo colite, cistite, artrite, asma e (GRADY et al., 2000; MAKINO et al., 2012).

TSUKAMOTO et al. (2018) confirmaram a expressão de receptores NK1 e SP no pâncreas e com base nos achados do seu estudo, a ação antiinflamatória do maropitant foi mediada pelo bloqueio do receptor NK1 presente no órgão. Um dos mecanismos envolvidos nessa ação possa estar relacionado a SP, pois uma vez liberado estimula diretamente as células inflamatórias a liberar citocinas, radicais livres de oxigênio e outros mediadores inflamatórios (UTSUMI et al., 2016) e promove a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 e aumentando o processo de fagocitose por macrófagos em ratos. Além disso, induz a degranulação de neutrófilos e ativar o estresse oxidativo (WANG et al., 2010).

Além das alterações de sensibilidade mecânica e inflamação, ocorreram variações na atividade da catalase na medula espinal dos animais. Em nosso estudo, as alterações na medula espinal, região de entrada das informações sensoriais no modelo experimental utilizado, ocorreram pela lesão nervosa por constrição do nervo ciático. que foram modificadas pelo tratamento com maropitant.

Ao considerarmos os parâmetros de estresse oxidativo aqui estudados, o aumento da atividade da catalase na neuropatia induzida pela LCC, coincide com estudo anteriores, em ratos, o qual verificou a indução do aumento do estresse oxidativo com acréscimo na atividade desta enzima frente a lesão do nervo periférico além da atenuação da nocicepção pós neuropatia estabelecida (DE MORAIS et al., 2014). Já foi descrito que a administração de diversos fármacos antagonistas de receptores NK-1, como L-DOPA tem a capacidade de proteger neurônios

dopaminérgicos, manter a integridade da BHE preservada, reduzir a neuroinflamação e melhorar a função motora (THORNTON; VINK, 2015).

#### **4.5 CONCLUSÃO**

O maropitant na dose de 30 mg/kg/24q promoveu aumento do limiar nociceptivo mecânico de forma eficaz após trinta minutos, com um pico após duas horas e duração de dez horas após aplicação em ratos com neuropatia. Houve atenuação da alodinia nos animais, com diminuição da ativação microglial e da atividade da catalase. Embora preliminares, nossos dados apontam o potencial uso terapêutico do maropitant, sem efeito cumulativo, para o tratamento de pacientes com neuropática periférica.

## 5. COSIDERAÇÕES FINAIS

O maropitant é um antagonista do receptor NK1 que bloqueia a ação da SP no sistema nervoso central e periférico. Expressado em neurônios na medula, o NK1 apresenta papel no desenvolvimento E na manutenção da hiperalgesia, e também na modulação descendente da transmissão nociceptiva na medula espinal. Esses mecanismos possivelmente justificam o efeito antinociceptivo apresentado com o tratamento do maropitant.

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a constrição do nervo ciático, um modelo de dor neuropática, promoveu aumento da sensibilidade mecânica, os quais foram revertidos pela administração intraperitoneal de maropitant na dose 30 mg/kg/24q administrado durante 7 dias consecutivos. Além disso, ficou sugerido que apresenta uma capacidade de atuar com ação antiinflamatória por promover uma diminuição da ativação microglial e também possui interferência na atividade antioxidante, mostrando-se como nova uma alternativa para o tratamento da dor neuropática.

Contudo, como não houve efeito cumulativo da medicação no decorrer do tratamento, sugere-se a utilização do maropitant de forma contínua em protocolos analgésicos de animais que apresentem dor neuropática, devido à ação antinociceptiva verificada pela via intraperitoneal.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v.105, p. 121-126, 1984.

AGUADO, D.; ABREU, M.; BENITO, J.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ DE SEGURA, I.A. Amitriptyline, minocycline and maropitant reduce the sevoflurane minimum alveolar concentration and potentiate remifentanyl but do not prevent acute opioid tolerance and hyperalgesia in the rat - A randomised laboratory study. **European Journal of Anaesthesiology**, v.4, n.32, p. 248 – 254, 2015.

ARONOFF, G. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. **Medical Clinics of North America**, v.100, p. 31 – 42, 2016.

AUSTIN, P.J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 61, p. 1 – 6, 2012.

AVILLAR, B.M. et al. Effect of epidural end intravenous use of the neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonist maropitant on the sevoflurane minimum alveolar concentration (MAC) in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.39, p. 201-205, 2012.

BACKONJA, M.M. Definind neuropathic pain. **Anesthesia Analgesia**, v. 97, n.3, p.785-790, 2003.

BAINS M.; HALL E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p. 675–684, 2012.

BARBARESI P, FABRI M, & MENSÀ E. Characterization of NO-producing neurons in the rat corpus callosum. **Brain and Behavior**. v. 4, p. 317 – 336, 2014.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

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

BASBAUM, A.I. Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. **Experimental Neurology**. v.42, n.3, p. 490-501, 1974.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **O Sistema Sensorial Somático**. In: Neurociências – Desvendando o sistema nervoso. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 12, 2008, p. 387 – 422.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, v. 237, p. 55-62, 2018.

BENCHAOUI, H. A.; COX, S. R.; SCHNEIDER, R. P.; BOUCHER, J. F.; CLEMENCE, R. G. The pharmacokinetics of maropitant, a novel neurokinin type-1



receptor antagonist, in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.30, p.336–344, 2007.

BENNET, M. I.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N.; LEE, A. J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, Amsterdam, v. 122, p. 289-294, 2006.

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

BERRYHILL, E.H.; KNYCH, H.; EDMAN, J.M.; MAGDESIAN, K.G. Pharmacokinetics of single doses of maropitant citrate in adult horses. **Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.2019, n.42, p.487–49, 2019.

BIESMANS, S.; MEERT, T.F.; BOUWKNECHT, J.A.; ACTON, P.D.; DAVOODI, N. et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of Inflammation**. v.2013, p. 1-18; 2013.

BOSCAN, P.; MONNET, E.; MAMA, K.; TWEDT, D.C.; CONGDON, J.; STEFFEY, E.P. Effect of maropitant, a neurokinin 1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, p. 1576–1579, 2011.

BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Translational neuropathic pain research: A clinical perspective. **Neuroscience**, p. 27-35 2016.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n.4, p. 629-638, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUTTGER, J.; KARRAM, K.; WORTGE, S.; REGEN, T.; MARINI, F. et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. **Immunity**, v.43, n.1, p.92-106, 2015.

CALVO, M.; DAWES, J.M.; BENNET, D.L.H. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **The lancet neurology**. v.11, n.7, p.629-642, 2012.

CATANZARO, A. et al. Preliminary study on attitudes, opinions and knowledge of Italian veterinarians with regard to abdominal visceral pain in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 43, p. 361-370, 2016.

CHAMBERS, E. C.; REHM, C. D.; CORRERA, J.; GARCIA, L. E.; MARQUEZ, M. E. et AL. Factors in Placement and Enrollment of Primary Care Patients in YMCA's Diabetes Prevention Program, **Preventing Chronic Disease**. v.14, n.28, p. 2010-2015, 2017.

CHAN P.H., Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v.21, p.2–14, 2001.

CHAN P.H., Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v.27, n.6, p.1124-9, 1996.

CHEN, W.; McROBERTS, J.A.; MARVIZON J.C.  $\mu$  – Opioid receptor inhibition of substance P release from primary afferents disappears in neuropathic pain but not inflammatory pain. **Neuroscience**, v.267, p.67-82, 2014.

CHERUBINO, P.; SARZI-PUTTINI, P.; ZUCCARO, S.M.; LABIANCA, R. The Management of Chronic Pain in Important Patient Subgroups. **Clinical Drug Investigation**, p. 35–44, 2012.

CLARK, A.K.; OLD, E.A. MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **Journal of Pain Research**. v.6, p.803-814, 2013.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: Mechanisms and their clinical implications. **British Medical Journal**, v.6, 2014.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A.H. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**. v.3, p.170 – 182, 2017.

CONDER, G. A.; SEDLACEK, H. S.; BOUCHER, J. F.; CLEMENCE, R. G. Efficacy and safety of maropitant, a selective neurokinin 1 receptor antagonist, in two randomized clinical trials for prevention of vomiting due to motion sickness in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology**. v.31, p.528–532, 2008.

CONSTANTINI, V.J.A.; CORSI, M.; DUNSTL, G.; BETTELINI, L.; ZONZINI L. et al. The NK1 receptor antagonist aprepitant attenuates NK1 agonist-induced scratching behaviour in the gerbil after intra-dermal, topical or oral administration. **Experimental Dermatology**. v.24, n.4, p.312-314, 2015.

CORREA, J.M.X.; SOARES, P.C.L.R.; NIELLA, R.V.; COSTA, B.A. et al. Evaluation of the Antinociceptive Effect of Maropitant, a Neurokinin-1 Receptor Antagonist, in Cats Undergoing Ovariohysterectomy. **Veterinary Medicine International**, v.2019, p.1-7, 2019.

CORRIGAN, F.; VINK, R.; TURNER, R.S. Inflammation in acute CNS injury: a focus on the role of substance P. **British journal of pharmacology**, 2015.

CUNHA, T.M.; VERRI JR., W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F. et al. Um teste eletrônico da pata de nocicepção do medidor de pressão para ratos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**. v.37, n. 3, p.401-407, 2004.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P. FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**. v.30, n.25, p.243-254, 2011.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; FERREIRA, D. M.; WERNER, M. F. Pivotal role of oxidative stress in hippocampus and pre-frontal cortex on development of depressive-like behaviors in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 52-64, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ECHEVERRY, S.; SHI, X.Q.; RIVEST, S.; ZHANG, J. Peripheral Nerve Injury Alters Blood–Spinal Cord Barrier Functional and Molecular Integrity through a Selective Inflammatory Pathway. **Journal of Neuroscience**, v.31, n.30, p.10819-10828, 2011.

EISENBERG, E. et al. Lamotrigine reduces painful diabetic neuropathy A randomized, controlled study. **Neurology**, v. 57, n. 3, p. 505-509, 2001.

ELLISON, D. L. Physiology of pain. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v.29, n.4, p. 397-406, 2017.

GARCIA-RECIO S AND GASCÓN P. Biological and pharmacological aspects of the NK1-receptor. **BioMed Research International**. v.2015, p.1–14, 2015.

GILMORE, S. A.; SKINNER, R. D. Intraspinal nonneuronal cellular responses to peripheral nerve injury. **The Anatomical Record**. v.194, p.369–387, 1979.

GRACE, P.M. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**. v.14, n.4, p.217, 2014.

GRADY, E. F.; YOSHIMI, S. K.; MAA, J.; VALEROSO, D.; VARTANIAN R. K. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **British Journal of Pharmacology**. v.130, p.505–512, 2000.

GRUBB, T. Chronic neuropathic pain in veterinary patients. **Topics in companion animal medicine**. v.25, n. 1, p.45-52, 2010.

GUAN, Z. et al. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. **Nature Neuroscience**. v.19, p.94–101, 2016.

GUO, W.; ZOU, S.; GUAN, Y.; IKEDA, T.; TAL, M.; DUBNER, R. et al. Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 22, p. 6208-6217, 2002.

HELLYER, P. W. et al. **Lumb & Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária**. Roca. 2012. p. 38-49.

HICKMAN, M. A.; COX, S. R.; MAHABIR, S.; MISKELL, C.; LIN, J. Safety, pharmacokinetics and use of the novel NK-1 receptor antagonist maropitant

(Cerenia™) for the prevention of emesis and motion sickness in cats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, p.220–229, 2008.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v.19, n3 2018.

JENSEN, S. Pathophysiology of pain: from theory to clinical evidence. **European Journal of Pain Supplements**, v. 2, p. 13–17, 2008.

JI, R.R.; XU, Z.Z.; GAO, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature reviews drug Discovery**. v.13, n.7, p.533-548, 2014.

KALIN, S.; MILLER, K.R.; KALIN, R.E.; JENDRACH, M.; WITZEL, C. ET AL. CNS myeloid cells critically regulate heat hyperalgesia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n.7, p.2774-2786, 2018.

KAUTIO, A. et al. Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. **Journal of pain and symptom management**, v. 35, n. 1, p. 31-39, 2008.

KENWARD, H.; ELLIOTT, J.; LEE, T.; PELLIGAND, L. Anti-nausea effects and pharmacokinetics of ondansetron, maropitant and metoclopramide in a low-dose cisplatin model of nausea and vomiting in the dog: a blinded crossover study. **BMC Veterinary Research**. v.13, n.244, p.1-12, 2017.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. v.50, n.3, p.355-363, 1992.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n. 1, p. 1-12, 2008.

KOMIRISHETTY, P.; ARETI, A.; SISTLA, R.; KUMAR, A. Morin Mitigates Chronic Constriction Injury (CCI)-Induced Peripheral Neuropathy by Inhibiting Oxidative Stress Induced PARP Over-Activation and Neuroinflammation. **Neurochemical Research**. v.41, n.8, p.1-14, 2016.

LAGRAIZE, S.C.; GUO, W.; YANG, K.; WEI, F.; REN, K.; DUBNER, R. Mecanismos da medula espinhal mediando hiperalgesia comportamental induzida pela ativação do receptor de neurocinina-1 taquicinina na medula ventromedial rostral. **Neurociência**. v.171, n.4, p.1341–1356, 2010.

LEE, S.E.; KIM, J.H. Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. **Neuroscience research**. v.58, n.3, p.245-249, 2007.

LI, S.S.; ZHANG, W.S.; JI, D.; ZHOU, Y.L. et al. Involvement of spinal microglia and interleukin-18 in the anti-nociceptive effect of dexmedetomidine in rats subjected to CCI. **Neuroscience Letters**. v. 560, p. 21 – 25, 2014.

LIAKOPOULOS, V.; ROUMELIOTIS, S.; GORNY, X.; DOUNOUSI, E.; MERTENS, P.R. Oxidative stress in hemodialysis patients: a review of the literature. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, p.1-22, 2017.

LIN, C.C.; CHEN, W.N.; CHEN, C.J.; LIN et al. Papel antinociceptivo da substância P na dor muscular crônica induzida por ácido. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.109, n.2, p.76-83, 2012.

LING, X.C.; KUO, K. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Renal Replacement Therapy**.v.4, n. 53, p. 1-12, 2018.

MAINTJES, R.A. An overview of the physiology of pain for the veterinarian. **The veterinary journal**, v. 193, p.344-348, 2012.

MAKINO, A.; SAKAI, A.; ITO, H.; SUZUKI, H. Involvement of tachykinins and NK1 receptor in the joint inflammation with collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. **Journal of Nippon Medical School**. v.79, p.129–138, 2012.

MARTIN-FLORES, M.; SAKAI, D.M.; LEARN, M.M. et al. Effects of maropitant in cats receiving dexmedetomidine and morphine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.18, n.11, p.921–924, 2016.

MARQUEZ, M.; BOSCAN, P.; WEIR, H.; VOGEL, P.; TWEDT, D.C. Comparison of nk-1 receptor antagonist (maropitant) to morphine as a pre-anaesthetic agent for canine ovariohysterectomy. **PLoS ONE**. v.10, n.10, p.1–10, 2015.

MASHAGHI, A.; MARMALIDOU, A.; TEHRANI, M.; GRACE, P.M.; POTHOUKAKIS, C.; DANA, R. Neuropeptide substance P and the immune response. **Cellular and molecular life sciences**. v. 73. n.22, p.4249 – 4264, 2016.

MATHEWS, K. A. Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, n.6, p. 1365-1414, 2008.

MATHEWS, K.; KRONEN, P. W.; LASCELLES, D.; NOLAN, A.; ROBERTSON, S. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, p.E10-E68, 2014.

MCKUNE, C.M. et al. **Nociceção e dor**. In: TRANQUILLI, W.J. THURMON, J.C. GRIMM, K.A. Lumb & Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária. Roca. 2012. p. 38-49.

MELLEGGERS, M. A.; FURLAN, A. D.; MAILIS, A. Gabapentin for neuropathic pain: systematic review of controlled and uncontrolled literature. **The Clinical journal of pain**, v. 17, n. 4, p. 284-295, 2001.

MIGUEL, M.; KRAYCHETE, D.C.; NASCIMENTO, R. J. M. O sistema imunológico na dor neuropática: uma revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.2, p.228-233, 2012.

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

MIYAZAKI, R.; YAMAMOTO, T. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. **Anesthesia and Analgesia**, v. 115, n. 1, p. 182- 188, 2012.

MOFFAT, R.; RAE, C.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. Elsevier Ltd, v.12, n. 1, p.12–15, 2011.

MORAES, M.F.C. **Dor neuropática: avaliação de mecanismos num modelo experimental**. Dor. 2010. Mestrado integrado em medicina. Faculdade de medicina, Universidade do Porto.

MUIR III, W. W. Dor e estresse. In: MUIR III, W. W.; GAYNOR, J. S. **Manual de controle da dor em Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: MedVet, cap. 2, 2009, p. 13-41.

NICKEL, F.T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHOFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology Journal**, v.22, p.81-91, 2012.

NISHIKAWA, M.; HASCHIDA, M.; TAKAKURA, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, n.4, p.319-326, 2009.

NIYOM, S.; BOSCAN, P.; TWEDT, D.C.; MONNET, E.; EICKHOFF, J.C. Effect of maropitant, a neurokinin-1 receptor antagonist, on the minimum alveolar concentration of sevoflurane during stimulation of the ovarian ligament in cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.40, p.425–431, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, J.O.; PORTELLA JUNIOR, C.S.A.; COHEN, C.P. Mediadores inflamatórios da dor neuropática. **Revista dor**. v.17, n. 1, p.35-42, 2016.

OZAWA, S.M.; HAWKINS, M.G.; DRAZENOVICH, T.L.; KASS, P.H.; KNYCH, H.K. Pharmacokinetics of maropitant citrate in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **American Journal of Veterinary Research**. V.80, n.10, p.963-968, 2019

PATEL, N. B. Physiology of pain. In: KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guide to pain management in low-resource settings**. Amsterdam: International Association for the Study of Pain, 2010. cap. 3, p.13-18.

POSSO, I.P.; PALMEIRA, C.C.; VIEIRA, E.B.M. Epidemiology of neuropathic pain. **Revista Dor**. v.17, n.1, p.11-14, 2016.

PUENTE-REDONDO V.; TILT, N.; ROWAN, T.G.; CLEMENCE, R.G. Efficacy of maropitant for treatment and prevention of emesis caused by intravenous infusion of

cisplatin in dogs . **American Journal of Veterinary Research**, v.68, n.1, p.48-56, 2007a.

PUENTE-REDONDO, V.; TINGLEY, F. D.; SCHNEIDER, R. P.; HICKMAN, M. A. The neurokinin-1 antagonist activity of maropitant, an antiemetic drug for dogs, in a gerbil model. **Journal of Veterinary Pharmacology**. v.30, p.281–287, 2007b.

RIGO, F.K.; TREVISAN, G.; DAL-TOÉ DE PRÁ, S.; CORDEIRO, M.N.; BORGES, M.H. et al. The spider toxin Ph a 1b recombinant possesses Strong analgesic activity. **Toxicon**, v.133, p.145-152, 2017.

SAFIEH-GARABEDIAN, B. et al. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 864-72, 2002.

SALLUM, A.M.C.; GARCIA, D.M.; SANCHES, M. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. **Acta Paulista de Enfermagem**. v.25, n. 1, p. 150-154, 2012.

SELTZER, Z.R.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**. v.43, n.2, p. 205-218, 1990.

SILVA, J.F. **Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo**. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Patologia Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SIQUEIRA, S.; TEIXEIRA, M.; SIQUEIRA, J. Clinical Characteristics of patients with trigeminal neuralgia referred to neurosurgery. **European Journal of Dentistry**. v. 3, n.3, p. 207-212, 2001.

SMITH, E.J. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal Neurology**. v.265, p.231–238, 2018.

SOMMER, C. Exploring pain pathophysiology in patients. **Science**. v.354, p.588–592, 2016.

STRAUS, S.E.; OSTROVE. J.M.; INCHAUSPE, G.; FELSER, J.M. et al. Varicella zoster infections. Biology, natural history, treatment, and prevention. **Annals of Internal Medicine**, v. 108, n.2, p.221-237, 1988.

SWALLOW, A. et al. The effect of maropitant on intraoperative isoflurane requirements and postoperative nausea and vomiting in dogs: a randomized clinical trial. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.44, p.785 - 793, 2017.

THACKER, M.A.; CLARK, A.K.; MARCHAND, F.; McMAHON, S.B. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: imune cells and molecules. **Anesthesia and Analgesia**., v.105, n.3, p838-847, 2007.

THERNEAU, I. W.; MARTIN, E. E.; SPRUNG, J.; KELLOGG, T. A.; SCHROEDER, D. R. et al. The Role of Aprepitant in Prevention of Postoperative Nausea and Vomiting After Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v.28, n.1, p.37–43, 2017.

THORNTON, E.; VINK, R. Substance P and its tachykinin NK1 receptor: a novel neuroprotective target for Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 10, p. 1403-1405, 2015.

TODOROVIC, S. M.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. **Pflügers Archiv - European journal of physiology**, Berlin, v. 465, n. 7, p. 921-927, 2013.

TONIOLO, E. F. **Caracterização da hemopressina (agonista inverso de receptores canabinóides do tipo 1 na neuropatia diabética experimental)**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 215p., 2015.

TRACEY, W. D. Jr. Nociception. **Current Biology**, v.27, n.4, p. 129-133, 2017.

TREEDE, R.D.; , JENSEN, T.S.; CAMPBELL, J.N.; CRUCCU, L.; DOSTROVSKY, J.O. et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v.70, n.18, p.1630-1635, 2008.

TREPANIER, L. Acute vomiting in cats: rational treatment selection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v.12, n.3, p.225–230, 2010.

TSUKAMOTO, A.; OHGODA, M.; HARUKI, N.; HORI, N.; INOMATA, T. The anti-inflammatory action of maropitant in a mouse model of acute pancreatitis. **The Journal of Veterinary Medicine Science**. v.80, n. 3, p.492–498, 2018.

TULUC, F.; LAI, J. P.; KILPATRICK, L. E.; EVANS, D. L.; DOUGLAS S. D. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. **Trends of Immunology**. v.30, p.271–276, 2009.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacol and Therapeutics**, v.109, p.57-77, 2006.

UTSUMI, D.; MATSUMOTO, K.; AMAGASE, K.; HORIE, S.; KATO, S. 5-HT<sub>3</sub> receptors promote colonic inflammation via activation of substance P/neurokinin-1 receptors in dextran sulphate sodium-induced murine colitis. **British Journal of Pharmacology**. v.173, p.1835–1844, 2016.

VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Practice**, Malden, v. 10, n. 3, p. 167-84, 2010.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S.K.; KHAN, R.A.; SMITH, B.H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**. v.155, n.4, p. 654-662, 2014.



- VISAVADIYA, N.P.; MCEWEN, M.L.; PANDYA, J.D. et al. Antioxidant properties of Neu2000 on mitochondrial free radicals and oxidative damage. **Toxicology in Vitro**, v.2, p.10110-16, 2012.
- WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; MIYAMOTO, A.; NABEKURA, J. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends of Neuroscience**. v.36, p. 209–217, 2013.
- WANG, J.; OHMURAYA, M.; SUYAMA, K.; HIROTA, M.; OZAKI, N. Relationship of straindependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression. **Laboratory Investigation**. v.90, p.654–664, 2010.
- WANG, L.X.; WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, n. 8, p. 949-965, 2003.
- WEI, X.H.; NA, X.D.; LIAO, G.J.; CHEN, Q.Y.; CUI, Y. et al. The up-regulation of IL-6 in DRG and spinal dorsal horn contributes to neuropathic pain following L5 ventral root transection. **Experimental Neurology**, v. 241, p.159 – 168, 2013.
- WILLIAMS, A. C.; CRAIG, K, D. Updating the definition of pain. **Pain**, v.157, n. 11, p.2420 - 2423, 2016.
- WILLIAMS-FRITZE, M.J.; SCHOLZ, J.A.C.; ZEISS, C.; DENG, Y.; WILSON, S.R.; FRANKLIN, R. et al. Maropitant Citrate for Treatment of Ulcerative Dermatitis in Mice with a C57BL/6 Background. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v.50, n.2, p.221-226, 2011.
- WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. v.152, n.3, p.1-18, 2011.
- YARNITSKY, D. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**. (2017) 3: 17002. doi: 10.1038/rdp.2017.2.
- ZHUO, M.; WU, G.; WU, L. J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. **Molecular Brain**, v.4, n.31, 2011.

## ANEXO I - PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA

Kit: Estreptavidina-biotina-peroxidase

### 1º DIA

- XILOL 1 (1 hora)
- XILOL 2 (1 hora)
- ÁLCOOL ABS 1 (5 min)
- ÁLCOOL ABS 2 (5 min)
- ÁLCOOL ABS 3 (5 min)
- ÁLCOOL 90% (5 min)
- ÁLCOOL 80% (5 min)
- ÁLCOOL 70% (5 min)
- ÁGUA CORRENTE (5 min)
  
- BANHO MARIA A 98° C (tampão citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente)

Tampão Citrado:

1,05 g de ácido cítrico + 500 mL de H<sub>2</sub>O (água destilada ☺)

**Obs.: ajustar o pH para 6,0**

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)

PBS:

1 L de dH<sub>2</sub>O + 7,2 g de NaCl + 0,43 g de fosfato de sódio

onobásico + 1,48 g de fosfato de sódio dibásico

**Obs.: ajustar o pH para 7,2**

- BLOQUEIO PEROXIDASE (30 min) (no escuro – 6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e completar para 200 ml de metanol) - fazer na hora
  
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
  
- SORO BLOQUEIO (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
- ANTICORPO 1º (overnight) – câmara úmida na geladeira

## 2º DIA

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
  
- ANTICORPO 2º (45 min) – câmara úmida a temperatura ambiente
  
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
  
- ESTREPTOVIDINA –PEROXIDASE (30 min) (câmara úmida a temperatura ambiente)
  
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
  
- **DAB** (= REVELADOR) (1 gota em 1 mL de diluente)

*Observações:* O tempo do DAB varia de acordo o anticorpo 1º. Para 24 lâminas, fez-se 500 microlitros de diluente para 25 microlitros de DAB (1:20).

- ÁGUA CORRENTE (10 min)
- HEMATOXILINA (60 seg)
- ÁGUA CORRENTE (10 min)
- ÁLCOOL 70% (3 min)
- ÁLCOOL 80% (3 min)
- ÁLCOOL 90% (3 min)
- ÁLCOOL ABS 1 (10 min)
- ÁLCOOL ABS 2 (10 min)
- ÁLCOOL ABS 3 (10 min)
- XILOL 1 (10 min)
- XILOL 2 (10 min)
- Montagem da lâmina

**Tabela 2-** Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB).

<b>Anticorpo</b>	<b>Espécie/clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>DAB</b>
anti-IBA-1	Camundongo/ monoclonal	1:300	8 minutos
anti-CAT	Camundongo/ monoclonal	1:300	4 minutos