



BIOÉTICA

SARA BENTO SILVA MARQUES¹

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO *PATCH* DE LIDOCAÍNA
A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA CRÓNICA,
EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA
TECIDULAR**

**Trabalho de Projeto apresentado para a
obtenção do grau de Mestre em
Cuidados Paliativos, sob a orientação
do Professor Doutor Manuel Vico
Ávalos.**

**2º CURSO DE MESTRADO EM CUIDADOS PALIATIVOS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO
PORTO, 2012**

¹ Médica Interna de MGF da Unidade de Cuidados de Saúde Personalizados de Tábua – ARS Centro
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Estas palavras pretendem demonstrar a minha profunda gratidão a todos aqueles que comigo caminharam e me ajudaram nesta etapa da minha vida pessoal e profissional, tornando possível a sua concretização.

Ao Orientador deste Trabalho de Projeto, Professor Doutor Manuel Vico Ávalos, pela competência científica demonstrada ao longo deste projeto, pela orientação excecional e ajuda sempre prestável, pela segurança e confiança depositadas neste trabalho e em mim, o meu agradecimento sincero.

Aos meus pais e irmã, pela prontidão e amor com que sempre me acompanharam em todos os sonhos e conquistas; por me ouvirem, por me animarem, por todo o afeto e compreensão com que me apoiaram incondicionalmente e por acreditarem neste projeto e na minha capacidade para o superar e por sempre o manifestarem, agradeço-lhes profundamente.

Ao meu amigo Paulo Pais, que me tem vindo a acompanhar em muitas aventuras e desafios; pela tua amizade sincera, cumplicidade e apoio que me ajuda a nunca desistir, um sincero agradecimento.

À minha mentora profissional da arte médica e amiga, Dr.^a Helena Sequeira, por todo o apoio e confiança que sempre depositou e deposita em mim a cada dia, pela ajuda em mais este projeto, pela segurança e tranquilidade das suas palavras de motivação que sempre me acompanharam nesta conquista, o meu sincero obrigada.

E a todos aqueles amigos, familiares, colegas e companheiros de jornada, que não conseguirei individualizar nestas linhas, a minha palavra de gratidão por toda a vossa ajuda, carinho e amizade.

RESUMO

Introdução: Na prática de Cuidados Paliativos são colocados muitos desafios no controlo da dor, incluindo a dor neuropática. O princípio da beneficência e da não maleficência assumem importância fulcral na escolha terapêutica. Os inúmeros fármacos utilizados na terapêutica da dor neuropática periférica, e mais concretamente, da nevralgia pós-herpética, apesar de comprovadamente eficazes, podem acarretar efeitos adversos não toleráveis. Os doentes em Cuidados Paliativos, sobretudo por patologia oncológica, apresentam uma taxa de incidência relativamente elevada deste tipo de nevralgia periférica, com interferência marcada na qualidade de vida. O controlo da dor é dificultado pela baixa tolerância e efeitos secundários das terapêuticas sistémicas.

Recentemente foi aprovado em Portugal o emplastro medicamentoso de lidocaína a 5% para uso na dor neuropática da nevralgia pós-herpética. Assim, esta terapêutica tópica assume-se como uma opção terapêutica de primeira linha. Os efeitos secundários cutâneos, descritos para este emplastro medicamentoso, embora clinicamente menos significativos, são bastante frequentes e ainda pouco estudados. A sua etiologia pode dever-se à citotoxicidade da lidocaína, pelo que se torna importante a sua investigação.

O recurso à Engenharia Tecidual permite a construção de modelos de tecidos humanos para investigação clínica e de toxicidade de fármacos, evitando os problemas éticos inerentes à experimentação humana e animal nesta área.

Objetivos: O objetivo geral deste projeto é determinar a toxicidade do *patch* de lidocaína a 5% no equivalente de pele humana, obtido através de técnicas de engenharia tecidual. O objetivo principal foi subdividido em cinco objetivos específicos: 1) Estabelecer três culturas primárias de queratinócitos humanos; 2) Determinar a viabilidade celular dos queratinócitos cultivados com lidocaína a 5% (às 12, 24 e 48 horas); 3) Estabelecer três culturas primárias de fibroblastos humanos; 4) Determinar a viabilidade celular dos fibroblastos cultivados com lidocaína a 5% (às 12, 24 e 48 horas); 5) Determinar a viabilidade de um modelo de pele artificial obtida mediante engenharia tecidual cultivada com *patch* de lidocaína a 5% ou com o *patch* controlo (às 12, 24 e 48 horas).

Metodologia: Para a concretização dos referidos objetivos serão construídas amostras de pele humana artificial, obtidas mediante engenharia tecidual, segundo um procedimento adaptado

do método de produção descrito por Egles e sua equipa em 2010. Será aplicada a lidocaína a 5% em culturas primárias de fibroblastos e em culturas primárias de queratinócitos humanos, durante períodos de tempo crescentes (12, 24 e 48 horas). O *patch* de lidocaína a 5% e o *patch* de placebo serão aplicados em amostras de pele humana, obtida por engenharia tecidual, durante os mesmos períodos de tempo. A citotoxicidade e viabilidade celular serão avaliadas mediante microscopia eletrónica analítica e por determinação de expressão genética mediante *microarrays*. Os dados serão tratados e analisados no programa estatístico SPSS, através de metodologia analítica quantitativa adequada.

Resultados esperados e Conclusões: Tendo em conta os efeitos secundários cutâneos descritos para o *patch* de lidocaína a 5%, é esperado que este trabalho possa concluir que esses efeitos se traduzem na citotoxicidade e diminuição da viabilidade celular do equivalente de pele obtido mediante engenharia tecidual. O aumento do tempo de exposição ao fármaco poderá aumentar o nível de citotoxicidade celular de ambos os tipos celulares.

O desenvolvimento deste projeto pretende colmatar a lacuna nos estudos dos efeitos secundários do *patch* de lidocaína a 5%, aplicado no controlo da dor neuropática da nevralgia pós-herpética. A compreensão do mecanismo subjacente às alterações cutâneas provocadas por esta terapêutica permitirá, num futuro próximo, corroborar o seu uso seguro, em posologias minimamente inócuas e cujo benefício ultrapasse positivamente os riscos e consequências do seu uso. A aplicação das técnicas de biotecnologia de engenharia tecidual permite contornar os problemas éticos de ensaios clínicos em doentes em Cuidados Paliativos. Em última análise, este trabalho permitirá alargar o conhecimento multidisciplinar fundamentado da terapêutica da dor, com aplicabilidade inquestionável nos Cuidados Paliativos, na melhoria do controlo da dor neuropática nestes doentes, tantas vezes, resistente a vários tipos de tratamentos.

ABSTRACT

Introduction: The pain management of patients in Palliative Care can be a challenge, especially concerning neuropathic pain. The principle of beneficence and nonmaleficence assume central importance in choosing therapy. The drugs used to control peripheral neuropathic pain, and more specifically, postherpetic neuralgia, though proven effective, can cause adverse effects that people may not tolerate. Patients receiving palliative care, particularly for oncologic pathology, have a high incidence of this type of peripheral neuralgia, which decreases their quality of life. It is also harder to control their pain due to their low tolerance to the side effects of systemic therapies. Portugal has recently approved a 5% lidocaine medicated plaster for use in neuropathic pain of postherpetic neuralgia. This topical therapy is recommended as a first-line therapeutic option. The cutaneous side effects described, although clinically less significant, are quite frequent, poorly studied and may be caused by lidocaine's cytotoxicity. Therefore, more research into these matters is important. Tissue engineering used for construction of models of human tissues can be used in clinical researching on the toxicity of drugs, avoiding all the ethical problems of human and animal experimentation.

Objectives: The aim of this project is to determine the toxicity of a 5% lidocaine patch in a human skin equivalent, obtained using tissue engineering techniques. The main purpose was divided into five specific objectives: 1) To establish three primary cultures of human keratinocytes; 2) To determine the cell viability of keratinocytes cultured with 5% lidocaine (at 12, 24 and 48 hours); 3) To establish three primary cultures of human fibroblasts; 4) To determine the cell viability of fibroblasts cultured with 5% lidocaine (at 12, 24 and 48 hours) and 5) To determine the viability of an artificial skin model obtained through tissue engineering when cultivated with 5% lidocaine patch or control (at 12, 24 and 48 hours).

Methods: To achieve these objectives it will be constructed several samples of artificial human skin equivalents. They will be obtained by tissue engineering, according to a procedure adapted from the method described by Egles *et al.*, in 2010. Lidocaine 5% will be cultivated in primary cultures of fibroblasts and in primary cultures of human keratinocytes, during increasing periods of time (12, 24 and 48 hours). A 5% lidocaine plaster and a placebo plaster will be applied on human skin equivalents, obtained by tissue engineering, for the

same periods of time. Cytotoxicity and cell viability will be assessed by analytical electron microscopy and by determination of gene expression using microarrays. The data will be processed and analyzed in SPSS, using appropriate quantitative analytical methodology.

Expected Results and Conclusions: Concerning the cutaneous side effects described for a 5% lidocaine patch, it is expected that this work proves that these effects are related to cytotoxicity and decreased cell viability of human skin equivalent, obtained by tissue engineering techniques. Increasing exposure time to the drug may increase the level of cytotoxicity in both cell types.

This project's aim is to fill the gap in scientific studies about the side effects of the 5% lidocaine patch, applied to the control of neuropathic pain in postherpetic neuralgia. Understanding the mechanism of the skin changes caused by this therapy might allow us to confirm their safe use in minimally innocuous doses whose positively benefits outweigh the risks and consequences of their use. The application of biotechnology techniques of tissue engineering allows us to carry out this investigation avoiding ethical problems of clinical trials in patients receiving palliative care. Ultimately, this work will contribute to extend the multidisciplinary knowledge on pain therapy, with unquestionable applicability in palliative care and improving the control of neuropathic pain in these patients, who are often resistant to various treatments.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
SIGLAS	13
1 – INTRODUÇÃO	16
2 – ESTADO DA ARTE	20
2.1 – DOR CRÔNICA ONCOLÓGICA	20
2.1.1 – Epidemiologia da Dor Oncológica	22
2.1.2 – Fatores de Risco de Dor Oncológica	23
2.1.3 – Etiologia e Fisiopatologia da Dor Oncológica	25
2.1.4 – Estratégias Terapêuticas na Dor Oncológica	31
2.2 – DOR NEUROPÁTICA	35
2.2.1 – Abordagens Terapêuticas da Dor Neuropática	41
2.3 – NEURALGIA PÓS-HERPÉTICA (NPH)	51
2.3.1 – Herpes Zoster	51
2.3.1.1 – Epidemiologia e Fatores de Risco	52
2.3.1.2 – Fisiopatologia	53
2.3.1.3 – Complicações	54
2.3.1.4 – Tratamento	55
2.3.2 – NPH - Epidemiologia e História Natural	55
2.3.3 – NPH - Definição	57
2.3.4 – NPH - Fatores de Risco.....	57
2.3.5 – NPH - Fisiopatologia	58
2.3.6 – NPH - Clínica	61
2.3.7 – NPH - Diagnóstico e Avaliação	62
2.3.8 – NPH - Tratamento	63
2.3.8.1 – Anticonvulsivantes: Gabapentina e Pregabalina	66
2.3.8.2 – Antidepressivos Tricíclicos	68
2.3.8.3 – Antidepressivos Inibidores de Recaptação de Serotonina e Noradrenalina	68
2.3.8.4 – Analgésicos Opióides <i>Major</i>	69
2.3.8.5 – Tramadol	70

2.3.8.6 – Terapêuticas Tópicas	70
2.3.8.7 – Terapêuticas Combinadas	72
2.3.8.8 – Outras Terapêuticas Farmacológicas	73
2.3.8.9 – Terapêuticas Invasivas	73
2.3.8.10 – Intervenções Psicológicas	73
2.3.8.11 – Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea (TENS)	74
2.3.8.12 – Outras	74
2.3.8.13 – Conclusão	74
2.3.9 – Nevralgia Pós-Herpética em Doentes Oncológicos	75
2.4 – PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%	77
2.4.1 – Resenha Histórica do <i>Patch</i> de Lidocaína a 5%	77
2.4.2 – Formulação Química e Farmacocinética	78
2.4.3 – Indicações	79
2.4.4 – Efeitos secundários e Contraindicações	79
2.4.5 – Estudos de Eficácia e Tolerabilidade	80
2.5 – PELE HUMANA	90
2.6 – ENGENHARIA TECIDULAR DA PELE HUMANA	94
2.6.1 – Pele Humana obtida através de Engenharia Tecidular	97
2.6.2 – <i>Apligraf</i> ®	102
2.7 – MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR	104
2.7.1 – Métodos Gerais	105
2.7.2 – Microscopia Eletrônica Analítica	106
2.7.3 – Determinação da Expressão Génica Global (<i>Microarrays</i>)	106
3 – HIPÓTESE DE TRABALHO	108
3.1 – HIPÓTESE	108
3.2 – OBJETIVOS DO TRABALHO	108
4 – METODOLOGIA	110
4.1 – MATERIAIS	110
4.1.1 – Componentes dos Meios de Cultura	110
4.1.1.1 – Meio 010	111
4.1.1.2 – Meio de Cultura de Queratinócitos	111

4.1.1.3 – Meio de Cultura de Fibroblastos	112
4.1.1.4 – Meio de Cultura 3T3	112
4.1.2 – Componentes da Construção do Equivalente de Pele Humana Tridimensional	112
4.2 – METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE FIBROBLASTOS E DE QUERATINÓCITOS	113
4.2.1 – Obtenção das Amostras.....	113
4.2.2 – Estabelecer três Culturas Primárias de Fibroblastos Humanos	113
4.2.3 – Estabelecer três Culturas Primárias de Queratinócitos Humanos	114
4.2.4 – Colagénio	115
4.3 – METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE PELE MEDIANTE ENGENHARIA TECIDULAR.....	115
4.3.1 – Construção de Matriz de Colagénio com Fibroblastos Dérmicos	115
4.3.2 – Adição de Queratinócitos à superfície do Gel de Colagénio Contraído	117
4.3.3 – Colheita e Incorporação Tecidular para Análise	120
4.4 – INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA E CITOTOXICIDADE CUTÂNEA	121
4.5 – MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CUTÂNEA	121
4.5.1 – Determinação da Viabilidade Celular mediante Microanálise por Energia Dispersiva de Raios X	121
4.5.2 – Determinação da Expressão Génica global mediante <i>Microarrays</i>	126
4.6 – INSTRUMENTOS DE RECOLHA DE DADOS	127
4.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	127
4.7.1 – Determinação da Viabilidade Celular mediante Microanálise	127
4.7.2 – Determinação da Expressão Génica mediante <i>Microarrays</i>	128
4.8 – CRONOGRAMA	129
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	130
5.1 – DISCUSSÃO DE RESULTADOS ESPERADOS E ABORDAGEM FUTURA	130
5.2 – CONCLUSÕES	130
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Síndromes dolorosas em doentes oncológicos	Pág. 26
Tabela 2	Número de doentes que é Necessário a Tratar para alívio da dor (NNT) para os vários fármacos utilizados em diferentes tipos de DNe	Pág. 34
Tabela 3	Classificação do nível de evidência por tratamento usado na PND, NPH e DNe central, com as recomendações para as primeiras, segunda e terceira linhas de tratamento, segundo a revisão de Attal <i>et al.</i> , em 2010	Pág. 49
Tabela 4	Distribuição da localização por dermatomos das lesões de HZ em indivíduos imunocompetentes, de acordo com a sua prevalência relativa	Pág. 52
Tabela 5	Fatores de risco associados a uma maior incidência de infeção por HZ	Pág. 53
Tabela 6	Fatores de risco para a NPH de acordo com o grau de evidência	Pág. 58
Tabela 7	Sumário dos ensaios clínicos randomizados e controlados de vários fármacos utilizados no tratamento da DNe por NPH	Pág. 65
Tabela 8	Critérios de avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	Pág. 104
Tabela 9	Distribuição dos tipos de ensaios de avaliação da viabilidade celular e respetivos métodos de avaliação possíveis	Pág. 105
Tabela 10	Perfil de temperaturas e intervalos de tempo utilizados para a criodissecação das amostras num sistema de alto vazio	Pág. 123
Tabela 11	Cronograma de Projeto	Pág. 129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I	Representação esquemática da história natural da infeção por Herpes Zoster e da Nevralgia Pós-Herpética	Pág. 57
Figura II	Representação esquemática e histológica da pele humana	Pág. 94

SIGLAS

AAFP	<i>American Academy of Family Physicians</i>
AAN	<i>American Academy of Neurology</i>
ADT	Antidepressivos Tricíclicos
ATP	Adenosina 5-Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCS	<i>Bovine Calf Serum</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CBZ	Carbamazepina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPS	Contas Por Segundo
ddH ₂ O	Água bidestilada
DGS	Direção Geral de Saúde
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNe	Dor Neuropática
EDAX	Energia Dispersiva de Raios X
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFNS	<i>European Federation of Neurology Societies</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EPXMA	Microanálise por Energia Dispersiva de Raios X
ESAS	<i>Edmonton Symptom Assessment Scale</i>
EST	Sequências Gênicas Expressadas
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FHD	Fibroblastos Humanos Dérmicos
HCl	Ácido clodrídrico

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA
CRÔNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR**

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HZ	Herpes Zoster
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IMAO	Inibidores da Monoaminoxidase
INE	Instituto Nacional de Estatística
IRSN	Inibidores de Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
LDH	Lactato Desidrogenase
MBSM	<i>Minimally Supplemented Basal Medium</i>
MEA	Microscopia Eletrônica Analítica
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MTT	Teste de Azul de Tiazol Colorimétrico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NeuPSIG	<i>Assessment Committee of the Neuropathic Pain Special Interest Group</i>
NHS	<i>National Health Security</i>
NICE	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NNT	Número Necessário a Tratar
NPH	Nevralgia Pós-Herpética
NPS	<i>Neuropathic Pain Scale</i>
NRS	<i>Numerical Rating Scale</i>
NSCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NT	Nevralgia do Trigémio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXC	Oxcarbazepina
PBS	Tampão Salino de Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PND	Polineuropatia Diabética
PNP	Polineuropatia
QHE	Queratonócitos Humanos Epidérmicos

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO *PATCH* DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA CRÓNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR

QT	Quimioterapia
RCT	Ensaio controlado e randomizado
RNA	Ácido rinonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT	Radioterapia
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso Central
SORT	<i>Strength of Recommendation Taxonomy</i>
T3	Triiodotironina

1 - INTRODUÇÃO

A dor é definida pela *International Association for the Study of Pain (IASP)*, como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com uma lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos que evocam essa lesão (IASP, 1994) (DGS, 2010) (Pergolizzi *et al.*, 2010). A dor crónica mal controlada deteriora a qualidade de vida e tem implicações físicas, psicológicas, familiares, sociais e económicas (Brennan *et al.*, 2007) (Pergolizzi *et al.*, 2010).

O aumento da longevidade, a que assistimos nas últimas décadas, acarretou um aumento significativo da prevalência de doenças crónicas, incluindo as neoplasias. Em cada ano surgem cerca de dez milhões de novos casos de cancro em todo o mundo, estimando-se que no ano 2020 este número duplique (Brennan *et al.*, 2007). Segundo os dados de 2005 do Instituto Nacional de Estatística (INE), morreram 22582 pessoas por doença oncológica, sendo esta a segunda maior causa de morte em Portugal. Apesar dos progressos técnico-científicos, muitos doentes atingem uma fase da doença em que o tratamento antineoplásico não atua ou se torna demasiado agressivo para as suas condições físicas (Gonçalves, 1998). Os Cuidados Paliativos assumem um papel fundamental nestes doentes. A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2002, definiu os Cuidados Paliativos como uma “abordagem que visa melhorar a qualidade de vida dos doentes e suas famílias, que enfrentam problemas decorrentes de uma doença incurável e com prognóstico limitado, através da prevenção e alívio do sofrimento com recurso à identificação precoce e tratamento rigoroso dos problemas, não só físicos, como a dor, mas também psicossociais e espirituais”. Assim, o controlo da dor assume-se como uma das componentes fundamentais dos Cuidados Paliativos. A dor não é um sintoma inevitável da patologia oncológica, mas estima-se que cerca de 70% destes doentes tenham dor, quer causada pela própria doença, quer pelo tratamento (Brennan *et al.*, 2007). Nos doentes com patologia avançada, 40 a 50% dos doentes descrevem a dor como moderada a intensa e 25 a 30% como dor muito intensa (De Barutell, 2002) (Brennan *et al.*, 2007). Estudos de controlo de dor nos doentes oncológicos revelam que cerca de metade apresentam uma analgesia inadequada (Brennan *et al.*, 2007). Assim, facilmente se entende, por um lado, a priorização dada pela OMS aos cuidados paliativos, no âmbito do programa mundial de controlo do cancro e de outras doenças crónicas e, por outro, a aposta na melhoria do controlo da dor.

A dor neuropática (DNe) é definida pelo grupo de estudo da dor neuropática da IASP (*NeuPSIG*) como uma “dor produzida em consequência direta de uma lesão ou patologia que afeta o sistema somatossensorial” (Dworkin *et al.*, 2010). Este tipo de dor assume-se como uma das síndromes dolorosas de maior dificuldade de tratamento dada a variabilidade etiológica e fisiopatológica e dada a dificuldade em obter um controlo sintomático efetivo com as armas terapêuticas disponíveis (Miranda *et al.*, 2009) (Attal *et al.*, 2010). Nos doentes em Cuidados Paliativos, nomeadamente do foro oncológico, é frequente a existência de neuropatias. A realização prévia de cirurgia (mastectomia, por exemplo), quimioterapia ou radioterapia pode induzir neuropatias periféricas (Cruciani *et al.*, 2006). Podem ocorrer compromissos de estruturas nervosas periféricas devido a invasão e/ou compressão tumoral (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). O estado de imunossupressão causado pela própria neoplasia ou por tratamentos oncológicos favorece a ocorrência de infeções oportunistas como o Herpes Zoster (HZ) (Cruciani *et al.*, 2006), que podem evoluir para nevralgia pós-herpética (NPH), sobretudo nos mais idosos e imunodeprimidos (Attal *et al.*, 2006) (Cebrian-Cuenca *et al.*, 2010). A NPH pode ser extremamente dolorosa e debilitante, afetando sobremaneira a qualidade de vida destes doentes, já de si fragilizados (Wolff *et al.*, 2010). A NPH afeta 10 a 70% dos doentes com infeção por HZ. De acordo com o estudo efetuado por Cebrian-Cuenca *et al.* (2010), cerca de 46% dos doentes com NPH apresentavam patologias concomitantes, sendo 11,5% imunodeprimidos devido a cancro ou a terapêutica imunossupressora. Outro estudo reporta uma incidência de HZ em doentes com neoplasia, infeção por vírus imunossupressor humano (HIV) ou transplantação na ordem de 10,3 por 1000 habitantes por ano (Insinga *et al.*, 2005).

O controlo da DNe assume-se, então, como um desafio nos doentes oncológicos e nos Cuidados Paliativos. Nestes doentes é imprescindível a ponderação racional e cuidadosa dos benefícios, riscos e efeitos adversos de cada opção terapêutica, no sentido do conforto e melhor qualidade de vida. Não esquecer que, mesmo quando aplicado o tratamento adequado, é difícil conseguir um controlo eficaz da DNe, muitas vezes devido ao difícil balanço entre o alívio da dor e a tolerabilidade aos efeitos adversos dos diferentes fármacos. Assim, é importante tentar descobrir e validar novas formas de alívio da dor, garantindo menores efeitos secundários e com o máximo conforto para os doentes em Cuidados Paliativos. Acredita-se que os emplastros medicamentosos poderão ser uma alternativa viável para evitar alterações gástricas, metabolismo de primeira passagem hepática ou variabilidade na

concentração sanguínea, característicos das formulações orais ou injetáveis (Jorge *et al.*, 2010).

A lidocaína tópica é uma terapêutica de primeira linha no tratamento de doentes com dor neuropática periférica localizada, particularmente, em doentes com NPH e alodinia, em várias recomendações internacionais. O *patch* de lidocaína a 5% é considerado adequado ao tratamento local da DNe mesmo nos idosos (Rowbotham *et al.*, 1996) (Gammaitoni *et al.*, 2003) (Davies *et al.*, 2004) (Wasner *et al.*, 2005) (Khaliq *et al.*, 2007) (Jorge *et al.*, 2010). Uma meta-análise de 2011 demonstrou que os tratamentos tópicos, como o *patch* de lidocaína a 5%, podem ser preferíveis no tratamento da NPH relativamente aos tratamentos sistémicos, porque resultaram num alívio da dor com igual eficácia, mas com absorção sistémica mínima e consequentes menos efeitos secundários. No entanto, apesar de advogarem menor significância clínica dos efeitos adversos da terapêutica tópica, o número de estudos ainda é muito limitado, bem como a qualidade e tamanho dos mesmos, sendo necessários estudos mais consistentes (Wolff *et al.*, 2010).

Neste sentido, é pertinente efetuar estudos de toxicidade, de segurança e aplicabilidade da terapêutica tópica com o *patch* de lidocaína a 5%, recentemente aprovado em Portugal para a dor neuropática da NPH, nomeadamente neste tipo de doentes oncológicos. Os efeitos secundários descritos para este fármaco, embora clinicamente pouco graves, são significativamente frequentes, pelo que será de todo o interesse proceder ao seu estudo.

Não obstante a quantidade significativa de ensaios clínicos já existentes, não foram encontrados estudos de citotoxicidade celular da pele com o uso deste emplastro medicamentoso de lidocaína a 5%. Muitos dos estudos apresentados concluíram pela ausência de um número mais significativo de estudos de grandes dimensões, com maior duração e com maior validade metodológica no que diz respeito à avaliação dos efeitos adversos da terapêutica em análise. Não foram encontrados estudos específicos que analisassem o eventual uso dessa terapêutica no contexto específico dos Cuidados Paliativos. Não esquecer que, tratando-se de uma população mais suscetível e fragilizada, maior atenção deve ser dada aos efeitos adversos das medicações antiálgicas instituídas.

Para contornar as questões éticas que poderão ser levantadas pela determinação de toxicidade celular do uso de um fármaco em doentes em Cuidados Paliativos, podemos recorrer a uma metodologia reproduzível e atual – a engenharia tecidual. Estas técnicas inovadoras, além de diretamente aplicáveis na terapêutica, permitem criar modelos de estudo de toxicidade de

fármacos (Gay *et al.*, 1992). A pele tem sido amplamente investigada no âmbito da medicina regenerativa (Dieckmann *et al.*, 2010), existindo já vários modelos de pele humana artificial obtidos por engenharia tecidual.

O estudo que se propõe tem como mais-valias a aplicação de técnicas inovadoras, como a engenharia tecidual, para obtenção de pele humana que permitirá avaliar a existência de toxicidade celular cutânea da aplicação da terapêutica tópica de *patch* de lidocaína a 5%, de forma reprodutível na prática clínica. Isto permite não colocar em causa a segurança dos doentes, garantindo conclusões concretas acerca da possibilidade de utilização segura desta forma terapêutica no melhor controlo da dor dos doentes de Cuidados Paliativos.

Portanto, o presente trabalho tem como finalidade a determinação da citotoxicidade do *patch* de lidocaína a 5%, na pele humana obtida através de técnicas de engenharia tecidual.

Os objetivos científicos deste trabalho pretendem dar resposta à lacuna de estudos existentes no que diz respeito à segurança e efeitos adversos produzidos pela aplicação do *patch* de lidocaína a 5% no tratamento da dor neuropática periférica. Permite aferir a toxicidade cutânea efetiva desse tratamento, fundamentando eventuais doses máximas e tempo de aplicação recomendados nos doentes oncológicos em Cuidados Paliativos. A metodologia aplicada será inovadora, uma vez que utiliza pele humana obtida mediante engenharia tecidual, permitindo assim a obtenção de resultados válidos para a prática clínica sem colocar em causa questões éticas de avaliação de toxicidades em doentes. Caso seja demonstrada a baixa citotoxicidade da aplicação tópica deste fármaco, aliada à evidência científica já consistente da sua eficácia no alívio da DNe periférica, poderá ser um importante passo para a difusão da sua utilização na prática clínica dos Cuidados Paliativos.

2 - ESTADO DA ARTE

2.1 – DOR CRÔNICA ONCOLÓGICA

A Dor é uma entidade multidimensional que envolve nocicepção, aferências para o SNC, modulação, respostas afetivas, analgesia endógena, ajustamentos comportamentais, e alterações nos papéis sociais (Jorge *et al.*, 2010). Tal como já referido no capítulo precedente, a dor é definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradáveis, associadas a uma atual ou potencial lesão tecidular ou algo definido como tal” (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Lynch *et al.*, 2006) (IASP, 2012). As características sensitivas não subjetivas da dor variam, dependendo da sua origem (Hagen, 2010). As características emocionais dependem do contexto social, cognitivo, físico e dos mecanismos de lesão tecidular (Hagen, 2010) (Pergolizzi *et al.*, 2010).

A dor crônica afeta cerca de 20% dos adultos, na Europa e Estados Unidos da América. Muitos deles não apresentam controlo adequado (Varrasi *et al.*, 2010). Um estudo multicêntrico incluindo cinco países europeus (Reino Unido, França, Espanha, Alemanha e Itália), envolvendo mais de 50000 inquiridos, estimou que 49,7 milhões de pessoas (20,27%) referiam dor no mês anterior ao inquérito. Destes, 11,2 milhões (22,47%) apresentavam dor severa, 29,4 milhões (59,20%) com dor moderada e 9 milhões com dor ligeira. A prevalência de dor diária na população foi de 8,85% (Langley, 2011). Segundo Reid *et al.* (2011), os estudos de prevalência de dor crônica na Europa apontam para valores entre os 10 e os 30% na população adulta.

O cancro é um problema de Saúde Pública cada vez mais grave e prevalente (Lynch *et al.*, 2006). Os indivíduos mais idosos são os mais afetados (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). Na América do Norte estima-se que um em três adultos irá desenvolver cancro ao longo da sua vida, com uma taxa de fatalidade de cerca de 50% (Ballantyne *et al.*, 2010). Cerca de 70% dos indivíduos com cancro irão necessitar de cuidados terminais e paliativos para controlo de sintomas (George *et al.*, 1993).

O cancro é frequentemente associado a dor, sendo esta cada vez mais prevalente e mais severa quanto maior a progressão da doença (Ballantyne *et al.*, 2010). Vários estudos epidemiológicos realizados em diferentes países e em diferentes contextos clínicos, sugeriram

que a dor oncológica está presente em cerca de um terço dos doentes sob terapêutica oncológica e em 60 a 90% dos pacientes em estadios avançados da doença (Foley, 2005).

A dor não é um sintoma inevitável das patologias crônicas como o cancro, mas, por vezes, torna-se, ela própria, como um fator de deterioração funcional e psicológica mais intenso do que a própria patologia de base. A dor oncológica pode diferenciar-se das restantes dores pelo facto dos doentes sofrerem também a dor do receio de morrer (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). Bonicas definiu de forma interessante a dor oncológica como “aquela dor provocada por qualquer tumor maligno ou como consequência das intervenções terapêuticas para o tumor ou ambas” (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

Associado à dor oncológica surge, muitas vezes, o sofrimento, o qual pode intensificá-la (e vice versa). Uma das definições mais difundidas de sofrimento é a “sensação individual de ameaça à sua integridade e bem-estar” (Cassel, 1982) (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). Wilson *et al.*, num estudo com 381 doentes oncológicos em estadios avançados, demonstrou que 25% referiam sofrimento moderado a severo, atribuindo a sua dimensão múltipla associada, em grande medida, aos sintomas físicos, mas também ao *distress* psicológico, preocupações existenciais, relacionais e sociais (Wilson *et al.*, 2007). Twycross e Fainfield demonstraram que apenas 41 em 100 doentes oncológicos em estadios terminais apresentavam dor de severidade tal que interfira com a maioria dos aspetos da sua qualidade de vida. Comparando os doentes oncológicos e não oncológicos, verificou-se que os doentes com neoplasia pareciam ser mais receosos, tinham alterações cognitivo-comportamentais mais acentuadas, maior evicção de atividades por medo de agravamento e menos esperança do que os doentes sem neoplasia (Twycross *et al.*, 1982).

A dor oncológica é um estado mórbido multifatorial que deve ser estudado concomitantemente ao tratamento da neoplasia. Como o cancro é uma doença evolutiva, com variações no tipo e na intensidade de dor, é necessária uma reavaliação frequente e uma abordagem global da dor nestes doentes (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). Existem várias ferramentas de avaliação da dor e do sofrimento já validadas (Hagen, 2010), como por exemplo, a *Edmonton Symptom Assessment Scale* (ESAS), utilizada em Cuidados Paliativos, que avalia a dor, o cansaço, náuseas, depressão, dispneia e outros parâmetros, e o *Brief Pain Inventory*, que inclui questões sobre os vários aspetos da dor, funcionamento físico e emocional (Hagen, 2010).

2.1.1 – Epidemiologia da Dor Oncológica

O cancro é um problema de saúde pública crescente, pelo que facilmente se entende a priorização dada pela OMS aos cuidados paliativos no âmbito do programa mundial de controlo do cancro.

Em todo o mundo, estima-se que existam mais de 40 milhões de doentes com cancro. Segundo os dados do relatório de estatística de 2012 da OMS, o número de mortes previstas anualmente por cancro aumentou de 7,6 milhões, em 2008, para 13 milhões, em 2030 (WHO, 2012a). Em Portugal, a taxa de mortalidade por cancro nos indivíduos adultos dos 30 aos 70 anos de idade foi de 161 por 100.000 habitantes, em 2008 (WHO, 2012b). As estimativas apresentadas em 2008 para o ano de 2010 apontavam para uma taxa de mortalidade por cancro superior no sexo masculino: 182,1 por 100.000 habitantes versus 89,3 por 100.000 habitantes (WHO, 2012a). A mortalidade por cancro correspondia a mais de um quarto do total de mortes (WHO, 2012a).

Estima-se que no ano de 2015 o número de novos casos de cancro atinja os 15 milhões. (WHO, 2012a) Muitos destes novos casos serão diagnosticados em estadios já muito avançados, em que a terapêutica curativa já não poderá ser a única solução. De facto, será inevitável optar, em muitas ocasiões, pelas alternativas realistas e humanizadas de alívio da dor e melhoria do conforto e qualidade de vida destes doentes. Além destas patologias, assistimos a um crescendo de outras patologias crónicas, incapacitantes e irreversíveis, como a SIDA, as doenças neurológicas degenerativas e as insuficiências multiorgânicas (renais, cardíacas, pulmonares, entre outras).

A sintomatologia algica foi também descrita por cerca de 70% dos doentes com SIDA e em 64% dos doentes com doença do neurónio motor. Em média, a dor associada a doença crónica situa-se na ordem dos 65%, mais prevalente em indivíduos com idade superior a 65 anos (George *et al.*, 1993) (Brennan *et al.*, 2007).

A dor também é um problema muito frequentemente associado às neoplasias (Fitzgibbon, 2010a). A prevalência da dor em doentes com cancro varia entre 24% a 60%, em doentes sob terapêutica antineoplásica (Fitzgibbon, 2010a) e 62% a 86% em doentes com cancro em estadio avançado (Hwang *et al.*, 2004) (Wilson *et al.*, 2004) (Bradley *et al.*, 2005). Van den Beuken-van Everdingen *et al.* (2007) reportaram uma prevalência de dor em pacientes com neoplasia de acordo com o estadio da doença, o tratamento e a sobrevida na ordem dos 64%

em doentes com estadio avançado da doença, metastização ou estadio terminal; 59% em doentes sob tratamento antineoplásico e 33% em doentes já em estadio de cura do cancro.

Uma revisão sistemática de 52 estudos estimou que a prevalência de dor nos doentes com cancro é superior a 50% (Varrasi *et al.*, 2010).

A incidência da dor oncológica dependerá, então, além de outros fatores, do tipo e do estadio da patologia subjacente. No momento do diagnóstico e nos estadios intermédios da doença, cerca de 30-45% dos doentes apresentam dor. Esta percentagem ascende aos 75% nas fases avançadas e terminais da doença. Destes, 40 a 50% dos doentes descrevem a dor como moderada a intensa e 25 a 30% como dor muito intensa (De Barutell, 2002) (Brennan *et al.*, 2007). Segundo Whizar-Lugo *et al.* (2005), 75% a 90% dos pacientes em estadio avançado de cancro têm dor que afeta as atividades de vida diária e a qualidade de vida. No momento do diagnóstico estimam que 20% a 50% dos doentes já manifesta dor, a qual é estimada em 33% dos doentes sob terapêutica antineoplásica (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

A dor oncológica de tipo neuropático é um problema comum nos doentes com cancro. A incidência de DNe em doentes oncológicos referenciados a unidades de Cuidados Paliativos foi estimada em 17% (Fleming *et al.*, 2009).

No que diz respeito ao modelo de cuidados paliativo, a dor é sempre vista como inútil e lesiva. O mecanismo da dor e a patologia de base é, por norma, já conhecido, sendo a dor potencialmente lesiva à homeostasia do doente paliativo. Há evidências controversas de que o controlo da dor influencia a sobrevida destes doentes (Fleming *et al.*, 2009). Outros componentes, como o distress psicológico, a alteração da situação social, alterações emocionais, alterações do sono e da qualidade de vida ou questões de espiritualidade devem ser tomados em consideração na abordagem da dor. O objetivo dos cuidados paliativos será aliviar o sofrimento e os sintomas no processo de doença, com ênfase na qualidade de vida e conforto do doente como um todo (George *et al.*, 1993).

2.1.2 – Fatores de Risco de Dor Oncológica

Foram descritos um conjunto de fatores que contribuem para a maior probabilidade de ocorrência de dor oncológica, sua severidade e diferentes métodos de abordagem terapêutica (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Lynch *et al.*, 2006) (Hagen, 2010):

1 – Extensão da Doença

A localização e o estadió da doença neoplásica influenciam a variabilidade da dor oncológica. Menos de 15% dos doentes com cancro não metastático descrevem queixas dolorosas. Quando a dor é o primeiro sintoma de cancro, há maior probabilidade deste ser mais agressivo e, talvez por essa razão, a dor oncológica possa ser considerada em fator preditor de prognóstico independente da sobrevida. Segundo Bonica, a dor incide em 85% das neoplasias ósseas e do cérvix uterino, 70% a 75% nas neoplasias gástricas, 50 a 70% nas neoplasias do pulmão, 70% nas do pâncreas e genitais femininos, 60 a 75% nas neoplasias genitais masculinas, 55% a 68% no carcinoma da mama, 50% a 60% nas neoplasias colorrectais, 55% no rim e 5% nas leucemias (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

2 – Grupos populacionais específicos quanto à idade (crianças, adultos jovens, adultos ou idosos)

A dor oncológica é igualmente prevalente em todas as idades. Contudo, há características particulares da dor em cada faixa etária. Na população pediátrica, a dor associada aos tratamentos oncológicos é muito prevalente (relacionado com a elevada prevalência relativa de tumores hematológicos e sarcomas). Nas crianças torna-se particularmente importante atender ao medo da dor provocada pelos procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Mas facilmente são ensinados a gerir a sua dor e a analgesia, no sentido de lhes proporcionar uma vida “tão normal quanto possível”. Nos adultos em idade ativa, a dor oncológica está muitas vezes associada também a fatores psicossociais tais como a necessidade de manter o papel parental, as obrigações financeiras, o medo da dependência, o *distress* emocional. Nesta população geralmente há indicação para abordagens terapêuticas mais agressivas, o que pode, por si só, ser um desencadeante da dor. Na população geriátrica a presença frequente de comorbilidades e polimedicação pode interagir com a abordagem analgésica, sendo mais frequente a necessidade de ajustes posológicos. Além disso, a sua capacidade de manter a homeostase está mais reduzida pelo que a terapêutica deve ser ainda mais cautelosa.

3 – Grupos populacionais específicos por etnias

Alguns grupos étnicos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de cancro. Cerca de 90% da população com cancro do Médio Oriente apresentam doença em estadió avançado e incurável. Alguns tipos de cancro também têm maior prevalência em determinadas populações. A diversidade cultural traduz-se em diferentes formas de lidar com a dor e com o sofrimento, requerendo abordagens terapêuticas diversas.

4 – Comorbilidades associadas a tipos específicos de cancro

Alguns fatores de risco e/ou comorbilidades estão associados à maior suscetibilidade de alguns tipos de neoplasias e podem influenciar a sua evolução, o aparecimento de dor e a resposta à analgesia. Como exemplos, refiram-se o tabagismo, a doença hepática ou renal.

5 – Pacientes Reclusos

Um estudo de prevalência de neoplasias, estimou uma incidência maior para os tumores do pulmão, cabeça e pescoço, colo do útero e linfoma não-*Hodgkin*. Inferiram uma maior prevalência de cancro, uma maior prevalência de dor oncológica e uma menor sobrevida neste grupo de doentes (Mathew, 2005).

6 – Pacientes com antecedentes de abuso de substâncias

Cerca de 15% dos homens adultos das sociedades ocidentais abusam do álcool. Uma percentagem menor da população abusa de outras drogas ilícitas. Nos doentes com neoplasia e passado de adição é particularmente difícil gerir a terapêutica da dor – há maior sintomatologia, mais interferências com a dor, mais distress e maior número de comportamentos de risco.

Como outros fatores de risco para a dor em doentes com cancro enumeram-se o tratamento antineoplásico efetuado, o tipo de fármaco analgésicos, o tratamento realizado em ambulatório, em hospital ou unidade de cuidados continuados, entre outros (Hagen, 2010).

2.1.3 - Etiologia e Fisiopatologia da Dor Oncológica

A dor oncológica pode ser causada por: (1) neoplasia propriamente dita, sua progressão natural e patologia associada; (2) procedimentos cirúrgicos ou outras atitudes diagnósticas ou terapêuticas invasivas; (3) toxicidade da quimioterapia e/ou radioterapia; (4) infeção, como por exemplo NPH; (5) dor muscular pela diminuição da atividade física ou outras condições não diretamente relacionadas com o cancro (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Hagen, 2010).

Classificação da Dor Oncológica

Segundo Foley (1979), a dor oncológica pode ser abordada de acordo com a sua etiologia (tabela 1). Também se pode recorrer a classificações de acordo com o tipo de dor (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA CRÓNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR

1 – Dor associada diretamente à neoplasia A – <u>Infiltração Direta</u> 1 – Metástases da Base do Crânio - Forâmen jugular - Clivus - Seios esfenoidais 2 – Metástases dos Corpos Vertebrais - Subluxação do atlas - Metástases C7-T1 - Metástases lombares - Metástases sagradas B – <u>Infiltração do Sistema Nervoso</u> 1 – Neuropatia Periférica 2 – Plexopatia Braquial, Lombar ou Sagrada 3 – Carcinomatose Meníngea 4 – Compressão Neuroaxial C – <u>Infiltração de Visceras Ocas</u> D – <u>Obstrução ou Invasão Vascular</u> E – <u>Ulceração ou Envolvimento das Mucosas</u>	2 – Dor associada ao tratamento antineoplásico A – <u>Pós-Cirurgia</u> 1 – Dor aguda Pós-Operatória 2 – Dor crónica Pós-Cirurgia - Pós-toracotomia - Pós-mastectomia - Pós-cirurgia radical do colo - Pós-amputação B – <u>Pós-Quimioterapia</u> 1 – Neuropatia Periférica 2 – Pseudoreumatismo esteroide 3 – Necrose óssea asséptica C – <u>Pós-Radioterapia</u> 1 – Fibrose de Plexos 2 – Mielopatia 3 – Tumores de nervos periféricos D – <u>Relacionado com Procedimentos Diagnósticos</u> 1 – Aspiração Medular 2 – Punção Lombar 3 – Punção Venosa
3 – Dor não relacionada com a neoplasia nem com o seu tratamento A – <u>Neuropatia Diabética</u> B – <u>Canal Espinhal Estreito</u> C – <u>Herpes Agudo, Nevralgia Pós-Herpética</u> D - <u>Osteoartrite</u>	
4 – Dor associada à debilidade	
5 – Dor associada a Síndromes Paraneoplásicas	

Tabela 1 – Síndromes dolorosos em doentes oncológicos (adaptado de Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

Tipos de Dor

A dor pode ser subdividida em quatro tipos principais: dor nociceptiva (somática e visceral), dor neuropática, dor disfuncional e dor inflamatória (Lynch *et al.*, 2006) (Cruciani *et al.*, 2006) (IASP, 2008) (Costigan *et al.*, 2009).

Caraceri e Portenoy (1999) publicaram um ensaio clínico internacional sobre as características da dor oncológica e concluíram que 71,6% dos doentes tinham dor nociceptiva somática, 34,4% dor nociceptiva visceral e em 39,7% dos doentes a dor ocorria por mecanismos neuropáticos.

A dor nociceptiva resulta da ativação dos nociceptores das estruturas somáticas e viscerais, a qual está relacionada com a extensão e localização do dano tecidular, associada à resposta inflamatória que sensibiliza ainda mais os nociceptores (Cruciani *et al.*, 2006).

A dor somática tem origem no osso, músculo, ligamento, tecido subcutâneo ou pele. Geralmente é sentida como cortante ou contínua ou opressiva. É tipicamente bem localizada, sendo menos comum a sua dor referida a localização cutânea característica do tecido de origem.

A dor visceral tem origem em órgãos como pulmão, bexiga ou fígado. Geralmente é descrita como dor tipo moedouro ou cortante (se compromisso da cápsula ou mesentério). Frequentemente é mal localizada, podendo ser referida a localizações distantes.

A DNe resulta de alterações do sistema nervoso central ou periférico, baseando-se o seu diagnóstico na deteção de lesões neurológicas e de anomalias da sensibilidade como parestesia, disestesia, hiperalgesia e alodinia (hipersensibilidade dolorosa ao toque ligeiro ou outros pequenos estímulos) (Cruciani *et al.*, 2006) (IASP, 2012). Os sintomas são descritos como dor afiada, ardor, prurido, queimadura ou choque elétrico (Hagen, 2010). A DNe pode ser dividida, quanto à sua origem, em: (1) Central, como por exemplo, dor pós acidente vascular cerebral (AVC) ou por esclerose múltipla e (2) Periférica, como por exemplo, NPH, polineuropatia diabética (PND), neuropatia pós quimioterapia ou pós radioterapia. Esta divisão tem implicações na abordagem terapêutica (Cruciani *et al.*, 2006). A DNe periférica pode desencadear DNe central através de alterações no corno anterior da medula. A persistência da DNe deve-se ao processamento somatossensitivo aberrante no sistema nervoso central ou periférico. A lesão dos nervos periféricos pelo tumor, pela cirurgia, radioterapia (RT) ou quimioterapia (QT) são as mais frequentes nos doentes com cancro (Cruciani *et al.*, 2006). Os mecanismos pelos quais as neoplasias podem atingir os componentes do sistema

nervoso periférico são heterogêneos e incluem: invasão local, compressão, infiltração direta, disseminação perineural e, raramente, metástases intraneurais (Fleming *et al.*, 2009) (Fitzgibbon, 2010a). A compressão e a invasão dos nervos pela neoplasia resultam na destruição das fibras mielinizadas e não mielinizadas e do tecido de suporte perineural. A infiltração das estruturas nervosas por tecido tumoral é o principal mecanismo lesivo, já que os nervos periféricos podem facilmente “escapar-se” ao efeito de compressão local. A lesão indireta dos nervos periféricos por mecanismos patogénicos desconhecidos também pode ocorrer no contexto de algumas condições malignas, como por exemplo, a síndrome paraneoplásica. A infiltração tumoral para as fendas neuronais é frequente mas, geralmente, não causa dor (Fitzgibbon, 2010a). Note-se que, por vezes, a fenda perineural pode ocultar a infiltração tumoral, sendo as alterações degenerativas dos axónios apenas visíveis na análise histoquímica. A infiltração massiva e dolorosa de um plexo nervoso ou de nervos individuais ocorre principalmente nos carcinomas da mama e nas recidivas ou metástases da parede torácica de neoplasia do pulmão. Os tumores primários do tecido nervoso podem originar, por si só, destruição axonal dolorosa. A compressão geralmente desencadeia dor apenas quando os nervos afetados não conseguem escapar, como acontece, por exemplo, nas raízes nervosas espinhais. As compressões e invasões nervosas pelo tumor implicam vários processos degenerativos, regenerativos e outros mecanismos fisiopatológicos. Quando o neurónio aferente é atingido ocorre um processo reativo de reparação, com alterações bioquímicas. O neurónio perde os seus neuropeptídeos, atrofia e degenera. Provavelmente sofre um processo semelhante ao que ocorre por outros agressores mecânicos e alterações elétricas (Fitzgibbon, 2009).

A dor nociceptiva pode coexistir com a DNe (como por exemplo, na dor torácica no carcinoma de pulmão), podendo designar-se de dor mista. Esta designação também pode ser aplicada à presença de dor somática por múltiplos mecanismos (exemplo, metástases múltiplas umerais contíguas e espasmo muscular e alterações articulares do ombro por imobilidade) (Hagen, 2010).

Mecanismos da Dor Oncológica (Hagen, 2010)

Nos doentes com cancro a dor neuropática surge frequentemente associado a lesões dos nervos periféricos causadas pelo próprio tumor (compressão, infiltração ou distensão) ou pelas terapêuticas aplicadas, nomeadamente, cirurgia, quimioterapia ou radioterapia, ou ainda

mediante mecanismo paraneoplásicos (Fleming *et al.*, 2009). Esta componente da dor pode ser de importância extrema na adequação da terapêutica farmacológica, dado que a sua resposta aos opióides é variável, podendo os doentes com DNe associada ao cancro apresentar uma maior resistência ao tratamento, comparativamente aos doentes com outro tipo de dor. Os analgésicos secundários ou coadjuvantes assumem um papel importante no tratamento deste tipo de dor. Os bloqueios simpáticos também podem ter um papel específico em alguns casos e os bloqueios neurolíticos poderão ter indicação apenas quando os mecanismos centrais estão em causa. Recentemente surgiu o *patch* de lidocaína a 5% de uso na dor neuropática da NPH, cuja utilização neste tipo de doentes oncológicos nos parece importante testar.

Causas de Dor Oncológica

A maioria dos casos de dor resulta de uma ou mais causas principais de dor oncológica (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Cruciani *et al.*, 2006):

- (1) Consequência direta do tumor (exemplos: envolvimento tumoral de osso, obstrução de órgãos ocos, compressão tumoral de nervos);
- (2) Consequência indireta do tumor (exemplos: infeções, distúrbios metabólicos, oclusão linfática ou venosa);
- (3) Consequência da terapêutica antineoplásica (cirurgia, QT ou RT);
- (4) Consequência de patologia concomitante;
- (5) Sem relação com o cancro (exemplos: cefaleia, PND, problemas miofasciais);
- (6) Consequência do estado de caquexia;
- (7) Associada a síndromes paraneoplásicos.

Vários fatores influenciam a dor oncológica: tipo de neoplasia primária, estadio da doença, fatores do humor do doente (ansiedade, depressão), entre outros (Glover *et al.*, 1995) (Twycross *et al.*, 1996) (Vainio *et al.*, 1996). Por exemplo, nas neoplasias orofaciais é comum a ocorrência de infeções decorrentes da terapêutica oncológica (cirurgia, QT ou RT), nomeadamente infeção por vírus HZ, que se traduz, quer em dor aguda, quer em NPH. Em doentes sujeitos a transplante de medula óssea surge, em mais de 90% dos casos, dor por infeção da mucosa oral por vírus HZ (Epstein *et al.*, 2010). A NPH ocorre sobretudo nos doentes oncológicos mais idosos e com imunodepressão mais severa.

Em muitas neoplasias há uma associação significativa entre a dor oncológica e a presença de metástases (exceto no carcinoma da mama e da próstata).

A DNe induzida pela QT é muito frequente. (Cruciani *et al.*, 2006) Este tipo de tratamento pode gerar, como efeito secundário, dor por neuropatia periférica tóxica, variável de acordo com o agente antineoplásico em uso (Cruciani *et al.*, 2006). Pode manifestar-se por parestesias dolorosas, hiporreflexia e, menos frequentemente, disfunção autonómica e perda motora ou sensorial. Os fármacos mais frequentemente associados são: alcaloides (vincristina, principalmente), antimetabólicos taxanos (paclitaxel, sobretudo), compostos à base de platina (cisplatina) e interferon, entre outros. Na maioria dos casos, a DNe começa nos dedos de mãos e pés, podendo estender-se às quatro extremidades com intensidade severa e incapacitante. As queixas de dor, picada, perda da propriocepção e da sensibilidade vibratória podem interferir com as atividades da vida diária (Cruciani *et al.*, 2006). A cisplatina origina neuropatia severa e dolorosa nas mãos e pés, que se estende aos quatro membros. A oxaliplatina é menos tóxica do que a anterior, podendo produzir parestesias e disestesias dependentes da dose que se resolvem facilmente em cerca de 85% dos casos. O paclitaxil origina parestesias de mãos e pés em 60% dos doentes sujeitos a dosagens mais baixas, ascendendo aos cerca de 100% dos doentes em doses maiores, com maior severidade da neuropatia sensorial e até motora. A talidomida pode produzir neuropatia axonal sensorial. A vincristina é o alcaloide da vinca mais neurotóxico e pode originar neuropatia periférica motoro-sensitiva que interfere com a motricidade fina e debilidade da dorsiflexão do pé com marcha típica (Cruciani *et al.*, 2006).

Num estudo prospetivo de Grond *et al.* (1996), envolvendo 2266 doentes com cancro, foi feita a localização, etiologia e fisiopatologia dos síndromes dolorosos e concluiu-se que: 30% tinham apenas um tipo de dor, 39% dois tipos de dor e 31% mais do que dois tipos de síndromes dolorosos. A maioria era causada pela própria neoplasia (85%) ou pelo tratamento antineoplásico (17%), estando apenas 9% das síndromes dolorosas associados a doenças relacionados com o cancro e 9% dos casos devido a uma etiologia diferente. Classificaram a dor como dor nociceptiva óssea (35%), dos tecidos moles (45%) ou das vísceras (33%) ou dor neuropática (34%). As localizações dolorosas variaram consoante a localização tumoral (Grond *et al.*, 1996).

A RT aplicada nas leucemias pode desencadear plexopatia do plexo braquial até seis meses após terminado o tratamento. Usualmente os sintomas secundários à radiação refletem primariamente o compromisso da porção superior do plexo (Cruciani *et al.*, 2006).

Além da dor que pode resultar dos tratamentos cirúrgicos, RT ou QT, pode ocorrer dor pelo uso de esteroides e consequente osteonecrose.

Dor Neuropática Oncológica (Fitzgibbon, 2010a)

A DNe é uma causa comum de dor severa nos indivíduos com neoplasias. O seu controlo pode ser muito difícil. As etiologias mais comuns enumeram-se de seguida: DNe secundária a patologia relacionada com o cancro dos nervos cranianos; Plexopatia; Mononeuropatia relacionada com o tumor; Radiculopatia; Metástases das leptomeninges; Plexopatia braquial; Plexopatia lombossagrada; Infiltração tumoral do sacro e nervos sagrados; Dor radicular ou espinhal; Síndromes dolorosas centrais causadas pelo tumor; Neuropatia Periférica Paraneoplásica; DNe secundária à terapêutica (cirurgia, RT, QT); DNe secundária a infeções (por exemplo, NPH).

Nas crianças a DNe pode ser causada por vários mecanismos: (1) neuropatias periféricas associadas a QT com vincristina (fármaco muito usado nas crianças); (2) compressão neuronal ou invasão pelo tumor, como por exemplo, sarcoma de Ewing; (3) Dor associado a infeção por HZ (reativação devida a supressão do sistema imunológico)

2.1.4 – Estratégias Terapêuticas na Dor Oncológica

O tratamento da dor assume-se como um direito humano indiscutível (Brennan *et al.*, 2007).

O tratamento da dor oncológica por vezes ainda é subóptimo e/ou desadequado. Os fatores enumerados são vários: expectativas limitadas do doente no alívio da dor; pouca certeza e credibilidade do profissional de saúde em aceitar a intensificação da dor; diagnóstico etiológico errado; tratamento desadequado; desconhecimento dos diferentes fármacos; falsas crenças do doente, sua família e do próprio médico quanto à adição, tolerância e toxicidade dos opióides (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Dworkin *et al.*, 2010). Um estudo de controlo da dor oncológica revelou que mais de 50% dos doentes afirmam analgesia inadequada e 30% não estão a fazer o fármaco correto (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

A abordagem da dor oncológica é, ou deve ser, uma componente integral da abordagem integral e compreensiva do cancro (Fleming *et al.*, 2009) (Fitzgibbon, 2010b). A natureza complexa da DNe, bem como a interferência de fatores como a polipatologia multimodal e a polifarmácia, podem originar dificuldades e desafios terapêuticos (Fleming *et al.*, 2009). O tratamento dos doentes com cancro avançado inclui o alívio da dor, com enfoque multidisciplinar na qual a terapêutica do cancro (QT, RT e cirurgia) se integra com o controlo de sintomas. Delinear uma estratégia efetiva de controlo da dor para o indivíduo, requer conhecimento das vias pelas quais a neoplasia, a terapêutica oncológica e a terapêutica analgésica podem interagir naquele indivíduo (Fitzgibbon, 2010b). Importa valorizar e quantificar a dor, estando atento às variações clínicas, prestando cuidados de forma continuada e adequada. Importa tomar especial atenção à repercussão na duração e na qualidade de vida. Especialmente no doente oncológico, devemos integrar essa avaliação da intensidade da dor com outros parâmetros como sejam o alívio da dor, as horas de sono noturnas e a qualidade de vida ajustada à atividade de cada doente, integração social e estado emocional, pois todos estes fatores interferem no estado clínico do doente.

A abordagem da dor nos doentes oncológicos requer uma visão abrangente e flexível, uma vez que os doentes e suas famílias têm necessidades que estão para além do controlo de sintomas. A evolução da dor está dependente de fatores como a progressão da doença e os tratamentos efetuados (Hagen, 2010). O impacto negativo da dor oncológica é influenciado por outros sintomas como a fadiga, a dispneia, a obstipação e as náuseas, entre outros. Alguns estudos demonstraram que cerca de 67% dos doentes em tratamento de QT referem dor e necessidade de analgesia durante o procedimento, enquanto 36% reportam dor com severidade suficiente para diminuir consideravelmente a capacidade funcional (Fitzgibbon, 2010a).

É necessário negociar as abordagens terapêuticas, facilitar as decisões, coordenar os cuidados, tratar e gerir as informações entre a equipa de profissionais. Deve ser garantido o benefício do doente, através do balanço entre os ganhos e os riscos de cada terapêutica.

Nos doentes em final de vida, os mecanismos de dor tornam-se menos relevantes, sendo a abordagem focada no alívio eficiente da dor, de acordo com a sua intensidade e distribuição. Numa crise dolorosa pode ser adequado a sedação paliativa (Hagen, 2010).

Muitos fatores podem interferir com o controlo da dor oncológica, nomeadamente com a medicação oral, janela terapêutica dos fármacos, eficácia da terapêutica psicológica e

procedimentos invasivos de alívio de dor. A terapêutica antineoplásica pode interferir com a terapêutica analgésica, por interação farmacológica ou por acréscimo de dor e outros efeitos secundários dos fármacos antineoplásicos como fadiga e alterações gastro-intestinais. Em oposição, a própria analgesia pode interferir com a terapêutica oncológica, potenciando ou complicando os efeitos secundários ou, de forma positiva, melhorando a sensação de bem-estar e a função do doente (Fitzgibbon, 2010b).

Os princípios básicos do controlo da dor oncológica são (Whizar-Lugo *et al.*, 2005):

- 1 – Modificar a origem da dor através do tratamento antineoplásico e dos seus efeitos anti-inflamatórios;
- 2 – Alterar a perceção central da dor, por exemplo, com uso de analgesia, antidepressivos, ansiolíticos ou terapêutica psicológica;
- 3 – Interferir com a transmissão nociceptiva aferente e eferente, por exemplo, com técnicas anestésicas (bloqueios nervosos) ou procedimentos neurocirúrgicos (mielotomia).

Importa conhecer a neoplasia, o tipo de dor, as comorbilidades, o estado psicológico, familiar, social e emocional. Uma das principais orientações é o estabelecimento de objetivos integrados e individualizados às necessidades dos doentes. Importa reduzir os efeitos secundários, adequar às expectativas, conforto e esperança de vida (Whizar-Lugo *et al.*, 2005).

O controlo da dor é, então, um objetivo prioritário no tratamento do cancro. Como é uma doença muito comum e debilitante, tratamentos agressivos para controlo da dor são imprescindíveis para melhorar a qualidade e quantidade de vida dos doentes (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Fitzgibbon, 2010b). O tratamento farmacológico é universalmente aceite como o primeiro e mais importante no controlo da dor oncológica. A estratégia é delineada de acordo com a severidade da dor e dos efeitos secundários (Fitzgibbon, 2010b). Essa estratégia baseia-se em: selecionar os analgésicos adequados; prescrever a dose correta; escolher a via de administração apropriada; optar por intervalos posológicos otimizados; prevenir a dor persistente e tratar a dor irruptiva; titular eficazmente a dose dos fármacos e prevenir, antecipar e manejar os seus efeitos secundários (Fitzgibbon, 2010b).

Os Cuidados Paliativos são um componente integrado no tratamento oncológico cujo objetivo é aliviar eficazmente os sintomas e manter a máxima funcionalidade e bem-estar emocional durante a vida dos doentes (Hagen, 2010). Na abordagem da dor em contexto de Cuidados Paliativos é fundamental a avaliação custo-benefício da terapêutica a instituir e o custo

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA
CRÓNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR**

clínico. Importa comprovar a não toxicidade do fármaco, pois na fase terminal de doença não será aceitável a toxicidade relacionada com o tratamento e a dor iatrogénica (George *et al.*, 1993).

Focando-nos na abordagem terapêutica da dor neuropática, foco de estudo do trabalho em desenvolvimento, apresenta-se a tabela resumo dos principais fármacos (a desenvolver nos capítulos subsequentes) utilizados no controlo da DNe e respetiva eficácia, segundo revisão sistemática baseada na evidência efetuada em 2007 (Fitzgibbon, 2010b) – Tabela 2.

Fármacos	Nº Ensaios Clínicos	DNe central	DNe periférica	PNP dolorosa	NPH	Lesão nervo periférico	Nevralgia Trigémio	DNe mista
ADT	16	4,0	2,3	2,1	2,8	2,5	ND	NA
IRSN	2	ND	5,1	5,1	ND	NA	ND	ND
Gabapentina/ Pregabalina	4	NA	4,0	3,9	4,6	NA	ND	8,0
Opióides	6	ND	2,7	2,6	2,6	3,0	ND	2,1
Tramadol	1	ND	3,9	3,5	4,8	ND	ND	ND
Lidocaína tópica	4	ND	4,4	ND	NA	ND	ND	4,4
Capsaicina tópica	11	ND	6,7	11	3,2	6,5	ND	NA
Antagonistas NMDA	5	ND	5,5	2,9	NS	NS	ND	NS
Canabinóides	2	6,0	ND	ND	ND	ND	ND	NS

Tabela 2 – Número de doentes que é Necessário Tratar para alívio da dor (NNT) para os vários fármacos utilizados em diferentes tipos de DNe. (Legenda: NA – Não disponíveis dados dicotómicos; ND – ensaios não realizados; NS – risco relativo não significativo; ADT –

antidepressivo tricíclico; PNP – polineuropatia; IRSN – Inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina) (adaptado de Fitzgibbon, 2010b).

Segundo as recomendações escocesas para o tratamento da dor crónica em adultos, de fevereiro de 2006 (*NHS Quality Improvement Scotland best practice statement on the management of chronic pain in adults*) os fármacos recomendados no tratamento da DNe eram: antidepressivos tricíclicos (sendo a amitriptilina a melhor estudada); anticonvulsivantes (gabapentina parece ser a mais eficaz); e tramadol. Os antidepressivos tricíclicos seriam considerados o tratamento inicial de eleição. As outras preparações tópicas aprovadas para o tratamento da NPH seriam a capsaicina. Os antiepiléticos (gabapentina e pregabalina) também estariam aprovados para tratamento de DNe periférica.

Segundo o *National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE)*, relativamente ao tratamento da DNe oncológica em adultos em Cuidados de Saúde Primários foram apenas encontrados, até revisão de 2006: um ensaio clínico randomizado, controlado comparando a amitriptilina ao placebo, um ensaio clínico randomizado e controlado comparando a gabapentina e o placebo e nenhum ensaio clínico controlado randomizado a avaliar a pregabalina (Brogan, 2010).

A DNe e a sua abordagem terapêutica serão objeto de estudo mais detalhado em capítulos posteriores.

2.2 – DOR NEUROPÁTICA

Relembrando a definição de DNe elaborada pelo grupo de estudo da DNe da *International Association for the Study of Pain (IASP) - Assessment Committee of the Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG)*, a DNe é a “dor produzida em consequência direta de uma lesão ou patologia que afeta o sistema somatossensorial” (Treede *et al.*, 2008) (Miranda *et al.*, 2009) (Dworkin *et al.*, 2010) (Plested *et al.*, 2010) (IASP, 2010) (NICE, 2010) (DGS, 2011). Descrita como uma sensação e/ou experiência emocional desagradável, a DNe pode ter impacto significativo nas atividades de vida diária, na qualidade de vida, no estado de saúde e bem-estar físico, psicológico, emocional e económico (Wolff *et al.*, 2010). As consequências

da DNe na qualidade de vida são comparáveis às dos doentes com cancro ou com insuficiência cardíaca congestiva, e é agravado pelo facto de ser ainda subdiagnosticada e subtratada (Taylor, 2006).

Este tipo de dor assume-se como uma das síndromes dolorosas de maior dificuldade de tratamento dada a variabilidade etiológica (Miranda *et al.*, 2009) (Eisenberg *et al.*, 2010) (Dworkin *et al.*, 2010) e fisiopatológica e dada a dificuldade em obter um controlo sintomático efetivo com as armas terapêuticas disponíveis (Cruciani *et al.*, 2006) (Attal *et al.*, 2010) (IASP, 2010) (NICE, 2010) (DGS, 2011). Estima-se que apenas 40 a 60% dos doentes com DNe atinjam um alívio significativo (Dworkin *et al.*, 2007) (Wolff *et al.*, 2010). A dor persistente pode conduzir a sofrimento e *distress* psicológico e diminuição da qualidade de vida (Plested *et al.*, 2010). Segundo Alonso *et al.* (2004), a DNe crónica é responsável por um número médio de perda de dias de trabalho de 5,5 em seis meses (Alonso *et al.*, 2004).

A prevalência exata da DNe permanece desconhecida, mas estima-se que seja superior a 5% na população em geral (Tourrance *et al.*, 2006) (Moulin *et al.*, 2007) (Bouhassira *et al.*, 2008) (Alves, 2009) (Wolff *et al.*, 2010) (DGS, 2011), podendo atingir os 8% (IASP, 2010) (NICE, 2010). Na população europeia, um estudo epidemiológico realizado em 2008, calculou uma prevalência de DNe na ordem dos 8% (Bouhassira *et al.*, 2008). Em 2001, a Escola Nacional de Saúde Pública Espanhola efetuou uma revisão sistemática de 99 publicações, dentro das quais 42 publicações referentes à DNe, verificando uma grande variabilidade na sua prevalência estimada (Galvez *et al.*, 2005). A prevalência das síndromas dolorosas neuropáticas varia de acordo com a patologia médica subjacente. Enquanto a prevalência da NPH se situa nos 8%, a prevalência da lesão nervosa cirúrgica pós-mastectomia pode atingir os 20 a 30% (DGS, 2011). No estudo realizado por Miranda *et al.* (2009) de avaliação do uso de gabapentina e pregabalina no controlo da dor em Unidade de Cuidados Paliativos, foi calculado que dos 96 doentes, 9,3% apresentavam DNe oncológica e 9,3% DNe por NPH.

A DNe tem origem nas vias nervosas, desde o córtex cerebral até às terminações de nociceptores periféricos, subdividindo-se em: (1) Central (cérebro e/ou medula, como por exemplo, dor pós-AVC, por Esclerose Múltipla ou por lesão da medula espinhal) e (2) Periférica (nervos periféricos, plexos nervosos, gânglios das raízes dorsais ou raízes; como exemplos comuns, enumerem-se a radiculopatia lombar ou cervical, a PND e a NPH) (Cruciani *et al.*, 2006) (DGS, 2011) (Eisenberg *et al.*, 2010).

A DNe é desencadeada por alterações na transmissão normal do impulso nervoso, quer nas terminações nervosas periféricas, quer no gânglio da raiz dorsal da medula espinhal, no corno posterior da medula e no córtex somatossensorial (Cruciani *et al.*, 2006). Além disso, verificam-se também modificações nas propriedades elétricas dos neurónios normais remanescentes. Em resposta ao aumento da expressão de fatores de crescimento neuronal, citocinas e seus recetores, os neurónios desencadeam atividade espontânea, convertendo essas substâncias em potenciais ferramentas farmacológicas (Cruciani *et al.*, 2006).

Os sinais e sintomas de DNe são: dor espontânea (dor existente sem estimulação), contínua ou intermitente, e/ou dor evocada (com resposta anormal à estimulação térmica ou mecânica); podem ser positivos (hiperalgesia, hiperestesia ou alodinia) e/ou negativos (hipostesia) (DGS, 2011) (Cruciani *et al.*, 2006) (Plested *et al.*, 2010) (IASP, 2012). A DNe pode ser contínua ou intermitente, sendo geralmente descrita como “queimadura, ardor, dor ou parestesia” (Eisenberg *et al.*, 2010) (DGS, 2011) (IASP, 2012).

A alodinia é definida pela sensibilidade anormal no local da dor perante um estímulo comum inócuo, como a água corrente ou a brisa (Yarnitsky *et al.*, 1998) (Cruciani *et al.*, 2006) (Plested *et al.*, 2010).

A classificação etiológica da DNe tem em conta quatro parâmetros principais: (1) Duração da sintomatologia; (2) Distribuição dos sinais e sintomas; (3) Tipos de fibras nervosas afetadas (motoras, sensitivas C, sensitivas Aδ ou autonómicas) e (4) Localização primária da patologia (axónio ou mielina).

A presença de dor e as suas características variam com a síndrome neuropática subjacente (Cruciani *et al.*, 2006). Muitos sintomas, como parestesias, sensação de queimadura espontânea e alodinia tátil podem ser correlacionados com a presença de disfunção neurológica (Walk *et al.*, 2010). Como exemplo, refira-se que a alodinia surge de forma quase universal na NPH. Estas variações permitiram a elaboração e validação de questionários de avaliação de DNe.

O tratamento da neuropatia e da DNe é complementar. De facto, o tratamento deve ser dirigido ao processo patológico subjacente e iniciado o mais precocemente possível.

Dado não existir medicação específica eficaz, vários fármacos têm sido usados na DNe, incluindo antidepressivos, anticonvulsivantes, opióides e agentes tópicos (Eisenberg *et al.*, 2010) (Berger *et al.*, 2012).

A maioria dos ensaios clínicos de avaliação da terapêutica analgésica na DNe é feita em doentes com PND ou NPH (Eisenberg *et al.*, 2010) (Dworkin *et al.*, 2010) (NICE, 2010) (IASP, 2010). Os *outcomes* primários mais estudados nos ensaios clínicos mais robustos são os indicadores de alteração da severidade da dor e da qualidade de vida. No entanto, é consensual que devam ser igualmente analisados os sinais e sintomas neuropáticos, de acordo com o quadro clínico individual.

A terapêutica mais ajustada a cada etiologia de DNe não é linear. A evidência da eficácia das várias formas de tratamento é amplamente baseada na evidência de redução do grau de dor na PND, sendo necessário extrapolar para outros síndromas neuropáticos. A quantidade de estudos comparativos entre as várias terapêuticas também tem sido considerada escassa.

As classes farmacológicas com maior evidência de eficácia no tratamento da DNe são a dos antidepressivos tricíclicos, os ligandos $\alpha_2\delta$, inibidores da recaptação da serotonina e da noradrenalina e os opióides (Dworkin *et al.*, 2007) (Dworkin *et al.*, 2010) (NICE, 2010). A eficácia do tramadol está plenamente reconhecida. Como agentes farmacológicos tópicos existem a capsaicina e a lidocaína.

Segundo uma revisão sistemática de 2012 relativa ao uso de fármacos na DNe nos Cuidados de Saúde Primários, os antidepressivos tricíclicos, alguns anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina), os antidepressivos inibidores da recaptação da noradrenalina e serotonina e a lidocaína tópica são todos recomendados como fármacos de 1ª ou 2ª linha no tratamento da DNe. O tramadol e os outros opióides são recomendados apenas em 2ª ou 3ª linha terapêutica (Berger *et al.*, 2012).

Na revisão sistemática de Attal *et al.* (2006), foi feita a avaliação dos vários ensaios clínicos, classificados de acordo com a classificação de evidência da *European Federation of Neurology Societies (EFNS)*. A maioria dos ensaios clínicos randomizados e controlados envolvia doentes com NPH e PND. Foi atribuído o nível de evidência A (grande número de ensaios clínicos de classe I), aos antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina e opióides, seguidos do *patch* de lidocaína a 5% (na NPH) e dos antidepressivos venlafaxina e duloxetina (na PND). Foram encontrados menos estudos para a DNe central, nevralgia do trigêmeo e outras neuropatias de etiologias múltiplas. A maioria da DNe periféricas demonstrou resposta favorável aos antidepressivos tricíclicos e à gabapentina ou pregabalina, embora algumas neuropatias específicas, como por exemplo, por HIV tenham sido

refractárias. Verificaram escassez de estudos sobre associações de fármacos e comparações diretas entre vários agentes analgésicos (Attal *et al.*, 2006).

Na revisão sistemática de Dworkin *et al.* (2010) foi feita a avaliação dos vários fármacos utilizados na DNe, de acordo com os níveis de evidência de *Oxford Center for Evidence-based Medicine* (Recomendação A – se múltiplas revisões sistemáticas controladas e randomizadas positivas, experiência clínica e *guidelines* concordantes; Recomendação B – se um único ensaio randomizado controlado positivo ou resultados inconsistentes entre os estudos e com a experiência clínica.) Como classes medicamentosas de primeira linha terapêutica (recomendação A) consideraram: (1) Antidepressivos tricíclicos e Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN), nomeadamente duloxetina (na PND) e venlafaxina (na PND e em outras polineuropatias dolorosas, excetuando a NPH); (2) Ligandos dos canais de cálcio $\alpha_2\delta$ (gabapentina e pregabalina) e (3) Lidocaína tópica (sobretudo em neuropatias periféricas com alodinia). Para segunda linha de terapêutica (recomendação A) apontaram: (1) Opióides *Major* e (2) Tramadol. Em 3ª linha de tratamento (recomendação B) apontaram outros anticonvulsivantes (carbamazepina, lamotrigina, entre outros), outros antidepressivos (citalopran, bupropion, entre outros), mexiletina, antagonistas dos recetores NMDA e capsaicina tópica. Apresentaram ainda os novos fármacos em estudo: toxina botulínica, lacosamida e *patches* com elevada concentração de capsaicina. Verificaram a escassez de comparações diretas entre agentes farmacológicos. Assim, além de atender à eficácia dos fármacos de primeira linha, concluíram que será importante na sua escolha atender aos potenciais efeitos adversos, efeitos não analgésicos possíveis, comorbilidades, custos e potenciais riscos de abuso. Mesmo assim, a variação individual de resposta à terapêutica foi descrita como comum e imprevisível (Dworkin *et al.*, 2010).

A *guideline* sobre tratamento da DNe em adultos em cuidados não especializados, publicada pela NICE, em 2010, recomenda como terapêutica de 1ª linha: (1) duloxetina ou, se contraindicada, a amitriptilina (na PND) e (2) amitriptilina ou pregabalina (nas restantes etiologias de DNe periférica). Caso não sejam tolerados os efeitos secundários da amitriptilina, recomendam a sua substituição por nortriptilina ou imipramina. Como terapêutica de 2ª linha está recomendada a combinação ou substituição de fármacos: (1) na PND - se inicialmente medicada com duloxetina, alterar para amitriptilina ou pregabalina, ou associar com pregabalina; se inicialmente medicada com amitriptilina, substituir ou combinar com pregabalina; (2) nas restantes etiologias de DNe periférica - se tratada inicialmente com

antidepressivo tricíclico, este deve ser substituído ou combinado com pregabalina, ou se a terapêutica inicial foi a pregabalina, associar ou substituir por antidepressivo tricíclico. Como 3ª linha de tratamento, estas normas clínicas advogam a referência a unidades especializadas da dor, podendo ser iniciado o tramadol em substituição ou associação à terapêutica de segunda linha, ou a lidocaína tópica, nos casos de doentes intolerantes à medicação oral e com neuropatias localizadas. (NICE, 2010)

A norma de orientação clínica recentemente publicada em Portugal (DGS, 2011) vai ao encontro das recomendações anteriormente descritas pela NICE. Refira-se apenas a inclusão da venlafaxina na primeira linha de tratamento da PND e a referência à lidocaína tópica na primeira linha de tratamento da DNe pós-herpética, nomeadamente em idosos com contraindicações ou intolerância à terapêutica oral. Aborda também a nevralgia do trigémio, referindo a carbamazepina ou a oxcarbazepina como primeira linha terapêutica. Na DNe central é recomendada a pregabalina, na lesão medular (força de recomendação A) ou os antidepressivos tricíclicos, na lesão medular e na dor pós-AVC (força de recomendação B).

No tratamento da neuropatia é comum o uso de múltiplos fármacos em simultâneo. As razões para este facto prendem-se com: 1) a DNe pode ser tratada com vários agentes farmacológicos, com diferentes mecanismos de ação; 2) há uma compatibilidade relativa entre estas classes farmacológicas; 3) apesar da evidência da eficácia destes tratamentos, é infrequente a obtenção de um controlo total ou adequado da dor com um único tipo de fármaco, sendo comum, em contrapartida, o aparecimento dos respetivos efeitos secundários. Então, é comum começar a terapêutica com a titulação lenta de um agente de primeira linha (antidepressivo tricíclico, ligando $\alpha_2\delta$ ou IRSN), seguido da associação com um outro agente de primeira linha (geralmente não associando antidepressivo tricíclico com IRSN), se dor não controlada com a dose máxima tolerada do primeiro fármaco instituído. O tramadol ou os opióides *major* são geralmente utilizados como agentes de segunda linha ou como analgésicos de resgate, particularmente importantes em doentes cujo nível de dor aumenta previsivelmente após um dia de maior exigência física. As terapêuticas tópicas e não farmacológicas são geralmente reservadas para aqueles doentes que não toleram a medicação oral (Eisenberg *et al.*, 2010).

Como já referido, estima-se que o alívio da dor apenas seja atingido em menos de 50% dos doentes com DNe crónica (Finnerup *et al.*, 2005) (Attal *et al.*, 2006) (Plested *et al.*, 2010). Em doentes com DNe refractária aos agentes farmacológicos comuns, podem ser indicadas

terapêuticas combinadas ou invasivas, como por exemplo, o implante de neuromodulador ou medicação via intratecal (Gilron *et al.*, 2005). O conceito de DNe refractária não está bem definido, embora tenha sido proposta como definição a “dor neuropática que é resistente à farmacoterapia em monoterapia ou em associação racional com fármacos de comprovada eficácia em ensaios clínicos randomizados e controlados de nível I com falha no alívio da dor mesmo quando usado em dose adequada ou quando efeitos secundários se tornam intoleráveis” (Plested *et al.*, 2010). Nos estudos incluídos neste trabalho de Plested *et al.* (2010) foi avaliada a eficácia da pregabalina, *patch* de lidocaína a 5% e da duloxetina na DNe refractária, e só foi demonstrada eficácia consistente para a pregabalina e para a lidocaína.

De seguida, iremos aprofundar cada uma das diferentes terapêuticas utilizadas na DNe.

2.2.1 – Abordagens Terapêuticas da Dor Neuropática

Antidepressivos Tricíclicos (ADT)

Estes fármacos atuam através da inibição da recaptação da serotonina e da noradrenalina e através do bloqueio dos canais de sódio (Attal *et al.*, 2006). A sua eficácia analgésica foi demonstrada por ensaios clínicos randomizados e controlados que incidiram sobretudo na PND e na NPH (Lynch *et al.*, 2006) (Miranda *et al.*, 2009) (Dworkin *et al.*, 2010), onde demonstraram nível de evidência A (IASP, 2010). Uma revisão recente da *Cochrane* definiu como 3,6 indivíduos o Número Necessário a Tratar (NNT) para alívio da dor moderada nos 17 estudos referentes à PND. Os ensaios clínicos controlados (*versus* placebo) demonstraram que os fármacos (amitriptilina, imipramina, nortriptilina, desipramina, clomipramina e maprotilina) são eficazes na DNe da NPH, PND, pós-mastectomia, pós-AVC ou neuropatias mistas (Eisenberg *et al.*, 2010). Em contrapartida, alguns ensaios clínicos falharam na demonstração da sua eficácia em síndromes dolorosas específicos, como a radiculopatia lombar, a neuropatia induzida por cisplatina e a DNe oncológica (Hammack *et al.*, 2002) (Mercadante *et al.*, 2002) (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007). Os efeitos secundários, dependentes da dose, mais significativos são: efeitos anticolinérgicos (obstipação, xerostomia, visão turva, alterações cognitivas, taquicardia e retenção urinária), hipotensão ortostática, aumento de peso e sedação (Cruciani *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2010) (Attal *et al.*, 2010) (IASP, 2010). Estão contraindicados nos indivíduos com glaucoma,

hipertrofia benigna prostática e enfarte agudo do miocárdio. Os seus efeitos anticolinérgicos podem desencadear toxicidade cardíaca, com atividade ventricular ectópica, enfarte agudo do miocárdio ou morte súbita (Eisenberg *et al.*, 2010). A dose utilizada deve ser titulada de forma controlada, sobretudo nos idosos (Dworkin *et al.*, 2007). O seu efeito máximo apenas é sentido cerca de três semanas após a dose ideal. Os seus efeitos na melhoria do sono, na melhoria do humor e da ansiedade podem ter um benefício adicional (Attal *et al.*, 2006). Os fármacos melhor tolerados são as amins secundárias nortriptilina e a desipramina (Dworkin *et al.*, 2007).

Ligandos $\alpha_2\delta$ (gabapentina e pregabalina)

Algumas revisões sistemáticas e *guidelines* baseadas na evidência para o tratamento da DNe consideraram os anticonvulsivantes seletivos como primeira linha terapêutica, nomeadamente: os ligandos dos canais de cálcio $\alpha_2\delta$ (gabapentina e pregabalina) na NPH e na PND, e a carbamazepina na nevralgia do trigémio (Attal *et al.*, 2010) (DGS, 2011). Os restantes fármacos apresentaram menor evidência de eficácia (Lynch *et al.*, 2006).

A alodinia mecânica da DNe é mediada pelo aumento da expressão dos canais de cálcio do tipo N nos terminais centrais dos neurónios primários aferentes, com consequente neurotransmissão patológica no corno posterior da medula. A gabapentina e a pregabalina têm um efeito de modulação nesta via pois ligam-se parcialmente à subunidade $\alpha_2\delta$ dos canais de cálcio dependentes da voltagem, nos neurónios aferentes primários, diminuindo a libertação de glutamato, norepinefrina e substância P (Attal *et al.*, 2006) (Cruciani *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Miranda *et al.*, 2009) (Eisenberg *et al.*, 2010) (Dworkin *et al.*, 2010). Vários estudos demonstraram que a gabapentina é eficaz no alívio da dor da PND nas doses de 900 a 3600 mg por dia, com um NNT na ordem dos 2,9 para alívio de 50% da dor. A sua eficácia é semelhante à da amitriptilina, sendo essa eficácia potenciada quando usadas em associação. A gabapentina demonstrou eficácia consistente na DNe por NPH, PND, fantoma de membro, DNe oncológica, Síndrome de Guillian Barré, várias neuropatias periféricas e na dor lombar crónica por compressão medular (Dworkin *et al.*, 2007) (Lynch *et al.*, 2006) (Miranda *et al.*, 2009). Um estudo isolado demonstrou também o seu efeito na neuropatia periférica associada a QT (Rao *et al.*, 2007). A sua eficácia na neuropatia por HIV é mais controversa. O seu efeito na melhoria do sono e da qualidade de vida também foi demonstrado (Attal *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007). A pregabalina apresenta um mecanismo de ação semelhante à da

gabapentina, uma farmacocinética mais linear (maior rapidez de absorção) e efeitos secundários semelhantes (aumento ponderal, sintomas cognitivos reversíveis e edemas periféricos) (Attal *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Moore *et al.*, 2009) (Dworkin *et al.*, 2010). Foi demonstrada a sua eficácia analgésica na PND, com NNT para alívio de 50% da dor de 3,4 com 300 mg e de 3,3 para 600 mg diários. Estudos pré-clínicos de avaliação da eficácia da gabapentina *versus* a pregabalina sugeriram que a pregabalina tem maior atividade analgésica e menores interações medicamentosas (Miranda *et al.*, 2009) (Moore *et al.*, 2009). Uma revisão sistemática de vários ensaios clínicos randomizados e controlados concluiu que quer anticonvulsivantes quer antidepressivos tricíclicos têm eficácia comparada na DNe por NPH ou PND. O nível de recomendação atribuído pela IASP à gabapentina e pregabalina foi nível A, para a NPH e PND. Não se verificou diferença estatisticamente significativa nos efeitos secundários *minor* mas os antidepressivos apresentaram mais efeitos secundários *major*.

Inibidores da recaptção da serotonina e da noradrenalina (IRSN)

Os IRSN promovem o alívio da DNe através da inibição descendente das vias aferentes de sinalização da dor, mediadas pela ação de ambos os neurotransmissores nos neurónios da medula rostroventral (Attal *et al.*, 2006). A duloxetina tem eficácia demonstrada na dor por PND, com um NNT para alívio de 50% da dor de 4,3 e de 3,8 para as doses de 60 e 120 mg diários, respetivamente. A sua eficácia e segurança a longo prazo estão pouco estudadas (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007) (Lunn *et al.*, 2009). O NNT para a venlafaxina é calculado em 4,5 indivíduos para 150 a 225 mg diários. Ambos os fármacos demonstraram menor eficácia do que os antidepressivos tricíclicos na DNe (Eisenberg *et al.*, 2010). Contudo, a IASP também recomenda a duloxetina e a venlafaxina na PND, com nível A de evidência (IASP, 2010), o que foi corroborado pela DGS, em 2011. (DGS, 2011) A NICE reconhece a duloxetina como 1ª linha terapêutica na PND (NICE, 2010). Os resultados da venlafaxina foram inconsistentes para outras formas de DNe, incluindo DNe pós-mastectomia, NPH, DNe central e neuropatia periféricas variadas (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007). Um ensaio clínico controlado, envolvendo doentes com síndrome doloroso pós mastectomia e a toma de 75mg de venlafaxina perioperatória, demonstrou eficácia deste fármaco no alívio da dor. Três ensaios clínicos randomizados (Goldstein *et al.*, 2005) (Raskin *et al.*, 2005) (Wernicke *et al.*, 2006) e um ensaio clínico “aberto” a 52 semanas (Raskin *et al.*, 2006) demonstraram que a duloxetina é eficaz na DNe por PND em doses de

60 a 120 mg, com melhoria da qualidade de vida e do sono. Os efeitos secundários a registar foram: náuseas, hiperhidrose, disfunção sexual, obstipação, xerostomia e tonturas (embora com menor intensidade do que nos tricíclicos). (IASP, 2010) A sua associação a outros inibidores da recaptação de serotonina, triptanos e tramadol deve ser cuidadosa, pelo risco de síndrome serotoninérgica. Dado que também inibem o metabolismo dos restantes antidepressivos, o seu uso combinado deve ser evitado. Estão contraindicados em associação com os inibidores da enzima monoamino oxidase (IMAO) e em doentes com insuficiência hepática (Eisenberg *et al.*, 2010).

Opióides Major

Os opióides inibem fortemente os neurónios nociceptivos centrais, sobretudo pela sua interação com os receptores opióides μ e consequente hiperpolarização da membrana celular (George *et al.*, 1993) (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Attal *et al.*, 2006) (Cruciani *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) A oxycodona de libertação em doses controladas demonstrou eficácia na PND (IASP, 2010). Especial atenção deve ser reservada em doentes com antecedentes de dependência e de doença pulmonar. Além da dependência descrevem-se como efeitos secundários a tolerância, a hiperalgesia, alterações imunológicas e hipogonadismo (Attal *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2010) (IASP, 2010).

Nove ensaios clínicos randomizados e controlados testaram eficácia dos opióides orais na PND, NPH, radiculopatia e neuropatias centrais e periféricas de diferentes etiologias (Dworkin *et al.*, 2007) (Miranda *et al.*, 2009) (Eisenberg *et al.*, 2010). Nos seis estudos incluídos numa metanálise (Watson *et al.*, 1998a) (Huse *et al.*, 2001) (Raja *et al.*, 2002) (Gimbel *et al.*, 2003) (Morley *et al.*, 2003) (Watson *et al.*, 2003) verificou-se a diminuição de mais de 14 em 100 pontos na escala de dor em doentes tratados com opióides, relativamente ao grupo controlo. O NNT para redução de dor a 50% foi estimado em 2,5 (Finnerup *et al.*, 2005). Alguns ensaios clínicos randomizados, controlados, de curta e média duração (um dia a quatro semanas) concluíram que os opióides reduziram a intensidade da alodinia na DNe periférica (Eisenberg *et al.*, 2010). Os resultados dos estudos para os *outcomes* secundários como saúde mental e física, sono, incapacidade e qualidade de vida foram, no entanto, inconsistentes (Attal *et al.*, 2006).

Segundo revisão de Dworkin *et al.* (2010), os opióides podem ser usados como primeira linha de tratamento em circunstâncias selecionadas (recomendação A), nomeadamente, quando é necessário um alívio rápido da dor ainda no processo de titulação, em episódios de

exacerbação severa, na DNe aguda e oncológica e quando os restantes agentes de primeira opção isolados ou em associação não conferirem eficácia. Em geral, mantêm-se remetidos para segunda linha, não pela ausência de eficácia, mas pelos efeitos secundários e escassez de estudos a longo prazo e de dose ótima eficaz (Dworkin *et al.*, 2007) (Dworkin *et al.*, 2010).

Tramadol

O tramadol atua através de um duplo mecanismo de ação: inibição da recaptação da serotonina e da norepinefrina e ação agonista dos recetores opióides μ (Attal *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2010). Vários ensaios clínicos randomizados e controlados demonstraram a sua eficácia na dor da PND (Harati *et al.*, 1998), na NPH (Boureau *et al.*, 2003), após amputação e em síndromes neuropáticas mistos (Eisenberg *et al.*, 2006) (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2010) (Eisenberg *et al.*, 2010). Comparando com o uso de outros opióides na NPH, parece ter menor eficácia (Finnerup *et al.*, 2005). Os efeitos adversos são dose-dependentes, pelo que deve ser titulado cuidadosamente até ao máximo de 200 mg duas vezes ao dia. Os efeitos secundários mais comuns são tontura, náusea, obstipação, vertigem e abuso medicamentoso (Attal *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2010) (IASP, 2010).

Outros agentes farmacológicos

Com grau de recomendação B atribuído por Dworkin *et al.* (2007) surgem: outros anticonvulsivantes (lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, topiramato e ácido valpróico), outros antidepressivos (bupropion, citalopran e paroxetina), mexiletina, antagonistas dos recetores NMDA e capsaicina tópica. (Dworkin *et al.*, 2007)

Alguns agentes farmacológicos usados no tratamento da epilepsia demonstraram evidência limitada de eficácia da DNe. A oxcarbazepina demonstrou efeito na PND em um estudo randomizado controlado. A lamotrigina e o topiramato demonstraram resultados contraditórios em estudos randomizados e controlados. No entanto, estes têm sido utilizados como terapêuticas de terceira linha quando a resposta aos outros agentes foi insuficiente. A carbamazepina foi aprovada na analgesia da nevralgia do trigémio e demonstrou ser igualmente eficaz na PND em dois ensaios clínicos controlados duplamente cegos com placebo. Alguns ensaios clínicos randomizados e controlados de pequenas dimensões verificaram a eficácia de ácido valpróico na NPH e na PND (Dworkin *et al.*, 2007).

O bupropion, inibidor da recaptação da noradrenalina e da dopamina, demonstrou benefício em um estudo envolvendo DNe de várias etiologias.

Os inibidores da recaptação de serotonina apresentaram resultados inconsistentes na DNe. Apesar de terem um perfil de segurança maior quando comparados com os antidepressivos tricíclicos, são muito menos eficazes, pelo que não devem ser opção (Finnerup *et al.*, 2005) (Dworkin *et al.*, 2010).

Os antagonistas dos recetores NMDA apresentaram resultados promissores em estudos animais, mas nos ensaios clínicos de pequenas dimensões que foram realizados não demonstraram eficácia na NPH (dexametorfano e memantina) ou na PND (memantina) (Finnerup *et al.*, 2005) (Cruciani *et al.*, 2006).

A mexiletina, análogo da lidocaína, apresentou eficácia modesta em vários ensaios clínicos no tratamento da DNe por diabetes e outras etiologias (Lynch *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007)

A lidocaína endovenosa, bloqueador dos canais de sódio, teve a sua eficácia demonstrada em vários tipos de DNe numa metanálise de ensaios clínicos randomizados, com redução de cerca de 10 mm numa escala de dor de 100 mm em relação ao placebo (Tremont-Lukats *et al.*, 2005). Contudo, há escassez de estudos de eficácia a longo prazo.

A acetil-L-carnitina tem sido amplamente estudada na neuropatia por diabetes, HIV e QT, devido às suas propriedades neuroprotectoras e analgésicas.

O ácido alfalipóico é um antioxidante potente cujo efeito tem sido estudado na DNe da PND. Um ensaio clínico mostrou que a dose diária de 600 mg por dia reduziu para metade os sintomas de neuropatia com um NNT de 2,8. (Eisenberg *et al.*, 2010)

Os anti-inflamatórios não esteroides não provaram ser eficazes, não obstante o papel da inflamação na DNe. Não há ensaios clínicos controlados. Apenas se encontrou um estudo piloto que demonstrou a eficácia comparada do *patch* de lidocaína a 5% com o naproxeno 500mg em duas tomas diárias no tratamento da DNe da síndrome do túnel cárpico (Nalamachu *et al.*, 2006).

Os canabinóides, embora demonstrem alívio da dor num ensaio clínico duplamente cego e controlado, não estão formalmente aprovados na DNe (Eisenberg *et al.*, 2010). Segundo Attal *et al.* (2010) têm nível de evidência A na esclerose múltipla e DNe periférica, podendo ser considerados nos casos refratários. (Attal *et al.*, 2010)

Agentes Tópicos

Capsaicina

A capsaicina inibe a libertação da substância P dos neurónios aferentes de pequeno calibre, por diminuição dos recetores vanilóides e neurólise, conduzindo à falência das reservas dessa substância com o seu uso continuado (Attal *et al.*, 2006). Este efeito permite o alívio da DNe e a desnervação epidérmica, podendo, no entanto, condicionar desconforto e queimaduras cutâneas em 80% dos doentes (Lynch *et al.*, 2006). Em três dos cinco ensaios clínicos controlados e randomizados publicados sobre a PND, em dois dos estudos sobre a NPH e num ensaio clínico sobre a DNe mista, a capsaicina demonstrou eficácia, embora mais inconsistente (Dworkin *et al.*, 2007). Não foi demonstrada a eficácia na DNe após mastectomia nem na neuropatia associada ao HIV. Contudo, é considerada segura na NPH e na neuropatia por HIV. (Dworkin *et al.*, 2010) O NNT foi estimado em 6,7 indivíduos (Finnerup *et al.*, 2005).

Lidocaína

A lidocaína tópica atua através do bloqueio dos canais de sódio periféricos, com consequente produção de descargas ectópicas (Attal *et al.*, 2006). Está aprovada no tratamento da NPH, com recomendação de 1ª linha de tratamento segundo a DGS. (DGS, 2011) Pode igualmente ser utilizada no tratamento de DNe de outras etiologias. O seu modo de ação condiciona uma modulação de longa duração na via da dor, quer na sensibilização, quer na resposta imunológica à lesão nervosa. Foi demonstrada a sua eficácia nos três ensaios clínicos randomizados, controlados de curta duração no tratamento da DNe da NPH (Rowbotham *et al.*, 1995) (Rowbotham *et al.*, 1996) (Galer *et al.*, 1999) (Lynch *et al.*, 2006) e na neuropatia periférica focal (Nalamachu *et al.*, 2006) (Meier *et al.*, 2003). O uso do *patch* de lidocaína a 5% nos doentes com NPH e alodinia e em doentes com DNe periférica com alodinia ou DNe periférica localizada tem grau de recomendação A (Dworkin *et al.*, 2010) (Attal *et al.*, 2010) (NICE, 2010) (DGS, 2011). A dose máxima recomendada é equivalente a três *patches* aplicados em simultâneo cada 12 horas. Não foi associada a reações adversas, à exceção de reações cutâneas ligeiras (Dworkin *et al.*, 2007). No entanto, devem ser tomadas precauções, nomeadamente em doentes sob terapêutica com antiarrítmicos de classe I ou com disfunção hepática (Dworkin *et al.*, 2007) (Attal *et al.*, 2010).

Associações farmacológicas

Frequentemente a monoterapia não é eficaz na DNe. Tem sido demonstrada a razoabilidade das associações farmacológicas de agentes com diferentes mecanismos de ação. Embora seja uma prática clínica utilizada, são escassos os ensaios clínicos realizados com associações de fármacos. (Dworkin *et al.*, 2010) Um ensaio clínico usou concomitantemente a gabapentina e a morfina em doentes com DNe mista e verificou-se a maior eficácia do uso dos fármacos em associação do que em uso isolado (Gilron *et al.*, 2005). Semelhantes resultados foram publicados num ensaio clínico com uso de venlafaxina e gabapentina (Simpson, 2001). O estudo randomizado e controlado de Raja *et al.* (2002) utilizou a associação de opióide (morfina) e antidepressivo tricíclico (nortriptilina), concluindo que estes aliviavam a dor em 32% e 38% dos doentes, respetivamente (Raja *et al.*, 2002). Vários ensaios clínicos randomizados e controlados demonstraram maior eficácia de gabapentina em associação com nortriptilina ou com morfina comparativamente ao uso isolado dos fármacos referidos (em doentes quer com NPH quer com PND). (IASP, 2010) (Dworkin *et al.*, 2010) (NICE, 2010) A associação de gabapentina com oxicodona também revelou maior eficácia do que a gabapentina isolada na PNP. (IASP, 2010) Um ensaio clínico controlado e randomizado comprovou maior eficácia do uso combinado de pregabalina e *patch* de lidocaína a 5% relativamente ao seu uso isolado, na DNe periférica. (Dworkin *et al.*, 2010)

Conclusões

Na revisão sistemática de Dworkin *et al.* (2007), tendo em conta as comorbilidades e efeitos na qualidade de vida, apenas demonstraram efeitos positivos a gabapentina, a pregabalina e a duloxetina (nível evidência A).

Na revisão sistemática de Attal *et al.* (2006), a eficácia na qualidade de vida e segurança nas comorbilidades apenas foi demonstrada para a pregabalina e gabapentina (nível de evidência A), não tendo sido demonstrado eficácia simultânea nem para os opióides (nível evidência B) nem para a lidocaína tópica (nível de evidência B).

O aparecimento de resultados mais consistentes num elevado número de ensaios clínicos de qualidade, resultou em diferentes níveis de evidência e de recomendação para os diferentes fármacos esquematizados na tabela 3 (Attal *et al.*, 2010) (IASP, 2010).

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR

Tipo de DNe	Nível de Evidência A	Nível de Evidência B	Nível de Evidência C	Recomendação 1ª linha	Recomendação 2ª e 3ª linha
PND*¹	Gabapentina* ² Pregabalina IRSN ADT Opióides* ³ Tramadol* ⁴	Toxina botulínica Dextrometorfano Gabapentina com venlafaxina Levodopa	Carbamazepina Lamotrigina	Gabapentina Pregabalina IRSN ADT	Opióides Tramadol* ⁵
NPH	Gabapentina Pregabalina ADT Opióides* ⁶ <i>Patch</i> de lidocaína <i>Patch</i> de capsaicina 8%	Creme de Capsaicina Valproato		Gabapentina Pregabalina ADT <i>Patch</i> de Lidocaína	Capsaicina Opióides
DNe Central *⁷	Canabinóides * ⁸ (EM) Pregabalina (LM)	ADT (LM e pós-AVC) Lamotrigina (pós-AVC) Tramadol (LM) Opióides		ADT Gabapentina Pregabalina	Canabinóides (EM) Lamotrigina Opióides Tramadol (LM)

Tabela 3 – Classificação do nível de evidência por tratamento usado na PND, NPH e DNe central, com as recomendações para primeira, segunda e terceira linhas de tratamento, segundo a revisão de Attal *et al.*, em 2010. (Adaptado de Attal *et al.*, 2010) (IASP, 2010)

As recomendações tiveram em conta não só os níveis de evidência dos estudos publicados, mas também o perfil de segurança e efeitos adversos. De notar que os fármacos utilizados na DNe têm eficácia diferente consoante a patologia de base. Legenda: PND – polineuropatia diabética; IRSN – Inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina (duloxetine, venlafaxina liberação prolongada); ADT – antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, clomipramina, nortriptilina, desipramina e imipramina); EM – Esclerose Múltipla; LM – lesão medular

*¹ – Apenas os ADT, o tramadol e a venlafaxina foram estudados nas polineuropatia não diabéticas; *² - isolada ou com morfina; *³ – oxycodona; *⁴ – isolado ou com acetaminofeno; *⁵ – Tramadol é recomendado em 1ª linha em doentes com exacerbação aguda da dor (sobretudo em associação com acetaminofeno); *⁶ - oxycodona, morfina e metadona; *⁷ – Os canabinóides e a lamotrigina são propostos para os casos refratários; *⁸ – oromucosa ou oral.

Segundo a IASP (2010), todas as recomendações atuais para o tratamento farmacológico da DNe propõem os antiepiléticos (gabapentina e pregabalina), os antidepressivos tricíclicos ou os antidepressivos IRSN, ou a lidocaína tópica como fármacos de primeira linha. (Dworkin *et al.*, 2010) (NICE, 2010) (DGS, 2011)

Além disso, Dworkin *et al.* (2010) conclui que:

- 1) Existem diferentes tratamentos farmacológicos disponíveis para tratamento da DNe, mas a interpretação prática dos resultados dos seus estudos de eficácia e segurança torna-se complexa e multifatorial, sendo ainda necessário mais comparações diretas entre fármacos, uniformidade de *outcomes* avaliados e mais estudos de segurança.
- 2) Nas neuropatias periféricas localizadas, a lidocaína tópica em monoterapia ou em associação a um dos fármacos de 1ª linha (ADT, IRSN ou gabapentina/pregabalina) pode ser a primeira opção.
- 3) Nas neuropatias agudas, DNe oncológica ou exacerbações severas da DNe, podem ser utilizados os opióides major ou o tramadol em associação aos fármacos de 1ª linha.
- 4) Caso a medicação de 1ª linha (isolada ou em associação entre si) não revele eficácia, deve ser iniciada medicação de 2ª ou 3ª linhas e/ou referência a unidade especializada da dor.

A revisão de Attal *et al.* (2010) concluiu que:

- 1) Os antidepressivos tricíclicos (25 a 150 mg/dia), a gabapentina (1200 a 3600 mg/dia) e a pregabalina (150 a 600 mg/dia) são os fármacos de eleição na DNe de várias etiologias (exceto na nevralgia do trigémio) e o *patch* de lidocaína é a 1ª linha terapêutica na NPH (sobretudo nos idosos).
- 2) Os antidepressivos IRSN duloxetina (60 a 120 mg/dia) e venlafaxina (150 a 225 mg/dia) são recomendados como 1ª linha na PND.
- 3) Não há evidência de maior eficácia dos ADT relativamente à gabapentina mas os primeiros são mais baratos.

- 4) A pregabalina tem vantagem farmacocinética sobre a gabapentina, mas eficácia e segurança comparáveis.
- 5) O tratamento de 2ª linha inclui o tramadol (200 a 400 mg/dia) e o creme de capsaicina (na NPH).
- 6) Os opióides *major* são terapêuticas de 2ª ou 3ª linhas, apesar da sua eficácia estar bem estabelecida na DNe, devido ao seu potencial de abuso e efeitos secundários.
- 7) Os *patches* de capsaicina poderão ser promissores na NPH e na DNe por HIV.
- 8) Os canabinóides (com nível A de evidência para a esclerose múltipla) podem ser considerados válidos em casos refratários.
- 9) As terapêuticas combinadas (nível A de evidência para a associação de gabapentina com opióides ou com ADT) são recomendadas em caso de falência da monoterapia.
- 10) A escolha entre os diferentes fármacos depende sobretudo do balanço entre eficácia e segurança e das condições individuais de cada doente.

2.3 – Nevralgia Pós-Herpética (NPH)

A NPH constitui uma das formas mais comuns de DNe periférica (Wolff *et al.*, 2010) (Matgorzata, 2011). Constitui a complicação mais comum do Herpes Zoster (HZ) em doentes imunocompetentes (Mounsey *et al.*, 2005) (Fleming *et al.*, 2009).

2.3.1 – Herpes Zoster

A infeção por HZ deve-se à reativação do vírus varicela-zoster (VZV) (Soyuncu *et al.*, 2009) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Fleming *et al.*, 2009) (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). Este vírus mantém-se durante anos latente nas células dos gânglios sensitivos posteriores e dos gânglios dos nervos craneanos após a sua primoinfecção (Brisson *et al.*, 2001) (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). A destruição e inflamação neuronal induzida pelo VZV causam dor e interferem nas atividades de vida diária e qualidade de vida (Thakur *et al.*, 2010). O HZ condiciona sofrimento e incapacidade não só devido à dor aguda mas também pela dor crónica da NPH (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) A distribuição das lesões cutâneas de HZ faz-se de acordo com o

descrito na tabela 4 (Cruciani *et al.*, 2006) (Sampathkumar *et al.*, 2009), mas nos indivíduos imunodeprimidos pode surgir em vários dermatomas adjacentes ou com disseminação difusa e visceral (Cruciani *et al.*, 2006) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Fleming *et al.*, 2009).

Distribuição por dermatomas do HZ nos indivíduos imunocompetentes	
Localização	Prevalência relativa
Torácico	>50% de todos os casos
Divisão oftálmica do nervo Trigêmio e outros pares cranianos	10 a 20%
Cervical	10 a 20%
Lombar	10 a 20%
Sagrado	2 a 8%
Generalizado	<1%

Tabela 4 – Distribuição da localização por dermatomas das lesões de HZ em indivíduos imunocompetentes, de acordo com a sua prevalência relativa (Adaptado de Thakur *et al.*, 2010).

Como variantes mais importantes, existem o HZ oftálmico, o HZ auditivo (Síndrome *Ramsay-Hunt*) e o Zoster sem Herpes (dor no dermatomo mas sem *rash*). O diagnóstico é essencialmente clínico. Os achados clínicos incluem um *rash* característico localizado a um dermatomo e dor local (Sampathkumar *et al.*, 2009). Os exames laboratoriais só são necessários em caso de dúvida diagnóstica (cultura do vírus, imunofluorescência direta, teste do DNA viral, biópsia ou teste de doenças ocultas) (Soyuncu *et al.*, 2009) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010).

2.3.1.1) Epidemiologia e Fatores de Risco

A incidência de HZ depende da incidência da infecção primária com varicela, da idade e nível de imunossupressão da população (Opstelten *et al.*, 2006) (Thakur *et al.*, 2010). Estima-se que a incidência atinja os 20 a 30% no período total de vida da população, embora com tendência a ser alterado pelas campanhas de vacinação contra a varicela (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). O HZ é considerado uma das doenças neurológicas mais frequentes, atingindo anualmente cerca de 1,7 milhões de pessoas na Europa. O maior fator de risco para HZ (quer em indivíduos

imunocompetentes, quer em indivíduos imunodeprimidos) é a idade avançada (Insinga *et al.*, 2004). A incidência global de HZ (independentemente da idade) é de 1,2 a 4,8 casos por 1000 indivíduos por ano, e aumenta para uma incidência anual de 7,2 a 11,8 casos por 1000 indivíduos com idade superior a 60 anos. A prevalência atinge os 50% em indivíduos com mais de 85 anos de idade (Thakur *et al.*, 2010) (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). Em Espanha, a incidência estimada de HZ nos Cuidados de Saúde Primários, em 2007, foi de 4,1 para 1000 habitantes. Neste estudo de *coorte* foram registados 146 casos, 46% dos quais eram portadores de pelo menos uma comorbilidade (30% correspondentes a doenças crónicas e 9% correspondentes a neoplasias malignas. 11,5% dos indivíduos apresentavam imunossupressão associada a cancro ou a terapêuticas imunossupressoras) (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). Nos indivíduos imunodeprimidos o risco relativo para HZ é elevado (Grann *et al.*, 2002) (Insinga *et al.*, 2004) (Fleming *et al.*, 2009). Os doentes com HIV, sujeitos a transplantação de órgãos sólidos ou de medula óssea, a QT imunossupressora ou com Lupus Eritematoso Sistémico têm um risco 20 a 100 vezes maior de desenvolver HZ e apresentam maior taxa de recorrência. Um estudo de 2009 demonstrou que, num total de 132 doentes com HZ, 6,1% era portador de neoplasia (Soyuncu *et al.*, 2009). Outros fatores de risco implicados na infeção por HZ estão sistematizados na tabela 5 (Chidiac *et al.*, 2001) (Opstelten *et al.*, 2006).

Fatores associados a maior incidência de HZ
1 – Idade aumentada
2 – Doenças com imunodepressão (HIV, doenças linfoproliferativas, tuberculose, insuficiência renal crónica, falência hepática, diabetes)
3 – Terapêuticas imunossupressoras (transplantação de órgãos, quimioterapia, corticoesteróides)
4 – Possível associação positiva com raça caucasiana, <i>distress</i> psicológico e traumas físicos

Tabela 5 – Fatores de risco associados a uma maior incidência de infeção por HZ (Chidiac *et al.*, 2001) (Fleming *et al.*, 2009).

2.3.1.2) Fisiopatologia

O HZ manifesta-se ao longo da distribuição de uma raiz nervosa sensitiva dorsal ou gânglio de nervo craniano. O fenómeno de reativação do vírus latente num desses gânglios permanece

pouco claro. No entanto, o declínio da imunidade celular é tido como o principal fator de risco para essa reativação (Thakur *et al.*, 2010). As causas mais comuns de diminuição do limiar de imunidade mediada por células incluem: idade avançada, doenças ou intervenções médicas supressoras da função imunológica (Chidiac *et al.*, 2001) (Cruciani *et al.*, 2006) (Soyuncu *et al.*, 2009) (Fleming *et al.*, 2009) (Argoff, 2011). Quando ocorre o fenômeno de reativação viral, novas partículas de vírus proliferam através do gânglio da raiz dorsal, gânglio dos nervos cranianos e corno dorsal da medula espinhal, por via retrógrada e anterógrada, para os axônios centrais e distais do correspondente gânglio sensitivo espinhal ou craniano. A própria replicação viral causa lesão inflamatória tecidual e neuronal no dermatomo afetado, podendo conduzir a necrose, infecção hemorrágica, lesão neurológica e cicatriz permanente no gânglio nervoso sensitivo craniano ou periférico atingido (Head *et al.*, 1997) (Fleming *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010). Os nervos periféricos atingidos sofrem desmielinização axonal duradoura e aumentam o número de axônios desmielinizados, o que contribui para a dor e alterações sensitivas localizadas. A atividade elétrica excessiva nos nociceptores periféricos afetados é a principal causa de dor na infecção por HZ. O vírus também pode afetar os neurônios autonômicos, as células do corno anterior da medula óssea e as leptomeninges, originando fraqueza muscular, paralisia e pleocitose do *liquor* medular (Thakur *et al.*, 2010).

2.3.1.3) Complicações

A frequência e a severidade das complicações são maiores quanto maior a idade e o compromisso imunológico do doente (Thakur *et al.*, 2010). Tal como já referido anteriormente, a maior causa de morbidade em indivíduos imunocompetentes é a NPH (Mounsey *et al.*, 2005) (Opstelten *et al.*, 2006) (Cruciani *et al.*, 2006) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Cebrián-Cuenca *et al.*, 2010). Como outras complicações enumeram-se: (1) Complicações oftalmológicas (1 a 6% dos casos) – retinite, episclerite, queratite, irite, esclerite, glaucoma secundário ou ptose com perda da acuidade visual permanente ou temporária; (2) Neuropatia motora (5 a 15%) – paresia dos nervos extraoculares, nervo facial, outros nervos motores, com eventual paresia diafragmática, fraqueza dos membros superiores e extremidades inferiores, consoante as áreas afetadas; (3) Complicações neurológicas raras – meningite asséptica, mielite e encefalite (sobretudo se indivíduos imunocomprometidos) e (4) Complicações viscerais, com disfunção orgânica (rara) (Thakur *et al.*, 2010).

A diminuição da qualidade de vida por dor aguda, pelo uso de fármacos analgésicos com efeitos secundários, tem um impacto semelhante ao provocado pelas doenças crônicas diabetes *Mellitus* ou insuficiência cardíaca congestiva.

2.3.1.4) Tratamento

A abordagem terapêutica do HZ implica educação dos doentes, terapêuticas de suporte e terapêuticas farmacológicas (de alívio da dor e controlo de replicação viral), bem como avaliação dos fatores de risco e da imunocompetência.

A terapêutica antiviral é benéfica não só na evicção da replicação viral, mas também com benefícios demonstrados na dor aguda e crônica, nomeadamente na diminuição da incidência e duração de NPH (Jackson *et al.*, 1997) (Thakur *et al.*, 2010).

A terapêutica analgésica é necessária na maioria dos doentes. A analgesia eficaz melhora a qualidade de vida dos doentes e reduz o risco de NPH (Dworkin *et al.*, 2000). A terapêutica analgésica deve ser utilizada segundo uma estratégia multimodal de ponderação entre a eficácia e a segurança e tolerabilidades dos doentes. Aplica-se a escada analgésica da dor da OMS. Se dor ligeira a moderada, pode ser utilizado em primeira linha o acetaminofeno ou outro anti-inflamatório não esteroide (AINE), isolado ou em associação com o tramadol. Para dores moderadas pode iniciar-se terapêutica com opióides de curta duração (isolados ou em associação com AINE). Podem ser usados os fármacos da dor neuropática. Geralmente começa-se com opióides de curta duração e AINE e, caso não sejam eficazes, utiliza-se a gabapentina ou a pregabalina de acordo com as características individuais dos doentes. Em qualquer terapêutica é necessário um seguimento e uma reavaliação frequentes, ao longo da titulação farmacológica. O uso de corticoterapia, de bloqueio neuronal ou electroestimulação da espinhal medula permanecem ainda controversos (Thakur *et al.*, 2010).

2.3.2 – NPH - Epidemiologia e História Natural

Os estudos epidemiológicos sistemáticos são raros, pelo que a informação conhecida sobre a incidência e prevalência de NPH ainda é limitada. A definição inconsistente da própria entidade clínica NPH condiciona a reprodutibilidade dos estudos, dependendo as várias estimativas epidemiológicas da definição adotada em cada estudo.

Um estudo epidemiológico elaborado em 2007 estimou a incidência anual de 4,1 infetados com HZ em cada 1000 habitantes, desenvolvendo-se NPH em 18% dos casos NPH (Thakur *et al.*, 2010). A incidência anual de HZ nos diferentes países varia entre 1,2 a 4,8 casos por 1000 habitantes (Cebrian-Cuenca *et al.*, 2010). Nos EUA a prevalência da NPH foi estimada em mais de um milhão de pessoas (Stacey, 2005) (Thakur *et al.*, 2010). A NPH afeta 10 a 70% dos doentes com infecção por HZ, com prevalência maior em indivíduos com mais de 50 anos de idade (Watson, 1989) (Davies *et al.*, 2004) (Tyring, 2007) (Gauthier *et al.*, 2009). De acordo com um estudo efetuado em 2010, cerca de 46% dos doentes com NPH apresentavam patologias concomitantes, sendo 11,5% imunodeprimidos devido a cancro ou a terapêutica imunossupressora (Cebrian-Cuenca *et al.*, 2010).

Uma minoria dos doentes com HZ agudo vivencia dor durante as típicas quatro semanas (Argoff, 2011). Se a NPH for definida como a dor que persiste para além dos 120 dias após o aparecimento do *rash* cutâneo (Dworkin *et al.*, 1994) (Thakur *et al.*, 2010), os vários estudos indicam que 10 a 25% dos doentes com HZ desenvolvem NPH (Watson *et al.*, 1991a) (Opstelten *et al.*, 2002) (Thakur *et al.*, 2010) (Argoff, 2011).

Mounsey *et al.* (2005) faz referência a estudo publicado em 2000, que estimou a incidência de NPH de acordo com idade do doente e evolução temporal: ao primeiro mês, incidência de 8,8% (doentes com menos de 60 anos) e 40,8% (acima dos 60 anos); após três meses, incidências de 2,0% (abaixo dos 60 anos) e 13,0% (acima dos 60 anos) e após um ano, incidências de 0,6% (abaixo dos 60 anos) e 7,8% (acima dos 60 anos) (Mounsey *et al.*, 2005). A NPH é uma síndrome de dor crónica que pode durar anos. Dada a escassez de estudos de base populacional, há pouca evidência bibliográfica relativa à sua história natural (Walk *et al.*, 2010). Múltiplos estudos comprovam consistentemente que a maioria dos doentes resolve a dor em semanas a meses após o *rash* cutâneo (Watson *et al.*, 1991a) (Dworkin *et al.*, 2001) (Thakur *et al.*, 2010). A presença de dor persistente após um ano da data de diagnóstico inicial de NPH foi descrita em 20% dos doentes com idade superior a 60 anos (Thakur *et al.*, 2010). Há poucos estudos prospetivos com seguimento dos doentes por períodos superiores a seis meses após diagnóstico de NPH, pelo que a proporção exata de doentes com resolução completa da nevralgia permanece desconhecido.

2.3.3 – NPH - Definição

A NPH é descrita como a dor localizada a um dermatomo que persiste para além dos 120 dias após o aparecimento do *rash* cutâneo do HZ (Fleming *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010). Segundo alguns autores, a definição de NPH corresponde à presença de dor para além de 30 dias da cicatrização das lesões cutâneas (Opstelten *et al.*, 2002) (Mounsey *et al.*, 2005) (Sampathkumar *et al.*, 2009). A dor que persiste após a fase cutânea da doença herpética é considerada uma neuralgia herpética subaguda ou NPH, dependendo da sua duração. A dor herpética aguda é considerada dentro dos 30 dias de aparecimento do *rash* cutâneo. A neuralgia subaguda ocorre se a dor se mantém mais de 30 dias após aparecimento do *rash* cutâneo mas resolve antes de se poder fazer o diagnóstico de NPH (Fleming *et al.*, 2009). Uma dor que persista para além dos 180 dias após início da doença apresenta menor probabilidade de resolver e pode ser designada “NPH bem estabelecida” (Dworkin *et al.*, 2008) (Thakur *et al.*, 2010).

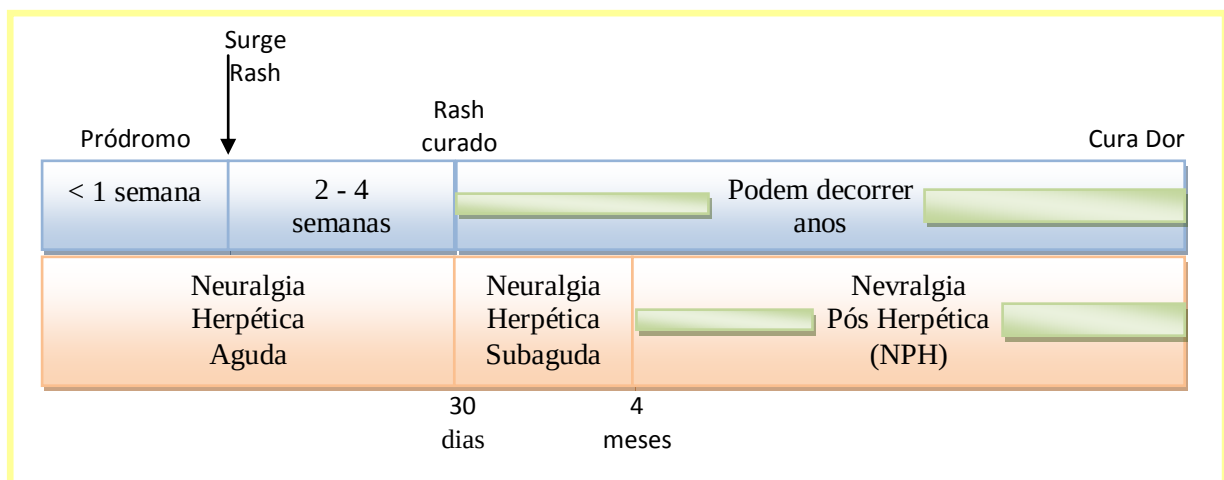


Figura I – Representação esquemática da história natural da infecção por Herpes Zoster e da Nevralgia Pós Herpética (Adaptado de Thakur *et al.*, 2010).

2.3.4 – NPH - Fatores de Risco

Os fatores de risco melhor estudados para NPH em doentes com HZ incluem: idade avançada, presença de pródromos dolorosos, maior severidade da doença aguda, maior severidade do *rash* cutâneo (Dworkin *et al.*, 1998) (Dworkin *et al.*, 2001) (Opstelten *et al.*, 2002) (Thakur *et*

al., 2010), sexo feminino, envolvimento de dermatômos não contíguos, envolvimento da primeira divisão do nervo trigêmeo, diabetes, cancro ou outras patologias imunossupressoras (Fleming *et al.*, 2009).

Cerca de 20% dos doentes acima dos 50 anos têm dor persistente seis meses após o início do *rash*, apesar da toma de antivirais nos prazos recomendados (Dworkin *et al.*, 1996) (Dworkin *et al.*, 1998) (Thakur *et al.*, 2010).

No que diz respeito aos ciclos curtos de dor, os doentes com pelo menos 50 anos de idade têm uma prevalência 14,7 vezes superior de dor 30 dias após *rash*, comparando com doentes com idade inferior. Os doentes mais idosos também parecem estar mais predispostos a casos refratários de NPH (que não respondem aos tratamentos disponíveis (Thakur *et al.*, 2010).

Os fatores de risco para NPH estão esquematizados na tabela 6 (Opstelten *et al.*, 2002) (Jung *et al.*, 2004) (Attal *et al.*, 2006) (Opstelten *et al.*, 2006) (Fleming *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010):

Fatores de Risco para NPH
Boa evidência: 1 – Idade mais avançada 2 – Severidade do <i>rash</i> cutâneo 3 – Gravidade da dor aguda 4 – Dor prodrômica
Com menor evidência: 1 – Sexo feminino 2 – Maiores anomalias sensitivas nos dermatômos afetados 3 – Polineuropatia 4 – Variáveis psicossociais 5 – Distribuição oftálmica

Tabela 6 – Fatores de risco para a NPH de acordo com o grau de evidência.

2.3.5 – NPH - Fisiopatologia

A NPH corresponde a uma neuropatia sensitiva por lesão dos corpos celulares dos neurónios sensitivos, causada por reativação de infeção viral. O processo inflamatório em

proximidade ao corno posterior da medula espinhal justifica a elevada prevalência de dor nos vários tipos de neuropatia sensitivas (Thakur *et al.*, 2010).

Há alguma evidência de infecção ativa persistente nos indivíduos com NPH. Esta síndrome neuropática resulta da sensibilização dos nociceptores periféricos e centrais devida a infecção pelo herpes zoster. É mais frequente nos doentes que apresentaram dor durante a fase aguda da zona e em doentes com envolvimento de múltiplos dermatomas. Há uma correlação positiva entre a idade e o aparecimento de HZ e o risco de NPH (Watson *et al.*, 1991a) (Mounsey *et al.*, 2005). Muitos estudos demonstram que a terapêutica antiviral do herpes zoster pode diminuir substancialmente o risco de desenvolvimento de NPH bem como a sua duração, caso esta se manifeste (Thakur *et al.*, 2010).

A fisiopatologia da NPH envolve processos periféricos e centrais (Thakur *et al.*, 2010) (Argoff, 2011). A replicação viral do VZV conduz a lesão inflamatória e neuronal, com consequente sensibilização dos componentes dos sistemas nervosos sensitivos central e periférico.

Durante o episódio de HZ, o vírus dominante torna-se ativado, replica-se e propaga-se ao longo do nervo afetado, podendo circular também pela via sanguínea. Estes mecanismos desencadeiam uma resposta imunitária e inflamatória, que pode lesar quer neurónios centrais quer neurónios periféricos. Localmente ocorre perda da inibição dos sinais de nociceção (como consequência da lesão dos nervos periféricos), o que conduz a uma diminuição do limiar de ativação dos nociceptores e produz cargas ectópicas espontâneas – sensibilização periférica. A inibição das vias descendentes da dor também aumenta à medida que ocorrem alterações nos neurónios do corno posterior da espinhal medula (consequência da atividade e inflamação dos nervos periféricos), conduzindo à sensibilização central. A morte dos neurónios periféricos e a reorganização anormal dos neurónios “desaferenciados” da espinhal medula podem originar a dor espontânea e persistente da NPH (Argoff, 2011). A infecção viral pode causar lesão, quer de neurónios motores, quer sensitivos, com consequente cicatrização de troncos nervosos periféricos, gânglios espinhais, raízes nervosas ou corno posterior da medula espinhal (Fleming *et al.*, 2009).

Há evidência de que vários fatores de risco contribuem de forma independente para o desenvolvimento de dor crónica e que refletem diferentes mecanismos fisiopatológicos subjacentes à NPH (Dworkin *et al.*, 2001) (Jung *et al.*, 2004) (Thakur *et al.*, 2010). Por exemplo, os doentes idosos que têm maior risco de NPH, têm maior probabilidade de

apresentar polineuropatia subclínica, o que reduz o limiar de carga viral necessária para causar NPH (Baron *et al.*, 1997) (Thakur *et al.*, 2010). A presença de pródromo reflete lesão viral mais precoce e mais extensa dos gânglios sensitivos afetados (Watson *et al.*, 1991b). A maior severidade do *rash* reflete a maior lesão e a maior perda de fibras nervosas epidérmicas (Oaklander *et al.*, 1998) (Thakur *et al.*, 2010). A maior intensidade da dor reflete o início de processos de sensibilização periférica e central do sistema nervoso sensitivo (Thakur *et al.*, 2010). As infecções HZ mais severas são acompanhadas de lesão nervosa mais extensa, o que parece contribuir para o desenvolvimento da NPH (Thakur *et al.*, 2010). No entanto, o conhecimento da fisiopatologia da NPH ainda é muito limitado, sendo maioritariamente conseguido pelos estudos das autópsias, biópsias cutâneas e estudos neuroanatômicos.

Vários mecanismos podem coexistir num mesmo doente e podem existir diferentes subgrupos patofisiológicos de doentes (Fields *et al.*, 1998) (Rowbotham *et al.*, 1998a). Através da comparação de autópsias de indivíduos com e sem NPH verificou-se que os doentes com NPH apresentam marcada atrofia do corno posterior da medula espinal ipsilateral. As biópsias cutâneas permitiram a medição quantitativa das terminações nervosas sensitivas epidérmicas, demonstrando que os doentes com NPH apresentam menor densidade de inervação nos dermatômos afetados (Thakur *et al.*, 2010).

Nas biópsias *pos-mortem* e cutâneas apenas se detetam patologia nos doentes com NPH e não nos portadores de HZ sem NPH. Rowbotham e Fields fizeram alguns estudos sobre disfunção sensitiva e resposta farmacológica na NPH (Fields *et al.*, 1998) (Rowbotham *et al.*, 1998a). Os resultados enfatizaram o papel dos processos centrais na disfunção sensitiva interpretativa e na sua relação com a dor nos doentes com NPH. Sugeriram dois mecanismos fisiopatológicos diferentes: sensibilização e diferenciação (Baron *et al.*, 1993) (Baron *et al.*, 1995) (Thakur *et al.*, 2010). A sensibilização periférica e central contribuem ambas para a NPH. A sensibilização periférica ocorre predominantemente nas fibras C não mielinizadas. Clinicamente pode existir perda sensitiva mínima em áreas de marcada alodinia (Baron *et al.*, 1993) (Fields *et al.*, 1998). Contudo, os limiares podem estar diminuídos (hiperalgesia térmica) cerca de 2 a 4°C nas áreas de alodinia, devido à sensibilização periférica (Thakur *et al.*, 2010). Isto sugere que a sensibilização dos nociceptores C pode ser responsável pela dor tipo queimadura espontânea e hiperalgesia térmica em alguns doentes.

Em muitos doentes com NPH, a área de alodinia mecânica ou táctil é muito maior do que a área originalmente afetada por HZ e a área dolorosa pode ser variável no tempo. Em alguns, a

alodinia pode ser causada por descargas ectópicas dos nociceptores C lesados, que mantêm a sensibilização central (Fields *et al.*, 1998) (Peterson *et al.*, 2000). O neurotransmissor excitatório *major* no processamento da dor na medula óssea é o glutamato e o recetor de ligação NMDA, os quais têm um papel fundamental na sensibilização central. A alodinia tátil e dinâmica pode resultar também do aparecimento de fibras A δ nas camadas superficiais do corno posterior da medula, devido a perda parcial de *input* pelas fibras C. Isto pode conduzir a conexões entre estas fibras, que geralmente não transmitem dor, com as vias dolorosas ascendentes, que primariamente seriam responsáveis pelos *inputs* das fibras C. Isto explica porque é que estímulos não dolorosos ou o simples toque luminoso ou pressão podem desencadear dor nestes doentes (Thakur *et al.*, 2010).

A desaferenciação também pode ter um papel importante na manutenção da NPH. Em alguns doentes há uma perda de fibras sensitivas aferentes de pequeno e grande calibre. Esta perda de *inputs* periféricos pode resultar em descarga espontânea nos neurónios centrais desaferenciados. Isto pode conduzir a dor nas áreas de perda sensitiva (Fields *et al.*, 1998) e podem ainda conduzir a severos mecanismos de alodinia (Wasner *et al.*, 2005). Assumindo que as conexões das raízes nervosas dos gânglios dorsais e centrais estão lesadas, esta dor pode dever-se a alterações intrínsecas do sistema nervoso central. Algumas evidências bibliográficas sugerem que podem existir grupos de doentes com NPH causado e mantido por diferentes mecanismos. Isto pode justificar a variabilidade da apresentação da dor. Infelizmente não há ainda tratamentos baseados nestes mecanismos selecionados por cada doente.

2.3.6 – NPH - Clínica

Vários sinais e sintomas são característicos nos doentes com NPH, mas nenhum é patognomónico. Estes incluem vários tipos de dor independentes de estímulo doloroso, descritas, por exemplo, como dor aguda intermitente, pontada, choque elétrico, queimadura constante ou dor latejante (Fleming *et al.*, 2009). A dor evocada por estímulos dolorosos também é muito comum. A alodinia tátil, por exemplo, é um dos sintomas mais debilitantes associados à NPH, podendo ser tão severa nos doentes com NPH dos dermatómos craniofaciais que impossibilita o uso de chapéu, óculos ou contacto com brisa ou ar

condicionado (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Fleming *et al.*, 2009). Ocorre em quase 90% dos casos de NPH (Attal *et al.*, 2006). Se localizada no tronco pode ser tão intensa que os doentes não conseguem tolerar o toque da roupa na pele. A hiperalgesia, ou seja, a percepção anormalmente elevada de dor em resposta a estímulos dolorosos, pode ocorrer por estímulos mecânicos ou térmicos (Fleming *et al.*, 2009). Estes dois tipos de dor supracitados devem-se não só à lesão nervosa (dor neuropática) mas também à dor musculoesquelética resultante da contração excessiva da zona afetada. Os pontos *trigger* dolorosos miofasciais, atrofia e diminuição da mobilidade articular podem ocorrer em consequência da tensão gerada pela dor severa (Thakur *et al.*, 2010).

Outras alterações sensitivas também são comuns na NPH. As áreas comprometidas podem apresentar hipostesia (por vezes, em simultâneo com alodinia táctil), geralmente numa área superior à afetada pelo *rash* cutâneo. As alterações da sensibilidade térmica também foram demonstradas em alguns doentes, bem como parestesias e disestesias (sensação anormal ou desagradável não dolorosa). O prurido crónico pode persistir ou desenvolver-se após o HZ, podendo coexistir com ou sem dor (Thakur *et al.*, 2010).

Após o desaparecimento do *rash* cutâneo podem surgir áreas de hiper ou hipopigmentação ou mesmo de cicatriz nos dermatómos afetados, podendo manter-se um rubor ou coloração acastanhada persistente (Thakur *et al.*, 2010).

Menos estudada e, por norma, menos incapacitante do que a dor, é a alteração da função motora que também pode persistir. Se o HZ tiver envolvimento facial, a paralisia facial pode surgir sob a forma de ptose ou perda do sulco nasolabial. Se houver envolvimento torácico, podem surgir deformidades do tronco por fraqueza dos nervos intercostais (Thakur *et al.*, 2010).

2.3.7 – NPH - Diagnóstico e Avaliação

O diagnóstico da NPH é essencialmente clínico (Mounsey *et al.*, 2005). Geralmente caracteriza-se por história de *rash* por HZ seguido por dor persistente na mesma distribuição cutânea. Ocasionalmente, os doentes reportam um período quiescente entre a resolução e a dor associada à infeção por HZ e o início da dor por NPH. Num estudo de 156 doentes com NPH, Watson e colegas verificaram que em 25% dos casos o início dos sintomas de NPH surgiu apenas algum tempo após o *rash* sem sintomas (Watson *et al.*, 1991a). Este hiato

sintomatológico prolonga-se de uma semana a 12 meses. A recorrência de dor no dermatomo não se associa a novo episódio de infecção por HZ, mas coincide com alterações nas condições físicas e emocionais do doente. Contudo, nem todos os doentes apresentam uma história típica de *rash*. Nestes casos, o diagnóstico definitivo de dor associado ao VZV requer avaliação serológica.

Além da avaliação da localização, intensidade e características da dor, é importante avaliar o impacto global da dor na qualidade de vida do doente. A NPH pode condicionar um impacto significativamente deletério no funcionamento físico, emocional e social do indivíduo (Dworkin *et al.*, 2001) (Thakur *et al.*, 2010). Pode desencadear fadiga, insônia, ansiedade, depressão e mesmo ideação suicida, tornando-se imprescindível a avaliação de comorbidades e antecedentes psiquiátricos. A DNe por NPH pode não só causar um nível de sofrimento individual significativo como também um elevado custo económico à sociedade (Opstelten *et al.*, 2002) (Tyring, 2007).

Em caso de dúvida diagnóstica, o teste mais sensível e mais específico é a deteção de DNA viral através de *polymerase chain reaction* (PCR) no líquido das vesículas. Como método alternativo existe a imunofluorescência direta com antigénios (Mounsey *et al.*, 2005). A cultura de vírus tem baixa sensibilidade (Mounsey *et al.*, 2005). Os testes quantitativos sensitivos, biópsia cutânea, estudos de condução nervosa, entre outros têm aplicabilidade limitada (Mounsey *et al.*, 2005).

2.3.8 – NPH - Tratamento

Os tratamentos eficazes para a NPH são: antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, analgésicos opióides e lidocaína tópica (Tyring, 2007) (IASP; 2010) (Attal *et al.*, 2010). As intervenções invasivas e modalidades alternativas têm um papel limitado, embora possam ser utilizadas em doentes refratários ao tratamento convencional (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Fleming *et al.*, 2009). A escolha da terapêutica deve ser individualizada, baseada nas comorbidades, uso de medicação e sintomas associados. Estudos recentes avaliaram a eficácia relativa destes tratamentos (Finnerup *et al.*, 2005) (Dworkin *et al.*, 2003). Além disso, recomendações e *guidelines* de consenso para o tratamento farmacoterapêutico da DNe, incluindo NPH, foram publicadas e servem como princípios orientadores (Dworkin *et al.*,

2007) (Moulin *et al.*, 2007) (IASP, 2010) (NICE, 2010) (Attal *et al.*, 2010) (DGS, 2011). Na prática clínica, os antidepressivos tricíclicos, os anticonvulsivantes gabapentina e pregabalina e a lidocaína tópica a 5% são utilizados como primeira linha de tratamento. Os opióides *major*, o tramadol e o creme e *patch* de capsaicina estão remetidos para segunda ou terceira linhas em diferentes *guidelines* (Argoff, 2011). As principais *guidelines* incluídas neste estudo de Argoff (2011) foram as da Academia Americana de Neurologia (Dubinsky *et al.*, 2004), a do Grupo de Estudo de DNe da IASP (Dworkin *et al.*, 2007) (IASP, 2010) e a da Federação Europeia das Sociedades de Neurologia (Attal *et al.*, 2010).

Segundo a revisão sistemática feita por Mounsey *et al.* (2005), o uso de antidepressivos tricíclicos e de gabapentina tem força de recomendação A (SORT da *American Academy of Family Physicians* (AAFP) correspondente a evidência consistente de boa qualidade orientada para o doente). Segundo Garroway *et al.* (2009), os antidepressivos tricíclicos, gabapentina e pregabalina têm força de recomendação SORT A (pelo menos 2 ensaios clínicos randomizados, controlados de boa qualidade e/ou meta-análises) na redução da dor da NPH. Os opióides demonstraram força de recomendação SORT A no alívio da dor e os *patches* de capsaicina e de lidocaína a 5% apresentaram força de recomendação SORT B (recomendações de meta-análises e ensaios clínicos controlados e randomizados de menor qualidade) no alívio da dor e diminuição da alodinia (Garroway *et al.*, 2009).

Segundo Attal *et al.* (2010), as terapêuticas recomendadas na primeira linha de tratamento da NPH são os antidepressivos tricíclicos ou a gabapentina/pregabalina (nível A) ou a lidocaína tópica (nível A, mas estudos menos consensuais), que pela sua excelente segurança pode ser utilizada nos idosos ou se efeitos secundários de terapêutica oral. Os opióides *major* (nível A) e o creme de capsaicina são reconhecidos como terapêuticas de segunda linha. O *patch* de capsaicina poderá ser uma opção promissora mas ainda há escassez de estudos a longo prazo. (Attal *et al.*, 2010)

A tabela seguinte (tabela 7) apresenta o resumo de vários ensaios clínicos randomizados e controlados efectuados para alguns fármacos utilizados no tratamento da DNe da NPH.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO *PATCH* DE LIDOCAÍNA A 5%, UTILIZADO NA DOR NEUROPÁTICA CRÓNICA, EM PELE HUMANA OBTIDA POR ENGENHARIA TECIDULAR

Estudos	Fármaco	Design	Nº de doentes (n)	Dose máxima (mg)	Duração do tratamento (sem)	Resultado
Watson 1982	Amitriptilina	Cruzado	24	137,5	3	A>P
Raja 2002	Nortriptilina	Cruzado	46	140	8	A>P
Kishore-Kumar 1990	Desipramina	Cruzado	19	250	6	A>P
Raja 2002	Desipramina	Cruzado	13	160	8	A>P
Rice 2001	Gabapentina	Paralelo	223	2400	7	A>P
Rowbotham 1998a	Gabapentina	Paralelo	113	3600	8	A>P
*Gilron 2005	Gabapentina	Cruzado	57	3200	5	A>P; A<morfina
*Freynhagen 2005	Pregabalina	Paralelo	273	600	12	A>P
Sabatowski 2004	Pregabalina	Paralelo	157	300	8	A>P
Dworkin 2003	Pregabalina	Paralelo	89	600	8	A>P
Van Seventer 2006	Pregabalina	Paralelo	273	600	13	A>P
Raja 2002	Morfina	Cruzado	38	225	8	A>P
Raja 2002	Metadona	Cruzado	26	80	8	A>P
Boureau 2003	Tramadol	Paralelo	63	400	6	A>P
Bernstein 1989	Creme Capsaicina	Paralelo	16	0,075%, 3-4/dia	6	A>P
Watson 1993	Creme Capsaicina	Paralelo	74	0,075%, 4/dia	6	A>P
Rowbotham 1995	Gel Lidocaína	Cruzado	39	5%	9	A>P

Rowbotham 1996	Patch Lidocaína	Cruzado	35	5%	24 horas	A>P
Galer 1999	Patch Lidocaína	Cruzado	32	5%	2 – 14	A>P
Nelson 1997	Dextramorf ano	Cruzado	13	960	6	A=P
Sang 2002	Dextramorf ano	Cruzado	17	400	9	A=P
Sang 2002	Memantina	Cruzado	17	35	9	A=P
Eisenberg 1998	Memantina	Paralelo	12	20	5	A=P

Tabela 7 – Sumário dos ensaios clínicos randomizados e controlados de vários fármacos utilizados no tratamento da DNe da NPH. (Legenda: *Estes estudos incluíram também doentes com PND; A – Fármaco estudado; P – Placebo)

(Adaptado de Eisenberg *et al.*, 2010)

2.3.8.1) Anticonvulsivantes: Gabapentina e Pregabalina

Os anticonvulsivantes com maior evidência de eficácia na DNe são a gabapentina e a pregabalina (Tyring, 2007). São ambos bem tolerados e com menor toxicidade do que os anticonvulsivantes de primeira geração. Ambos são recomendados no tratamento da NPH pelas *guidelines* da AAN, EFNS e NeuroPSIG (Dubinsky *et al.*, 2004) (Mounsey *et al.*, 2005) (Whizar-Lugo *et al.*, 2005) (Cruciani *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007) (Tyring, 2007) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Attal *et al.*, 2010) (IASP, 2010) (Argoff, 2011) (DGS, 2011).

Há boa evidência do uso da gabapentina na NPH. O seu uso está associado a diminuições estatisticamente significativas da dor diária, no estado de ânimo e na qualidade de vida, para posologias de 1800 a 3600 mg (Rowbotham *et al.*, 1998b) (Thakur *et al.*, 2010). Uma metanálise indicou que o NNT para a gabapentina no tratamento da NPH é aproximadamente 4,4 (Hempenstall *et al.*, 2005) (Attal *et al.*, 2006). A revisão sistemática da *Cochrane* calculou o seu NNT em 7,5 (Argoff, 2011). O mecanismo de ação analgésica da gabapentina consiste na atuação na subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes da voltagem, diminuindo o influxo de cálcio, que, por sua vez, inibe a libertação de neurotransmissores excitatórios, incluindo o glutamato (Bennett *et al.*, 2004) (Cruciani *et al.*, 2006) (Fleming *et al.*, 2009). A

gabapentina é rapidamente absorvida após ingestão oral. A absorção é mediada, em parte, por um mecanismo de transporte, que se torna saturado com doses elevadas, o que reduz a biodisponibilidade da gabapentina para 60% em doses de 300 mg e para os 40% em doses de 600 mg. O pico da concentração ocorre cerca de 3 horas após a administração e a sua eliminação é processada por via renal. A posologia ideal não está bem definida. Uma revisão sistemática recente sugere que deve ser iniciada na dosagem de 300 mg no primeiro dia, seguido de 300 mg duas vezes ao dia, aumentando para três tomas no terceiro dia (Thakur *et al.*, 2010). A titulação deve ser depois mais lenta, com o objetivo de atingir três tomas de 600 mg em 2 semanas. Doses diárias de 3600 mg, divididos em três ou quatro tomas demonstraram eficácia (Rowbotham *et al.*, 1998b). Nos indivíduos mais idosos a titulação deve ser ainda em ritmo mais lento, iniciada com 100 mg diários e aumentos de 100 mg cada três dias. A taxa de titulação pode ser aumentada para 300 mg cada três dias após doente tolerar as 600 mg diárias. A dose máxima será 1800 a 2400 mg por dia. Os efeitos secundário, como sonolência (16%), tontura (21%), edemas periféricos (8%), alterações de equilíbrio e da marcha são, geralmente, de curta duração, mas devem ser cuidadosamente monitorizados (Tyring, 2007) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Argoff, 2011). Ensaios clínicos verificaram que a descontinuação da medicação por efeitos adversos foi de 12% para a gabapentina em comparação com 8% para o grupo controlo (Argoff, 2011).

A pregabalina parece ter um mecanismo de ação semelhante à gabapentina. Muitos ensaios clínicos randomizados demonstram a sua eficácia no tratamento da NPH (Cruciani *et al.*, 2006) (Attal *et al.*, 2010). Três ensaios clínicos duplamente cegos, com um total de 776 doentes com NPH, demonstraram um alívio da dor e uma melhoria da qualidade do sono superior ao placebo (Tyring, 2007). As doses estudadas foram de 150 a 600 mg diários (Frampton *et al.*, 2005), em esquemas fixos ou flexíveis (Dworkin *et al.*, 2003) (Freyenhagen *et al.*, 2005). O NNT calculado para a pregabalina na revisão da *Cochrane* foi de 3,9 (Argoff, 2011). Os efeitos secundários são semelhantes aos da gabapentina e, provavelmente, poderá apresentar maior conveniência dada a posologia bidiária e maior facilidade de titulação. Demonstrou maior rapidez na obtenção do efeito analgésico quando comparado com a gabapentina. (Cruciani *et al.*, 2006) (Fleming *et al.*, 2009) Para doses maiores verificou-se maior taxa de efeitos adversos e cerca de 4-15% dos doentes de um ensaio clínico descontinuaram a medicação por essa razão (Argoff, 2011).

2.3.8.2) Antidepressivos Tricíclicos

Vários mecanismos podem explicar a sua eficácia no tratamento da NPH: inibição da recaptação da noradrenalina e da serotonina e bloqueio dos canais de sódio (Fleming *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010). Vários ensaios clínicos randomizados e controlados classe I e II e metanálises demonstraram a sua eficácia no tratamento de NPH, com NNT variável entre 2,1 e 2,6 (Hempenstall *et al.*, 2005) (Fleming *et al.*, 2009) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010) (Attal *et al.*, 2010) (NICE; 2010) (Barkin *et al.*, 2011). A revisão sistemática da *Cochrane* de 2007 envolvendo quatro ensaios clínicos (244 pacientes com NPH) calculou o NNT destes fármacos em 2,7 (Argoff, 2011). A evidência clínica disponível sugere que quer a amitriptilina, quer a nortriptilina ou a desipramina podem ser eficazes na NPH (Watson *et al.*, 1998b) (Hempenstall *et al.*, 2005) (Rowbotham *et al.*, 2005), sendo estas últimas melhor toleradas (Attal *et al.*, 2006) (Argoff, 2011). Foi atribuído força de recomendação B (SORT da AAFP correspondente a evidência de qualidade limitada ou inconsistente orientada para o doente) ao uso da amitriptilina na diminuição do risco de NPH nos doentes idosos (Mounsey *et al.*, 2005) (Cruciani *et al.*, 2006). A amitriptilina e a nortriptilina também possuem efeitos sedativos. Os principais efeitos secundários desta classe farmacológica são: taquiarritmias, aumento do intervalo QT, com potencial agravamento de arritmias ameaçadoras da vida e agravamento do glaucoma de ângulo fechado (Finnerup *et al.*, 2005) (Argoff, 2011). É prudente fazer um eletrocardiograma prévio nos idosos ou doentes com risco de patologia cardíaca (Thakur *et al.*, 2010). Como efeitos secundários *minor* refiram-se xerostomia, tontura, ganho ponderal, sedação, obstipação, retenção urinária e hipotensão ortostática (Tyring, 2007) (Sampathkumar *et al.*, 2009). Deve ser iniciado em doses baixas podendo ser titulado lentamente. Nos indivíduos idosos ou mais debilitados deve iniciar-se com doses ainda mais baixas (10 mg de amitriptilina). Caso haja prescrição concomitante de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina deve ser monitorizado cuidadosamente o risco de toxicidade por síndrome serotoninérgica.

2.3.8.3) Antidepressivos Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

Embora não tenham sido estudados especificamente na NPH, mostraram eficácia nas PND e DNe periféricas (Attal *et al.*, 2006) (Barkin *et al.*, 2011). Clinicamente são melhor tolerados do que os antidepressivos tricíclicos e, na prática clínica, também têm sido utilizados na NPH.

Dois ensaios clínicos randomizados demonstraram que a venlafaxina em doses mais elevadas pode ser eficaz, sobretudo na dor por PND (Cruciani *et al.*, 2006) (Sampathkumar *et al.*, 2009).

2.3.8.4) Analgésicos Opióides Major

Historicamente o seu uso na DNe é controverso (Sampathkumar *et al.*, 2009). No entanto, as evidências científicas mais recentes demonstraram a sua eficácia, inclusivamente na NPH (Cruciani *et al.*, 2006) (Argoff, 2011). A oxicodona, a morfina e a metadona demonstraram eficácia comparável aos ADT num ensaio clínico, embora com maior incidência de efeitos adversos (Attal *et al.*, 2010). Os seus efeitos secundários e o seu potencial de tolerância, dependência e uso abusivo remetem a sua recomendação para segunda ou terceira linhas de tratamento (Attal *et al.*, 2006) (Dworkin *et al.*, 2007) (Moulin *et al.*, 2007) (Tyring, 2007). A sua eficácia analgésica é equiparada à dos antidepressivos e dos anticonvulsivantes (Raja *et al.*, 2002). A eficácia analgésica da oxicodona oral foi avaliada num ensaio clínico cruzado duplamente cego, com benefício na redução da alodinia, da dor paroxística espontânea e da dor persistente (Watson *et al.*, 1998a). A sua eficácia analgésica global, diminuição da incapacidade e preferência do utente também foi superior ao placebo (Mounsey *et al.*, 2005). O NNT calculado para redução de cerca de 50% da dor num estudo com doentes com NPH foi de 2,7 para a morfina ou para a metadona (Attal *et al.*, 2006) (Argoff, 2011). Num outro ensaio clínico randomizado, o tratamento com morfina (dose média de 91 mcg diário) ou de metadona (dose média de 15 mcg diária) foi comparada ao placebo, demonstrando-se maior alívio da dor para os primeiros (Raja *et al.*, 2002). Neste mesmo estudo também foi avaliada comparativamente a eficácia dos opióides em relação aos antidepressivos tricíclicos, com melhor resultado de NNT para os opióides (2,79 *versus* 3,73) (Raja *et al.*, 2002). Num ensaio clínico controlado e cruzado, verificou-se que a maioria dos doentes (53%) preferiam os opióides morfina ou metadona aos antidepressivos tricíclicos, demonstrando assim um maior alívio da dor, embora não estatisticamente significativo (Tyring, 2007) (Argoff, 2011). No entanto, os efeitos secundários também foram superiores para os opióides relativamente aos antidepressivos tricíclicos e à gabapentina (Raja *et al.*, 2002) (Gilron *et al.*, 2005). Os efeitos adversos mais comuns são náuseas, sedação, retenção urinária, prurido e obstipação (Mounsey *et al.*, 2005) (Cruciani *et al.*, 2006) (Sampathkumar *et al.*, 2009). É importante fazer a monitorização da função imunológica e hipogonadismo no seu uso crónico. Outros

efeitos nefastos são a tolerância, a dependência física e a hiperalgesia induzida (Barkin *et al.*, 2011). Então, as recomendações clínicas ao uso dos opióides no tratamento da NPH são: (1) usar a menor dose eficaz; (2) iniciar o tratamento com opióides de curta duração de ação, por exemplo, 10 a 15 mcg de morfina cada 4 horas; (3) a partir do momento em que o doente tolera a terapêutica inicial, converter em opióide de longa duração de ação, titulando para o mínimo de dose eficaz tolerada; (4) antecipar os efeitos secundários comuns, nomeadamente náuseas e obstipação; (5) avaliar regularmente a eficácia e a tolerabilidade e (6) se o tratamento se revelar ineficaz, deve ser retirado gradualmente.

2.3.8.5) Tramadol

O mecanismo de ação do tramadol é único: efeito agonista μ e inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina. A sua eficácia na DNe já foi demonstrada em alguns ensaios clínicos randomizados e controlados na NPH comparativamente ao placebo (Fleming *et al.*, 2009). O NNT para alívio da dor e melhoria da qualidade de vida foi estimado em 4,8 (Boureau *et al.*, 2003) para doses de tramadol de 50 a 100 mg de 4 em 4 horas segundo a necessidade do doente, até ao máximo permitido. Provou-se ser menos eficaz do que os opióides *major* (Argoff, 2011). A dose diária máxima é de 400 mg, sendo estas mais baixas nos idosos e insuficientes renais. Os efeitos adversos incluem náuseas, vômitos, tonturas, obstipação, sonolência e cefaleia. Pode também associar-se a um risco convulsivante em doentes com história de epilepsia.

2.3.8.6) Terapêuticas Tópicas

As terapêuticas tópicas apresentam como vantagem o menor efeito adverso sistémico dado serem minimamente absorvidos sistemicamente. O *patch* de lidocaína a 5% e a capsaicina estão aprovados pela FDA na NPH (Thakur *et al.*, 2010).

Patch de Lidocaína 5%

O *patch* de lidocaína tópica a 5% tem efeito analgésico local, por ação tópica nos canais de sódio dependentes da voltagem patológicos presentes nas terminações nervosas e queratinócitos (Fleming *et al.*, 2009). Estes canais ficam então acumulados nos nervos lesados e originam impulsos ectópicos. Foi descrito como um analgésico periférico que tem como alvo os nervos lesados e/ou sensibilizados, podendo produzir um efeito analgésico sem

originar secundariamente outros défices sensitivos (Fleming *et al.*, 2009). Ensaios clínicos de classe I e II demonstraram a sua maior eficácia no tratamento da alodinia de indivíduos com NPH em relação ao *patch* de placebo (Rowbotham *et al.*, 1996) (Galer *et al.*, 1999) (Mounsey *et al.*, 2005) (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Attal *et al.*, 2010) (Barkin *et al.*, 2011). As três guidelines abordadas na revisão sistemática de Argoff (2011), consideram o *patch* de lidocaína a 5% como agente de primeira linha no tratamento da DNe por NPH. O NNT estimado foi de 4,4 doentes (Meier *et al.*, 2003). Esta resposta analgésica parece existir mesmo nos doentes cuja pele do local não tem nociceptores (Wasner *et al.*, 2005). A sua eficácia pode ser avaliada em duas a três semanas após o início do tratamento. Alguns ensaios clínicos demonstraram uma eficácia superior à pregabalina. (Baron *et al.*, 2009a) (Binder *et al.*, 2009) (Baron *et al.*, 2009b) (Argoff, 2011) Não foram demonstrados efeitos secundários significativamente diferentes do placebo, pelo que se infere uma excelente segurança e tolerabilidade (Tyring, 2007) (Barkin *et al.*, 2011).

Um estudo retrospectivo de 2009 fez o levantamento do uso do *patch* de lidocaína a 5% nos doentes oncológicos internados numa unidade de cuidados paliativos. A sua eficácia foi verificada embora com resultados variáveis (Fleming *et al.*, 2009). A incidência de reações cutâneas moderadas no local de aplicação foi de aproximadamente 8% nesta série de dados (Fleming *et al.*, 2009).

Uma metanálise de 2009, que incluiu 38 publicações, demonstrou a eficácia da lidocaína a 5% no tratamento da NPH (nível de evidência I), com NNT calculado de 2. O efeito adverso mais comum foi a irritação cutânea local (Fleming *et al.*, 2009).

Um ensaio clínico a 12 meses, envolvendo 247 doentes com NPH, comprovou a sua eficácia a longo prazo. Neste estudo, 15% dos doentes apresentaram efeitos adversos no local de aplicação do emplastro (Hans *et al.*, 2009) (Argoff, 2011).

O *patch* de lidocaína a 5% não está aprovado no HZ e não deve ser utilizado nas lesões ativas. O gel de lidocaína também demonstrou eficácia no alívio da alodinia da NPH, podendo substituir o *patch* em caso de dificuldade da sua aplicação (Rowbotham *et al.*, 1995).

As recomendações terapêuticas para o uso do *patch* de lidocaína a 5% na NPH são: (1) podem ser cortados para se ajustar à área afetada; (2) podem ser aplicados três *patches* simultâneos sem acréscimo de risco sistémico; (3) recomenda-se a sua manutenção na pele durante 12 horas, seguidas de 12 horas livres, mas podem ser alargados os períodos de exposição a 18

horas para aumentar a eficácia; (4) só devem ser aplicados em pele íntegra e diretamente na área de maior dor (Fleming *et al.*, 2009).

Capsaicina Tópica

A capsaicina atua como agonista dos recetores vanilóides (TRPV1) presentes nos nociceptores dos terminais aferentes (Fleming *et al.*, 2009) Não apresenta efeitos sistêmicos. Dois estudos controlados evidenciaram o maior alívio da dor após três a quatro aplicações diárias de capsaicina a 0,075%. O NNT estimado foi de 3,3 doentes (Thakur *et al.*, 2010). De acordo com a revisão da *Cochrane* de 2009, o NNT para qualquer alívio de dor em doentes com NPH foi de 6,6 para o creme de capsaicina a 0,075%. No entanto, apresenta como limitação a sensação de queimadura cutânea, que limita igualmente a realização de ensaios clínicos (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Tyring, 2007). Os ensaios clínicos mais longos avaliaram a sua eficácia em aplicação única a uma concentração de 8%, seguida da aplicação de anestésico local, tendo demonstrado o prolongamento do alívio da dor na NPH (Backonja, 2007) (Attal *et al.*, 2010). As *guidelines* da EFNS advogam maior eficácia do *patch* de lidocaína a 5% comparativamente ao creme de capsaicina, embora reconheçam este último e o *patch* de capsaicina a 8% como alternativas de segunda linha no tratamento da NPH (Argoff, 2011).

Outros Agentes Tópicos

O uso de anti-inflamatórios não esteroides tópicos na NPH foi estudado em vários ensaios clínicos controlados e randomizados, mas os resultados foram muito heterogêneos. Assim, não há recomendação para o seu uso.

Outros tópicos, tais como antidepressivos tricíclicos e vincristina, também foram estudados, sem resultados positivos.

2.3.8.7) Terapêuticas Combinadas

Embora na prática clínica seja comum o uso de terapêuticas combinadas, existem poucos estudos que o demonstrem (Thakur *et al.*, 2010). O objetivo da terapêutica em associação é a obtenção de um balanço melhorado entre a eficácia e a tolerabilidade do tratamento, conseguindo maior alívio da dor com menores efeitos adversos (Whizar-Lugo *et al.*, 2005). As desvantagens são a potenciação de alguns efeitos secundários por interação

medicamentosa. Um ensaio clínico demonstrou que o uso combinado de gabapentina e morfina teve uma maior eficácia no alívio da dor por PND e por NPH do que o seu uso isolado (Dworkin *et al.*, 2007). Nas *guidelines* da EFNS, 2010, há referência a estudos positivos com associações de oxicodona com pregabalina e de gabapentina com nortriptilina, gabapentina com morfina e pregabalina com *patch* de lidocaína a 5%. (Attal *et al.*, 2010)

2.3.8.8) Outras Terapêuticas Farmacológicas

Muitos outros agentes farmacológicos têm sido estudados, mas a evidência científica obtida tem sido escassa. Como exemplos, são de referir os antagonistas dos NMDA (memantina e dextrometorfano), os bloqueadores dos canais de sódio (mexiletina – análogo da lidocaína), outros antidepressivos (paroxetina, bupropion, citalopram) e outros anticonvulsivantes (lamotrigina, ácido valpróico, topiramato, carbamazepina ou oxcarbazepina) (Argoff, 2011).

2.3.8.9) Terapêuticas Invasivas

Em doentes com NPH que não respondem ao tratamento farmacológico disponível, pode ser necessário o envio a um serviço de controlo da dor, podendo ser ponderado o recurso a intervenções invasivas (Thakur *et al.*, 2010). Várias técnicas têm sido estudadas, mas existem poucos estudos controlados. A sua escolha depende em maior escala da experiência clínica do médico. Algumas das técnicas utilizadas são: (1) Bloqueio de nervos simpáticos; (2) Bloqueio neuroaxial; (3) Bloqueio de nervos periféricos e (4) Estimulação da espinhal medula (Sampathkumar *et al.*, 2009) (Fleming *et al.*, 2009).

2.3.8.10) Intervenções Psicológicas

A NPH afeta negativamente a qualidade de vida do indivíduo, por alteração da sua funcionalidade física e emocional que, por sua vez, influencia o nível de dor (Thakur *et al.*, 2010). Apesar dos efeitos da terapia cognitivo-comportamental e de outras terapêuticas psicossociais não terem sido estudadas, sobretudo em doentes com NPH, parece lógico que possam ser utilizadas. Há muitos estudos que suportam estas terapias em dor crónica, sendo razoável extrapolar a sua eficácia relativa no tratamento de doentes com NPH.

2.3.8.11) Estimulação Nervosa Elétrica Transcutânea (TENS)

Os estudos sobre o uso da TENS na dor por NPH foram controversos. Apenas alguns sugeriram benefícios (série de casos). Dada a sua segurança, em caso de DNe refractária a outros tratamentos pode ser utilizada (Fleming *et al.*, 2009) (Thakur *et al.*, 2010).

2.3.8.12) Outras

As intervenções cirúrgicas também foram enunciadas na literatura, mas como forma de tratamento drástico, dadas as sequelas resultantes. A injeção por toxina botulínica também tem tido resultados promissores, mas os estudos são ainda considerados escassos (Argoff, 2011).

2.3.8.13) Conclusão

O HZ e a NPH afetam milhões de pessoas anualmente. Há necessidade de desenvolver estratégias melhoradas de tratamento. O estudo da fisiopatologia destas morbilidades pode direcionar para novas formas terapêuticas. Por exemplo, a compreensão do mecanismo biológico de passagem a fase crónica de dor poderia implicar novas terapêuticas com atuação mais rápida e eficaz na total recuperação da função neuronal. A investigação genómica pode também ser uma potencialidade (Thakur *et al.*, 2010).

Atualmente, o tratamento da NPH é um desafio. Há evidência sólida do uso de terapêuticas farmacológicas, incluindo antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina, emplastos de lidocaína tópica e opióides. Segundo Mounsey *et al.* (2005), o uso de *patch* de lidocaína, capsaicina e opióides tem força de recomendação B na redução da dor na NPH. A EFNS determinou em 2006 que os antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina e opióides têm eficácia estabelecida (força de recomendação A), mas recomendaram os opióides como segunda linha de tratamento devido aos potenciais efeitos adversos do uso prolongado (Attal *et al.*, 2010). Designaram a capsaicina, o tramadol e a lidocaína tópica como fármacos com menor eficácia e força de evidência mais limitada (força de recomendação B). No entanto, recomendaram como útil o uso de lidocaína tópica nos doentes mais idosos com alodinia e pequenas áreas de dor (Garroway *et al.*, 2009) (Attal *et al.*, 2010). Os seus benefícios relativos devem ser ponderados em consonância com a tolerabilidade de cada doente e seus efeitos adversos, sobretudo em idosos e pessoas mais debilitadas. As técnicas de tratamento invasivas

podem ser importantes no futuro mas ainda carecem de evidência clínica para o seu uso sistemático. Finalmente, não é de descorar o recurso simultâneo a técnicas educacionais, familiares e individuais e de suporte psicossocial.

Segundo a revisão sistemática de Attal *et al.* (2010), na NPH:

- 1) Fármacos com eficácia demonstrada: antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina e opióides (força de recomendação A, nível de evidência I).
- 2) Fármacos com menor eficácia ou limitada força de evidência: capsaicina, tramadol, lidocaína tópica e valproato de sódio (força de recomendação B).
- 3) Fármacos com baixa eficácia ou ineficácia: mexiletina, lorazepan e antagonistas dos recetores NMDA (força de recomendação A).
- 4) Recomendam como primeira linha terapêutica os antidepressivos tricíclicos e a gabapentina ou pregabalina.
- 5) A lidocaína tópica tem excelente tolerabilidade pelo que é preferível se doentes idosos, alodinia associada e pequenas áreas de dor.
- 6) Apesar da eficácia estabelecida, os opióides *major* podem ser reportados para segunda linha terapêutica.

Segundo a publicação de Dworkin *et al.* (2007), a percentagem de doentes que obtêm alívio da DNe não excede os 60%. Por isso, concluiu a importância de manter a investigação de novas medicações, ensaios clínicos com fármacos já utilizados e com associações de fármacos, identificação da eficácia não farmacológica de alguns tratamentos e desenvolver estratégias para prevenir a DNe.

2.3.9 – Nevralgia Pós-Herpética em Doentes Oncológicos

Nos doentes em Cuidados Paliativos, nomeadamente, do foro oncológico, é frequente a existência de neuropatias e DNe por NPH. O estado de imunossupressão causado pela própria neoplasia ou por tratamentos oncológicos favorecem a ocorrência de infeções oportunistas como o HZ, que podem evoluir para NPH, sobretudo nos mais idosos e mais imunodeprimidos (Attal *et al.*, 2006) (Cruciane *et al.*, 2006) (Cebrian-Cuenca *et al.*, 2010). Esta complicação pode ser extremamente dolorosa e debilitante, afetando a qualidade de vida destes doentes já de si fragilizados (Wolff *et al.*, 2010).

Um estudo em doentes imunocomprometidos reportou uma incidência de HZ em doentes com neoplasia, infeção HIV ou transplantação na ordem do 10,3 por 1000 habitantes por ano, em comparação com uma incidência de 3,0 por 1000 habitantes na população geral (Insinga *et al.*, 2005). De acordo com o estudo efetuado por Cebrian-Cuenca *et al.* (2010), cerca de 46% dos doentes com NPH apresentavam patologias concomitantes, sendo 11,5% imunodeprimidos devido a cancro ou a terapêutica imunossupressora.

A DNe provocada pela NPH pode ser extremamente difícil de controlar nos doentes oncológicos. A ponderação racional entre os benefícios e riscos de cada terapêutica será ainda mais complexa e indispensável. Tal como já foi referido nos pontos anteriores, as terapêuticas analgésicas nos doentes com NPH são variáveis.

Não esquecer que, mesmo quando aplicado o tratamento adequado, é difícil conseguir um controlo adequado da DNe, muitas vezes devido ao difícil balanço entre o alívio da dor e a tolerabilidade e efeitos adversos dos diferentes fármacos. A presença de DNe aumenta significativamente a média de tempo até a estabilização da dor e a quantidade de medicação adjuvante necessária nos doentes referenciados para os Cuidados Paliativos (Fleming *et al.*, 2009). Assim, é importante tentar descobrir e validar novas formas de alívio da dor, garantindo menores efeitos secundários e com o máximo conforto para os doentes em Cuidados Paliativos.

Acredita-se que os emplastros medicamentosos poderão ser uma alternativa viável para evitar alterações gástricas, metabolismo de primeira passagem hepática, variabilidade na concentração sanguínea, característicos das formulações orais (Jorge *et al.*, 2010). A lidocaína tópica pode surgir como terapêutica de primeira linha no tratamento de doentes com DNe periférica localizada, particularmente, em doentes com NPH e alodinia. Uma meta-análise de 2011 demonstrou que os tratamentos tópicos, como o *patch* de lidocaína a 5%, podem ser preferíveis no tratamento da NPH relativamente aos tratamentos sistémicos, porque resultaram num alívio da dor com igual eficácia, mas com absorção sistémica mínima e, consequentemente, menos efeitos secundários. No entanto, apesar de advogarem a ocorrência da menor significância clínica dos efeitos adversos da terapêutica tópica, o número de estudos ainda é muito limitado, bem como a qualidade e tamanho dos mesmos, sendo necessários estudos mais consistentes no âmbito dos doentes oncológicos (Wolff *et al.*, 2010).

De acordo com a elevada prevalência de DNe provocada por NPH e outras neuropatias associadas ao cancro e atendendo à evidência existente do uso do *patch* de lidocaína a 5% na

NPH e de outras neuropatias focais do doente oncológico, o uso desta terapêutica tópica no contexto dos Cuidados Paliativos é pertinente (Fleming *et al.*, 2009). Além disso, o conceito de um emplastro tópico de analgésico local como terapêutica para a alodinia, frequentemente presente nestes doentes oncológicos com NPH, tem grande interesse devido à simplicidade de formulação tópica, do seu benefício como barreira protetora da pele hipersensível contra os estímulos externos, ausência de absorção sistémica significativa, interações farmacológicas ou efeitos adversos significativos (Fleming *et al.*, 2009). No entanto, a literatura disponível relativa ao efeito do *patch* de lidocaína a 5% na DNe dos indivíduos com cancro é escassa (Fleming *et al.*, 2009). Existem apenas pequenos estudos controlados já efetuados, mas que advogam o potencial uso eficaz deste fármaco nos cuidados paliativos (Fleming *et al.*, 2009).

2.4 – PATCH DE LIDOCAÍNA A 5%

2.4.1 – Resenha Histórica do Patch de Lidocaína a 5%

A história da lidocaína remonta aos anos 30, quando o Professor Hans von Eulen (Prémio Nobel da Química em 1929) se interessou pelos alcaloides das gramíneas (cuja estrutura molecular é muito similar à da lidocaína) para produção de novos pesticidas (Wildsmith, 2011). O seu jovem colaborador, Holger Endtman, aquando da síntese laboratorial da gramina para confirmação da sua estrutura, errou e produziu a isogramina. Na sua análise verificou que esse composto produzia efeitos interessantes de dormência da língua e lábios, mas tinha potencial tóxico (Wildsmith, 2011). Em 1935, Nils Löfgren cria vários compostos derivados da isogramina. Em 1940, von Euler retoma essa investigação com o objetivo de produzir um anestésico local para uma pequena companhia farmacêutica sueca (*Pharmacia*), de onde surgiu um análogo da procaína (Wildsmith, 2011). Mas apenas em 1942, com o trabalho de Nils Löfgren se sintetizou pela primeira vez, sob a designação de xilocaína, a lidocaína (Wildsmith, 2011). O seu colega Bengt Lundqvist efetuou a primeira injeção do anestésico em si próprio (Wildsmith, 2011). Demonstrou-se a sua vantagem em relação aos restantes compostos anestésicos e a lidocaína foi comercializada em 1948 (Hernández *et al.*, 2009).

A lidocaína tem sido utilizada como anestésico local de duração intermédia, anestésico ocular e das mucosas. Também pode ser utilizada em infiltrações anestésicas locais e bloqueios regionais intravenosos e como antiarrítmico (Hernández *et al.*, 2009).

A aplicabilidade da lidocaína tópica na dor neuropática começou a ser motivo de interesse e o primeiro estudo (não cego) sobre a utilização da lidocaína em *patches* para o controlo de DNe foi realizado por Rowbotham e Fields (1989) – onze doentes com diagnósticos de NPH torácica ou do trigémio, tratados com *patches* de lidocaína a 10% e com melhoria na intensidade da dor (Hernández *et al.*, 2009).

2.4.2 – Formulação Química e Farmacocinética

O emplastro medicamentoso de lidocaína a 5% foi aprovado pelo Infarmed em março de 2010. O seu nome comercial é *Vessatis®* (Infarmed, 2010).

Cada emplastro tem 10 cm por 14 cm e a sua substância ativa consiste em 700 mg de lidocaína (5% p/p). O tecido de suporte e película protetora são compostos por polietileno de tereftalato (PE). Os restantes componentes do emplastro são: glicerol, sorbitol líquido, carmelose sódica, propilenoglicol (E1520), ureia, caulino pesado, ácido tartárico, gelatina, álcool polivinílico, glicinato de alumínio, edetato disódico, parahidroxibenzoato de metilo (E218), parahidroxibenzoato de propilo. (E216), ácido poliacrílico, poliacrílato sódico, água purificada (Infarmed, 2010).

A lidocaína é um anestésico local cujo efeito parece estar relacionado com a estabilização de membranas neuronais e regulação negativa dos canais de sódio dos feixes nervosos, e consequente diminuição da condução do sinal de perceção da dor (Davies *et al.*, 2004) (Dakin *et al.*, 2007). A lidocaína bloqueia os canais de sódio de alta voltagem e a sua aplicação tópica diminui as descargas ectópicas das fibras aferentes finas. O emplastro de lidocaína atua quer nos recetores aferentes com hiperalgesia anormal, como também revelou eficácia nas regiões cutâneas desprovidas de nociceptores (Wasner *et al.*, 2005) (Jorge *et al.*, 2010). O emplastro atua também como proteção contra o atrito mecânico e a alodinia (Dakin *et al.*, 2007). A lidocaína tópica lentifica a sensibilização dos nociceptores periféricos e a hiperexcitabilidade central (Jorge *et al.*, 2010).

A média das concentrações plasmáticas máximas de lidocaína durante o tratamento tem sido relatada como cerca de 60-120 ng/ml, aproximadamente 10 a 20 vezes menores do que a

concentração alcançada no tratamento experimental das arritmias cardíacas. Vários estudos farmacocinéticos demonstraram que a absorção sistémica do *patch* de lidocaína em adultos saudáveis é mínima quando aplicadas em dose diária de 12 a 24 horas (quatro ou mais unidades). A taxa de absorção demonstrou ser inferior nos doentes com NPH, nos quais mostrou ser benéfico o seu uso. Não foram verificadas interações farmacológicas e o seu uso não causou perda de sensibilidade no local da aplicação (Jorge *et al.*, 2011). Assim, o Infarmed recomenda a aplicação deste analgésico tópico por um período restrito de 12 horas de utilização por dia.

2.4.3 – Indicações

O *patch* de lidocaína a 5% é considerado adequado ao tratamento focal da DNe, com ou sem alodinia, mesmo nos idosos (Rowbotham *et al.*, 1996) (Davies *et al.*, 2004) (Wasner *et al.*, 2005) (Khaliq *et al.*, 2007) (Jorge *et al.*, 2010). Não existem estudos que corroborem a sua aplicação em doentes com idade inferior a 18 anos.

A lidocaína tópica a 5% é bem tolerada (Wolff *et al.*, 2010). Em ensaios clínicos, apenas 17% (169 em 999) dos doentes que utilizaram emplastos de lidocaína experienciaram efeitos adversos (Galer *et al.*, 1999) (Galer *et al.*, 2003) (Argoff *et al.*, 2004) (Gammaitoni *et al.*, 2005) (Dakin *et al.*, 2007). Num outro ensaio clínico, 43% (40 em 93) dos efeitos adversos da lidocaína foram *rash* localizado, não existindo casos de efeitos sistémicos graves (Katz *et al.*, 2002). Em oposição, mais de metade dos doentes com NPH que participaram em ensaios clínicos com gabapentina reportaram efeitos secundários sistémicos (sonolência, tontura e edema periférico) (Rowbotham *et al.*, 1998) (Dakin *et al.*, 2007).

2.4.4 – Efeitos secundários e Contraindicações

O Infarmed ressalva a impossibilidade de aplicação em áreas de pele não cicatrizada ou irritada e os efeitos secundários que pode acarretar. De facto, é aqui que focamos o nosso interesse. O sistema contém propilenoglicol (E1520), que poderá causar irritação da pele. Contém também parahidroxibenzoato de metilo (E218) e parahidroxibenzoato de propilo (E216), que poderão ser responsáveis por reações alérgicas (inclusivamente, de aparecimento

tardio). A intensidade dos efeitos secundários pode variar de moderada a intensa. Sinais clínicos, tais como alterações da pele no local ou em redor da área de aplicação do sistema transdérmico (rubor, erupção cutânea, prurido, queimadura, dermatite, vesiculação), podem ser muito frequentes, na ordem de mais de uma pessoa em dez aplicações. De forma menos frequente, mas não menos significativa (na ordem de uma pessoa em 100 ou em 1000), podem surgir lesões e/ou feridas na pele. Os efeitos secundários mais raros (uma pessoa em 10.000) são as feridas expostas, alergia e reação alérgica grave. Os efeitos sistémicos não são significativos (Infarmed, 2010). Fleming publicou, em 2009, um estudo realizado, num centro oncológico, que evidenciou que os efeitos secundários do emplastro de lidocaína a 5% são moderados e clinicamente irrelevantes, dos quais é exemplo a irritação cutânea (Fleming *et al.*, 2009).

Neste sentido, é pertinente efetuar estudos de segurança e aplicabilidade da terapêutica tópica com o *patch* de lidocaína a 5% recentemente aprovado em Portugal na DNe da NPH, neste tipo de doentes oncológicos. Os efeitos secundários descritos para este fármaco são significativamente frequentes, pelo que será de todo o interesse proceder ao seu estudo.

De seguida, destacam-se as principais conclusões que a evidência científica já divulgou acerca do *patch* de lidocaína a 5%.

2.4.5 – Estudos de Eficácia e Tolerabilidade

Os doentes com alodinia foram os mais estudados em ensaios clínicos com lidocaína tópica, mas os efeitos analgésicos deste fármaco também foram demonstrados em doentes com dor neuropática sem alodinia (Jorge *et al.*, 2010). O *patch* de lidocaína a 5% ainda é referido neste artigo como analgésico de segunda linha na NPH, mas muitos ensaios clínicos corroboram os seus efeitos positivos na qualidade de vida e alívio da dor.

Três estudos caso-controlo mostraram eficácia da aplicação repetida do *patch* de lidocaína a 5% nos doentes com NPH e alodinia, mas a sua duração foi curta (Galer *et al.*, 1999) (Galer *et al.*, 2002) (Wasner *et al.*, 2005) (Attal *et al.*, 2006). Dois estudos analisaram os ensaios clínicos envolvendo o uso do *patch* de lidocaína a 5% em grupos de doentes com DNe de várias etiologias ou em doentes com NPH (Wasner *et al.*, 2005). Os estudos supracitados

concluíram que o uso deste sistema farmacológico é seguro, comporta baixa absorção sistêmica e apenas produz efeitos adversos locais (Galer *et al.*, 1999) (Galer *et al.*, 2002).

O estudo de Campbell (Campbell *et al.*, 2002) avaliou os níveis de absorção sistêmica de lidocaína tópica (em gel e em emplastro) em três grupos de utentes: voluntários normais (n=15), doentes com HZ agudo (n=22) e doentes com NPH (n=12). Os resultados conseguidos estimaram uma média de 3% de bioviabilidade para o emplastro de lidocaína, quer após aplicação única, quer após doses repetidas. A exposição sistêmica a lidocaína e ao seu metabolito primário (MGEX), após aplicação do gel ou do emplastro, foi mínima nos três grupos estudados. Os níveis de lidocaína plasmática após aplicação de três emplastos de lidocaína em três dias consecutivos, durante 12 horas, nos indivíduos sem doença, foram de 63,6 mg (0,9 mg/Kg de peso, o que corresponde a uma dose semelhante à utilizada como antiarrítmico). O fluxo médio para o sistema transdérmico é de 12,6 mcg/cm²/hora, pelo que as concentrações máximas são inferiores às utilizadas via sistêmica para correção de arritmia (2-5 mcg/mL) e muito inferiores às concentrações tóxicas (> 6 mcg/mL). Neste estudo também foi demonstrado que o uso continuado de emplastro (por três dias) não conduz a acumulação da lidocaína plasmática (se função hepática normal mantém-se uma semivida de duas horas para a lidocaína e seu metabolito ativo). Apesar de não ter sido possível a análise comparativa entre os grupos estudados, parece razoável afirmar que o estudo demonstrou que a absorção sistêmica de lidocaína tópica não atinge concentrações plasmáticas incompatíveis com o seu uso (Campbell *et al.*, 2002).

Segundo a meta-análise de Wolff *et al.* (2010), que incluiu 20 estudos originais, o *patch* de lidocaína a 5% e a gabapentina demonstraram efeitos semelhantes no alívio da dor, sendo o primeiro mais eficaz do que a capsaicina e a pregabalina. Este agente tópico foi associado a menor quantidade de efeitos adversos do que os fármacos sistêmicos. Contudo, a quantidade escassa de estudos, bem como a limitação da dimensão e qualidade dos estudos incluídos na meta-análise constituem uma limitação importante desta revisão sistemática (Wolff *et al.*, 2010). O *patch* parece ser relativamente seguro, podendo ser usado em idosos, nos quais as reações adversas podem ser particularmente problemáticas (Leipzig *et al.*, 1999) (Wolff *et al.*, 2010) e em doentes com alodinia ou dor neuropática em pequenas áreas. A adesão a estes sistemas transdérmicos também revelou ser vantajosa, pela sua facilidade de aplicação única diária (Davies *et al.*, 2004) (Wolff *et al.*, 2010). Dos estudos incluídos na meta-análise de

Wolff e sua equipa, destacam-se dois estudos que comparam o emplastro de lidocaína a 5% com o placebo (Binder *et al.*, 2009) (Wolff *et al.*, 2010):

1 – O estudo randomizado, controlado, multicêntrico de Binder *et al.* (2009), incluiu 105 doentes (DNe persistente há pelo menos três meses após *rash* e uma intensidade média de dor de pelo menos 4 pontos num total de 11 pontos da escala *Numerical Rating Scale* - NRS). O seguimento foi feito em duas semanas, com avaliação da dor, alívio da dor e efeitos adversos.

2 – O estudo randomizado, controlado, de Rowbotham (Galer *et al.*, 2002) (Wolff *et al.*, 2010) incluiu apenas doentes com NPH do dorso há pelo menos um mês com alodinia, num total de 150 doentes analisados. O seguimento foi feito em quatro semanas, com avaliação da dor e alívio da dor.

Detaca-se ainda um outro estudo que compara a lidocaína tópica com a pregabalina (Baron *et al.*, 2009a) (Baron *et al.*, 2009b) (Rehm *et al.*, 2010) (Wolff *et al.*, 2010). Trata-se de um estudo randomizado, controlado, multicêntrico, não cego, de Baron, que incluiu doentes com NPH e com PND, num total de 50 indivíduos doentes e 48 controlos. O seguimento foi efetuado durante quatro semanas, com avaliação de qualidade de vida, dor, alívio da sintomatologia, sintomas associados, reações adversas e satisfação dos doentes com o tratamento. Da análise efetuada não foi possível estabelecer diferença estatisticamente significativa entre o *patch* de lidocaína a 5% e a pregabalina.

Da meta-análise efetuada concluíram sobre dois *outcomes* principais:

(1) Mudança da dor basal – na avaliação conjunta da capsaicina, gabapentina, pregabalina e emplastro de lidocaína a 5%, apenas a gabapentina e a lidocaína revelaram eficácia superior ao placebo, sendo esta última mais eficaz do que a capsaicina, pregabalina e gabapentina.

(2) Alívio da dor – na avaliação conjunta da gabapentina e *patch* de lidocaína a 5%, ambas mostraram eficácia superior ao placebo, e eficácia comparável entre si.

Como pontos fracos desta revisão sistemática, refiram-se: (1) inexistência de estudos comparativos diretos das várias opções terapêuticas; (2) avaliação de *outcomes* diferentes, com diferentes escalas; (3) pequena quantidade de estudos que reuniram os critérios de inclusão na revisão; (4) estudos originais com fraca qualidade, amostra de pequenas dimensões e *follow-up* curto (Wolff *et al.*, 2010).

A única revisão sistemática para avaliação do tratamento tópico com lidocaína anterior à de Wolff foi publicada em 2007, por Khaliq (Khaliq *et al.*, 2007). Os estudos incluídos nesta revisão sistemática foram apenas três e concluíram que existia escassa evidência para

recomendar a lidocaína tópica como tratamento de primeira linha na NPH com alodinia, preconizando a necessidade de mais estudos.

Muitas outras revisões sistemáticas do tratamento da DNe e da NPH foram publicadas, mas nem todas incluíram o emplastro de lidocaína a 5% (Dubinsky *et al.*, 2004) (Plaghki *et al.*, 2004) (Hempenstall *et al.*, 2005) (Wolff *et al.*, 2010). Uma delas concluiu que a lidocaína tópica juntamente com a gabapentina, pregabalina e antidepressivos tricíclicos apresentavam eficácia na redução da dor com nível de evidência A (Dubinsky *et al.*, 2004) (Plaghki *et al.*, 2004). A outra revisão considerou existir evidência que suporta o uso de lidocaína tópica e capsaicina, antidepressivos tricíclicos e alguns opioides e gabapentina no tratamento da NPH (Hempenstall *et al.*, 2005). Esta última verificou também que a lidocaína tópica era bem tolerada e não produzia efeitos adversos sistêmicos, sendo a taxa de reações cutâneas locais *minor* e não superior ao placebo.

Duas revisões sistemáticas de Dworkin consideram a lidocaína tópica como opção terapêutica de primeira linha da DNe (Dworkin *et al.*, 2003) (Dworkin *et al.*, 2007). O emplastro de lidocaína a 5% revelou ser mais eficaz no alívio algico dos doentes com NPH e alodinia do que o emplastro placebo.

A evidência dos estudos incluídos sugerem que a lidocaína a 5% tem efeitos antiálgicos semelhantes ou superiores aos outros fármacos, sendo equivalente à pregabalina para várias medidas de dor, incluindo a impressão global de mudança percebida pelo clínico. Estes agentes tópicos são associados a menor número de efeitos adversos e com menor significância clínica (do que os agentes sistêmicos). Assim, poderá ser considerada como um agente de primeira linha no tratamento da NPH. No entanto, são necessários mais estudos de maiores dimensões, com melhor qualidade e de comparação direta entre fármacos (Dworkin *et al.*, 2003) (Dworkin *et al.*, 2007) (Wolff *et al.*, 2010).

Alguns ensaios clínicos não randomizados demonstraram que o uso de *patch* de lidocaína a 5% na lombalgia crônica apresentava efeitos colaterais ligeiros e clinicamente irrelevantes (Flemming *et al.*, 2009).

Baron *et al.* (2009) avaliou a eficácia e segurança do *patch* de lidocaína a 5% comparativamente a pregabalina em doentes com NPH e PND. Neste ensaio clínico randomizado, controlado e multicêntrico (n=300) concluiu que após quatro semanas de tratamento os níveis de analgesia obtidos foram maiores com o *patch* de lidocaína (63%

versus 37,5%), com menor frequência de efeitos adversos nos doentes sujeitos à terapêutica tópica (3,9% *versus* 39,2%) e com redução da alodinia (Baron *et al.*, 2009b).

Foi descrito por Garnock-Jones *et al.* (2009), um ensaio clínico com 265 doentes com idade igual ou superior a 50 anos, com diagnóstico de NPH com pelo menos três meses após cicatrização das lesões com avaliação da dor de pelo menos 4 (numa escala de 11 pontos). Inicialmente foram submetidos a mais de três ensaios terapêuticos não cegos com emplastro de lidocaína a 5% durante oito semanas. Aproximadamente 50% dos doentes responderam ao tratamento e 71 destes doentes foram randomizados para receber tratamento com placebo ou *patch* de lidocaína a 5% por dois a 14 dias. O *endpoint* primário definido foi a ausência de resposta eficaz ao fim de dois dias consecutivos, com recidiva. O grupo de doentes incluídos neste *endpoint* foi inferior no grupo dos submetidos a *patch* de lidocaína (25% vs 46%), embora sem significado estatístico (Garnock-Jones *et al.*, 2009). Num segundo estudo de desenho semelhante envolvendo 64 pacientes tratados por 14 dias, o tempo médio para a interrupção do tratamento foi superior a 14 dias com a lidocaína e 3,8 dias com placebo.

Galler e sua equipa (1999) publicaram um estudo duplamente cego envolvendo 32 doentes com NPH que usaram *patch* de lidocaína, durante pelo menos um mês, num ensaio clínico não cego e que referiram uma taxa de redução da dor de pelo menos “moderada” e que experimentaram nova dor antes de cada aplicação do emplastro. Foram sujeitos posteriormente a uma série de sessões de tratamento de 14 dias com placebo ou lidocaína 5% por um período de 12 horas, de forma aleatorizada e cega. O *outcome* primário foi o tempo mediano para abandonar o ensaio por ineficácia do tratamento (definido como redução de pelo menos 2 pontos numa escala de alívio da dor com um total de 6). Este tempo foi significativamente maior para os doentes sujeitos a *patch* de lidocaína quando comparado com o placebo (> 14 *versus* 3,8 dias), sem nenhum doente a abandonar o estudo durante a fase ativa de tratamento (Galer *et al.*, 1999).

Um outro estudo duplamente cego envolveu 150 doentes com mais de 20 anos, com diagnóstico de NPH e cicatrização das lesões cutâneas há pelo menos um mês. Foram randomizados num rácio de 2:1 para aplicação de pelo menos três sessões clínicas com *patch* de lidocaína 5% ou placebo na área afetada durante 12 horas em cada 24 horas e um período de tratamento no domicílio por 21 dias. Toda a restante medicação para NPH foi mantida em ambos os grupos e todos os doentes fizeram registo de toma de analgésicos. Os *outcomes* primários incluíram intensidade da dor (Escala Analógica Visual – EVA, num total de 100

mm) e alívio da dor (escala de 6 pontos). Não se verificou diferença significativa entre a lidocaína e o placebo na média de redução da intensidade da dor pela EVA, calculado pela média de seis verificações após 1 e 10 horas de aplicação dos emplastros na primeira sessão (9,6 vs 8,3 mm) e na sessão 2 (12 vs 7,8 mm) ou pela comparação das pontuações de EVA medidos na 4ª hora da terceira sessão clínica (38 vs 41 mm) e média dos três scores após os 21 dias de tratamento diário em casa (45 vs 47 mm). Utilizando análises semelhantes também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos lidocaína e placebo na média de alívio de dor após 1 a 10 horas da primeira sessão clínica (2,0 vs 1,8). Contudo, este alívio foi significativamente maior com a lidocaína quando avaliado às 4 horas da terceira sessão (2,6 vs 2,1, $p=0,023$). Para a alodinia, um *outcome* secundário, a média de redução em relação ao nível basal, averiguado por uma escala de quatro pontos durante a remoção dos *patches* às seis horas, foi significativamente maior para a lidocaína na sessão 1 (0,6 vs 0,1) e sessão 2 (0,4 vs 0,1). Não se contabilizaram os resultados da alodinia na sessão 3 (NHS, 2006).

Reporta-se um estudo cruzado duplamente cego envolvendo 150 doentes com mais de 20 anos com diagnóstico de NPH e cicatrização das lesões cutâneas há pelo menos um mês e com EVA de dor de pelo menos 2,5 cm em 10 cm (Rowbotham *et al.*, 1996) (NHS, 2006). Foram sujeitos, por ordem aleatória, a quatro tratamentos separados entre si por pelo menos três dias: duas aplicações de 12 horas de *patch* de lidocaína a 5% na área de maior dor; uma aplicação de 12 horas de *patch* de placebo na mesma área; e um período de 12 horas meramente expectante. O protocolo não definiu claramente o *outcome* primário. Os dados de eficácia analisados reportam aos 35 doentes que terminaram o estudo. O *patch* de lidocaína foi associado a uma redução média de nível de dor maior na EVA de 10 cm às 0,5, 1, 2, 4, 6, 9 e 12 horas comparativamente aos períodos de observação (9,0 para 12,3 *versus* 4,7 para 3,6 mm) e às 4, 6, 9 e 12 horas comparativamente ao *patch* placebo (9,1 para 12,3 *versus* -3,1 para 5,8 mm). Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a redução média do nível de dor no período da meia hora às 12 horas entre o *patch* lidocaína isolado (10,2 mm) e a observação (0,24 mm) e o *patch* placebo (4,23mm). O placebo resultou numa redução maior do nível de dor comparativamente à terapêutica observacional às duas horas (9,4 *versus* 1,2 mm) e às seis horas (4,7 *versus* -1,8mm). O alívio da dor registado pela escala de seis categorias foi significativamente maior na utilização do *patch* de lidocaína do que a observação em todos os pontos de avaliação (1,9 para 2,4 *versus* 1,1 para 1,4) e na média de

todo o período (2,2 vs 1,3). Isto foi significativamente maior do que para o placebo em média de avaliação de dor ao longo do estudo (2,2 *versus* 1,8) mas não para as avaliações pontuais (1,9 para 2,4 *versus* 1,6 para 2,2). O emplastro de placebo foi associado a um maior alívio de dor relativamente à atitude expectante em todo o estudo (1,8 *versus* 1,3) e às 0,5, 2, 4 e 6 horas (1,8 para 2,2 *versus* 1,1 para 1,4).

Nos três ensaios clínicos supracitados a amostra foi pequena e a interpretação dos resultados deve ser cuidadosa porque essa amostra de doentes já tinha previamente sido sujeita a tratamento com emplastro de lidocaína e o *design* “cruzado e cego” dos estudos é bastante duvidoso. A literatura recomenda maioritariamente o uso do emplastro de lidocaína a 5% em doentes que não respondem a tratamento com analgésicos convencionais ou antidepressivos tricíclicos. No entanto, nas amostras utilizadas nestes estudos os doentes com NPH já tinham sido sujeitos a múltiplos tratamentos prévios não eficazes e com duração média de dor de quatro anos. Os efeitos estudados nestes estudos apenas reportam a um máximo de 21 dias após início do tratamento com o *patch*, pelo que não pode ser deduzido o seu efeito superior ao do placebo para limites temporais mais alargados. A redução da intensidade da dor após aplicação do emplastro de placebo pode ser explicada pelo seu efeito protetor físico de barreira na área sensível. O efeito comparativo entre os dois emplastros foi, em média, inferior a 5 mm (em 100 mm da EVA) no maior grupo de doentes estudados. Nenhum dos estudos compara diretamente o efeito analgésico do *patch* de lidocaína a 5% com os outros fármacos recomendados na NPH, nomeadamente a gabapentina, pelo que a sua eficácia e segurança relativas permanecem desconhecidas.

Existem alguns estudos de comparação indireta entre o uso de *patch* de lidocaína a 5% e o uso oral de gabapentina, com resultados favoráveis à terapêutica tópica, mas são pouco robustos, com diferentes *outcomes* estudados e com doses de gabapentina diferentes das recomendadas para a NPH. O estudo mais relevante estabeleceu uma comparação indireta entre ensaios clínicos randomizados e duplamente cegos com duração de sete semanas, com uso de 1800 mg de gabapentina diária com efeitos na redução da dor diária semelhante à obtida pela aplicação do *patch* de lidocaína.

Um estudo aleatório duplamente cego cruzado, realizado em 1996 pela equipa de Rowbotham, envolveu 35 doentes com NPH e alodinia e demonstrou que, em comparação com o *patch* placebo, o *patch* de lidocaína (até três unidades, aplicado por 12 horas) reduziu significativamente os *scores* de dor basal nas 4-12 horas após aplicação ($p < 0,001$ a $p = 0,038$).

O emplastro de lidocaína também revelou alívio superior à “terapêutica observacional” em todas as avaliações, entre os 30 minutos e as 12 horas de aplicação ($p=0,0001$ a $p=0,021$). A pontuação média de alívio da dor durante este período também foi significativamente maior com o *patch* de lidocaína. Todos os participantes tinham alodinia, mas a sua gravidade não se correlacionou com a eficácia. Neste estudo foi também mensurada a concentração sanguínea de lidocaína em 0,1 mcg/mL, pelo que o autor concluiu pela segurança deste tratamento mesmo quando aplicado em áreas de superfície relativamente grandes (Rowbotham *et al.*, 1996).

Em uma análise *post-hoc* de um segundo ensaio, no qual 150 pacientes com NPH foram randomizados para tratamento com o *patch* de lidocaína ou *patch* placebo (Galer *et al.*, 2002) um subgrupo de 92 indivíduos com NPH foram sujeitos a três semanas de tratamento para determinar mais aprofundadamente os efeitos do tratamento em quatro medidas compostas a partir da *Neuropathic Pain Scale* (NPS). Verificou-se uma maior redução do *score* da dor nos indivíduos sujeitos ao *patch* de lidocaína a 5%, comparativamente ao uso de *patch* placebo, para todas as escalas e *outcomes* avaliados, mesmo quando a dor foi descrita como moderada a severa. Os autores concluíram que o *patch* de lidocaína melhorou todas as qualidades da DNe (Galer *et al.*, 2002).

Khaliq *et al.* (2007) publicou uma meta-análise usando estudos controlados randomizados (RCT) e *quasi*-RCT que comparavam a aplicação tópica de lidocaína em doentes de todas as idades com NPH (definida como dor persistente no local do exantema, pelo menos após um mês do início do *rash* agudo). Foram incluídos três ensaios clínicos, com um total de 182 indivíduos que usaram lidocaína tópica e 132 controlos. Dois dos ensaios avaliaram o alívio da dor e o outro avaliou alguns *outcomes* secundários. O ensaio clínico de maiores dimensões comparou a aplicação do emplastro de lidocaína a 5% com um emplastro placebo em 150 dos 314 doentes estudados. A meta-análise combinada de dois dos três estudos identificou uma diferença estatisticamente significativa entre a lidocaína tópica e o grupo controlo para os *outcomes* primários (melhoria média do alívio da dor), com vantagem para a primeira relativamente ao placebo ($p=0,003$). No outro ensaio clínico, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,030$) para os *outcomes* secundários (redução da pontuação de dor da EVA), mas a amostra era muito pequena. Não se verificou acréscimo de reações adversas cutâneas em ambos os estudos. Então, esta meta-análise demonstrou evidência insuficiente para recomendar a lidocaína tópica como analgésico de primeira linha no

tratamento da NPH com alodinia, pelo que os autores concluíram ser necessário mais investigação, com comparação com outras classes farmacológicas (Khaliq *et al.*, 2007).

A equipa de Dakin *et al.* (2007) publicou um estudo de avaliação económica comparando os emplastos de lidocaína e a gabapentina nos doentes com NPH em Cuidados de Saúde Primários Ingleses. Usando o modelo *Markov*, foi efetuado um estudo custo-efetividade em doentes com alívio insuficiente de dor com analgésicos *standard* e com intolerância ou contraindicação para o uso de antidepressivos tricíclicos no tratamento da NPH. Este modelo foi aplicado durante seis meses. Os autores concluíram que o *patch* de lidocaína a 5% se revelou mais custo-efetivo comparativamente à gabapentina nos doentes com NPH intolerantes aos antidepressivos tricíclicos e analgesia ineficaz. O principal ponto fraco do estudo foi a comparação indireta da lidocaína com a gabapentina, baseada em apenas três estudos com metodologias muito diferentes e o uso de escalas de avaliação diferentes para quantificar os *outcomes*. Os autores concluíram que se podia afirmar com mais de 99% de certeza que o emplastro de lidocaína custa menos de 20.000 libras por QALY ganho relativamente à gabapentina, e que, com mais de 90% de certeza, esta terapêutica tópica é superior à gabapentina em custo-efetividade (Dakin *et al.*, 2007).

Uma revisão sistemática de 2009 sobre o uso do *patch* de lidocaína a 5% na NPH concluiu que este pode ser uma opção de primeira linha viável para o tratamento da NPH em adultos (Garnock-Jones *et al.*, 2009). Dados limitados, a partir de um estudo em doentes com NPH ou PND dolorosa, mostram que o tratamento a curto prazo foi associado a taxas de resposta da dor maior do que as taxas de intensidade da resposta da pregabalina no subgrupo NPH. A eficácia do *patch* de lidocaína a 5% foi mantida a longo prazo. Além disso, este foi bem tolerado, sendo as reações no local da aplicação os efeitos mais relatados. Devido à baixa absorção sistémica, este fármaco pode ter particular vantagem no tratamento de doentes com baixa tolerância aos efeitos secundários das restantes opções terapêuticas, ou que estejam sob efeito de outros fármacos cujas interações sejam limitativas (Garnock-Jones *et al.*, 2009). No entanto, mais estudos de segurança deste fármaco e de avaliação dos efeitos secundários do *patch* de lidocaína serão fundamentais.

O estudo publicado por Flemming *et al.* (2009) estabeleceu a avaliação/auditoria da aplicação de *patches* de lidocaína a 5% na DNe de um centro de Cuidados Paliativos australiano. A sua aplicação foi efetuada em 97 doentes, a grande maioria com DNe por neuropatia pós-cirurgia (27%), por NPH (25%) ou por neuropatia associada à neoplasia (19%). Verificaram uma

elevada eficácia desta terapêutica tópica em 38% dos doentes com NPH, em 35% dos doentes com neuropatia pós-cirurgia, em 27% dos doentes com neuropatia pós tratamento antineoplásico e em 12% dos doentes com DNe associada a neoplasia. A alodinia coexistiu em 60% dos doentes estudados, sendo o seu alívio altamente eficaz apenas em 38% dos casos, parcial em 24% dos doentes, ineficaz em 26% dos casos e com agravamento de dor em 3,4% dos doentes. A suspensão do tratamento foi necessária em sete doentes devido a irritação cutânea. Então, este artigo sustenta então a aplicação do *patch* de lidocaína a 5% nos doentes oncológicos com síndromes neuropáticas dolorosos com ou sem alodinia (Fleming *et al.*, 2009).

A revisão de 2009 das *guidelines* da Federação Europeia de Sociedades de Neurologia (EFNS) para doentes com NPH concluiu que os antidepressivos tricíclicos, gabapentina, pregabalina, opióides, capsaicina e emplastos de lidocaína apresentam nível de evidência A. A gabapentina, a pregabalina, os antidepressivos tricíclicos e os emplastos de lidocaína são recomendados na primeira linha de tratamento. A lidocaína tópica, dado o seu excelente perfil de tolerabilidade, pode ser considerada como primeira linha terapêutica nos doentes mais idosos, sobretudo se intolerantes aos efeitos sistémicos dos fármacos orais (Attal *et al.*, 2010). As recomendações mais recentes da NICE para o tratamento farmacológico da DNe advogam que deve ser considerado o uso de lidocaína tópica no tratamento da dor localizada nos doentes que não tolerem a medicação oral devido a comorbilidades e/ou incapacidades (NICE, 2010).

Segundo a revisão efetuada por Jorge *et al.* (2011), não existem na literatura estudos a longo-prazo para o uso tópico dos anestésicos mas, de acordo com o perfil de segurança, a baixa incidência de efeitos sistémicos e a baixa probabilidade de interações farmacológicas, o *patch* de lidocaína é considerado um tratamento válido no tratamento da DNe focal, com ou sem alodinia, inclusivamente no idoso (Jorge *et al.*, 2010).

Contudo, comparações diretas entre fármacos são relativamente escassas, e a verificação rigorosa da eficácia relativa e segurança das várias opções de tratamento ainda é escassa (Wolff *et al.*, 2010). Por tudo isto, justifica-se a necessidade de mais estudos científicos.

Não obstante a quantidade significativa de ensaios clínicos já existentes, não foi encontrado nenhum estudo de citotoxicidade celular da pele com o uso deste sistema transdérmico de lidocaína a 5%.

2.5 – PELE HUMANA

Ao longo das últimas décadas, inúmeros estudos demonstraram que a pele é um órgão complexo (Lazar *et al.*, 2009). É composta por vários tipos celulares independentes e estruturas que são funcionalmente cooperativas (Lazar *et al.*, 2009).

A pele é dividida em três camadas principais: (1) Epiderme, (2) Derme e (3) Tecido Celular Subcutâneo (Habif, 2009).

(1) Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele, constituída por um epitélio escamoso estratificado. A sua espessura varia entre 0,05 mm (nas pálpebras) a 1,5 mm (nas palmas e plantas). A sua função principal é a de proteção do organismo do ambiente externo e a prevenção da perda de água. O processo de diferenciação da epiderme resulta na formação de uma barreira funcional do mundo externo (Morelli, 2011).

Os queratinócitos são os principais componentes celulares da epiderme. Estas células são compostas, em grande parte, por filamentos de queratina (Habif, 2009). Produzem a proteína protetora queratina e são o maior local de biossíntese de citoquinas (reguladoras quer das células da epiderme quer das células da derme) (Lazar *et al.*, 2009).

Na epiderme podem distinguir-se quatro camadas histologicamente distintas (Morelli, 2011) (Habif, 2009):

1 – Camada Basal: composta por células colunares, dispostas numa única fileira, adjacentes à junção dermo-epidérmica. Os queratinócitos basais estão conectados à junção dermo-epidérmica por hemidesmossomas (estruturas de adesão altamente organizadas que se ligam à rede de queratina) e ligam-se entre si e com as células da camada espinhosa por desmossomas e junções aderentes (adesões mais plásticas que também estão envolvidas no movimento mediado pela actina; destas adesões aos queratinócitos também depende a estrutura dendrítica dos melanócitos e das células de *Langerhans*).

A função desta camada celular é o fornecimento contínuo de queratinócitos para a diferenciação normal da epiderme e o reservatório de células para reparação das lesões epidérmicas. Esta camada é resistente à apoptose, constituindo assim a camada germinativa, responsável pela proliferação celular.

2 – Células Espinhasas: dispostas em três ou quatro fileiras celulares, cuja função é iniciar a formação da barreira epidérmica e a síntese da vitamina D. Nesta camada forma-se uma rede de filamentos de queratina que conectam as células por pontes ou espinhas. Os queratinócitos sintetizam uma proteína insolúvel, que se mantém na célula e se irá tornar o componente *major* das camadas mais superficiais.

3 – Células Granulosas: dispostas em duas ou três fileiras celulares, cuja função é continuar o processo de formação da barreira epidérmica e a preparação para a formação da quarta camada ou estrato córneo. Nesta camada as células tornam-se mais achatadas, o seu citoplasma mais granular, cessa a síntese de proteínas e ocorre o fenómeno apoptótico. As células mortas formam os corneócitos, que contêm filamentos de queratina em ligações cruzadas e um envelope cornificado espesso.

4 – Estrato córneo: composto por múltiplas camadas de células mortas altamente condensadas, constituídas sobretudo por queratina. Os espaços intercelulares são compostos por lípidos hidrofóbicos, principalmente ceramidas. Quando é formado novo estrato córneo, este substitui o anteriormente formado, num processo de regeneração altamente regulado. A sua função consiste em resistir à penetração de organismos externos e toxinas e prevenir perdas de água (Norris, 2011).

Ao longo destas camadas da epiderme ocorre o processo de maturação progressivo e ascendente (das células basais em células epiteliais escamosas queratinizadas do estrato córneo), com a duração total de diferenciação celular de 28 dias.

A junção dermo-epidérmica é uma zona de membrana basal, de estrutura complexa, resultante de células epidérmicas e mesenquimatosas. Estende-se da membrana plasmática das células da camada basal até à região superior da derme. Na sua ultraestrutura microscópica é composta por uma estrutura trilaminar: (1) a lâmina lucida, imediatamente adjacente à membrana plasmática das células da basal; (2) a lâmina densa, em posição central e (3) a lâmina fibroreticular, subbasal, situada do lado dérmico da lâmina densa (Morelli, 2011).

Os três principais tipos de células da epiderme são: os melanócitos, as células de *Langerhans* e as células de *Merkel* (Habif, 2009) (Morelli, 2011).

Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural, que migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário e têm como função a formação de pigmento – melanina (Lazar *et al.*, 2009) (Morelli, 2011) (Norris, 2011).

As células de *Langerhans* são células dendríticas do sistema fagocitário mononuclear. Derivam da medula óssea e participam na reação imunológica da pele, tendo um papel ativo na apresentação e processamento dos antígenos (Morelli, 2011). Estas células intraepidérmicas interagem com o sistema imunitário sistêmico através da migração para os gânglios linfáticos regionais (Lazar *et al.*, 2009).

As células de Merkel podem ser consideradas como mecanorreceptores lentos, sensíveis ao toque e apresentam uma função neuroendócrina.

(2) Derme

A derme é uma camada cutânea com espessura variável entre os 0,3 mm (na pálpebra) e os 3,0 mm (no dorso). Forma uma estrutura de suporte fibrosa, resistente e flexível entre a epiderme e o tecido subcutâneo (Morelli, 2011).

É composta por três tipos de tecido conjuntivo: colagénio, tecido elástico e fibras reticulares, embebidos numa substância basal amorfa. A derme contém vasos sanguíneos, linfócitos, mastócitos, estruturas nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas, folículos pilosos e músculo liso.

A derme divide-se em duas camadas: (1) a camada papilar – mais superficial, mais fina, menos densa e mais celular, composta por fibras de colagénio finas e aleatoriamente dispostas (matriz de colagénio); e (2) a camada reticular – mais profunda e mais espessa, estendendo-se desde a camada papilar ao tecido celular subcutâneo, composta por fibras de colagénio espessas dispostas paralelamente à superfície da pele e fibras de elastina entrelaçadas, formando uma rede compacta.

A célula dérmica predominante é o fibroblasto fusiforme, responsável pela síntese de colagénio e fibras elásticas e mucopolissacarídeos. Também existem fibrócitos, histiócitos fagocitários, mastócitos, plasmócitos e leucócitos. Forma uma estrutura de suporte fibrosa, resistente e flexível entre a epiderme e o tecido subcutâneo (Morelli, 2011).

Os histiócitos são macrófagos móveis que acumulam hemossiderina, melanina e detritos criados pela inflamação.

As células mastocitárias localizam-se sobretudo em torno dos vasos sanguíneos e produzem e libertam histamina e heparina.

A substância gelatinosa amorfa que serve de meio de suporte da derme contém uma quantidade considerável da água corporal.

O sistema vascular e nervoso cutâneo localiza-se essencialmente na derme, separados num plexo superficial na derme papilar e num plexo profundo que nutre as estruturas anexas. Os estímulos de pressão e toque são reconhecidos pelos corpúsculos de *Meissner* e de *Vater-Pacini*. Os estímulos dolorosos, térmicos e de prurido são reconhecidos pelas terminações nervosas não mielinizadas presentes na derme papilar. Se a reação inflamatória cutânea gerar um estímulo de pequena intensidade é desencadeado prurido, enquanto um estímulo de maior intensidade gera dor. Isto justifica que o ato de coçar possa transformar o prurido numa sensação dolorosa (Habif, 2009).

O sistema nervoso autonómico é responsável pela inervação motora da pele. As fibras adrenérgicas inervam os vasos sanguíneos (vasoconstrição), o músculo eretor do pelo e as glândulas apócrinas. As fibras nervosas autonómicas que inervam as glândulas sudoríparas écrinas são colinérgicas. As glândulas sebáceas são reguladas pelo sistema endócrino e não pelas fibras autonómicas (Habif, 2009).

(3) Tecido Celular Subcutâneo

O tecido celular subcutâneo ou panículo é composto por células gordas e septos fibrosos que as dividem em lóbulos e permitem a adesão da pele às fáscias e periósteo subjacente. Nesta localização também existem vasos e nervos que servem de depositários de gorduras, fundamental à termorregulação e à defesa contra estímulos traumáticos (Morelli, 2011).

Os anexos cutâneos especializados são: folículos pilosos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas e as unhas (Lazar *et al.*, 2009) (Morelli, 2011). Localizam-se à derme mas penetram através da epiderme, incluindo o estrato córneo.

Relativamente ao sistema imunológico cutâneo (Lazar *et al.*, 2009): Na ausência de inflamação a pele é povoada por inúmeras células imunitárias, algumas permanentes e outras transitórias, responsáveis pela proteção de primeira linha contra agressões do meio ambiente. Perante uma lesão epitelial ou antigénica, desenvolve-se uma resposta imunológica inacta, por activação das células residentes que, por sua vez, vão recrutar as células efectoras não específicas, como os neutrófilos e os eosinófilos. A resposta imunológica adaptativa ocorre quando o antigénio é apresentado ao complexo maior de histocompatibilidade e é reconhecido pelas células linfocitárias T que, consequentemente, leva ao recrutamento adicional dos

linfócitos T específicos do antígeno (CLA). Note-se que as células T cutâneas dividem-se em duas populações: linfócitos “*helper*” (CD4+) e linfócitos citotóxicos (CD8+).

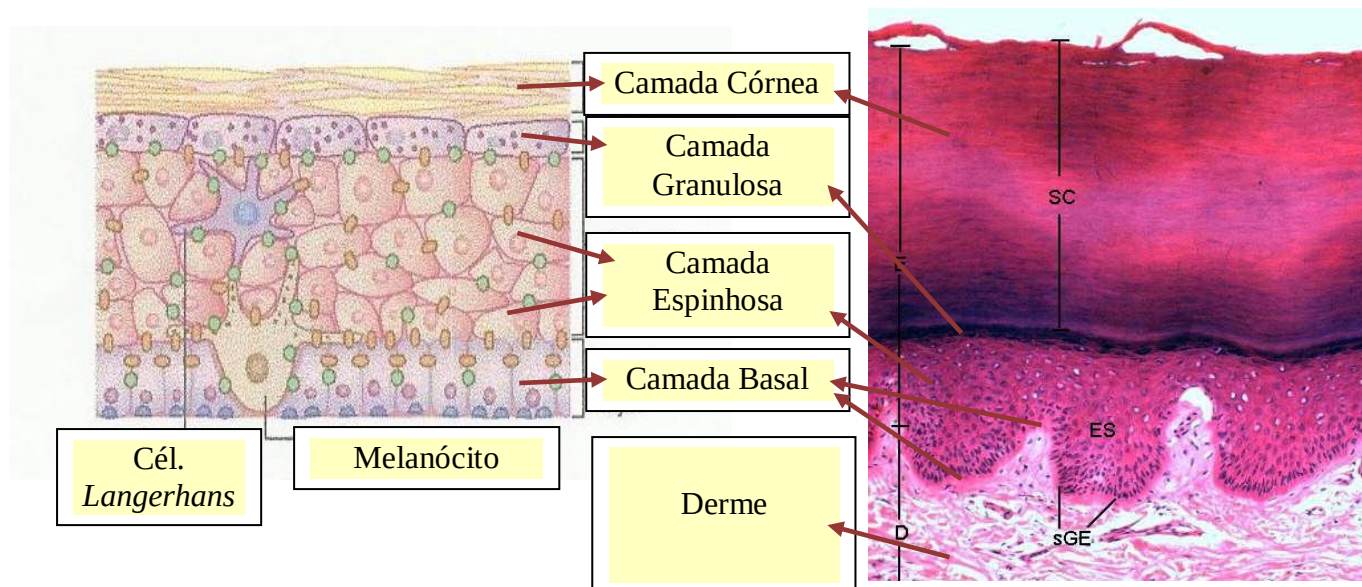


Figura II – Representação esquemática e histológica da pele humana. (Adaptado de Norris, 2011)

2.6 – ENGENHARIA TECIDULAR DA PELE HUMANA

A engenharia tecidual pode ser definida, segundo Campos, como a construção de tecidos biológicos artificiais e sua utilização médica para restaurar, substituir ou incrementar as atividades funcionais dos próprios tecidos orgânicos (Campos, 2004). Esta envolve a combinação de células, biomaterial de suporte de construção e fatores micro ambientais que induzam sinais de diferenciação celular e/ou promovam reparação tecidual e restauração funcional (Fodor, 2003) (Thevenot *et al.*, 2008).

O campo da Engenharia Tecidual (Campos, 2004) surgiu apenas nos últimos anos, de modo intimamente ligado ao desenvolvimento da histologia. Após os seus primórdios (em 1987) assistiu-se a uma extraordinária evolução. A construção de tecidos para investigação médica e para seu uso terapêutico assume-se como uma linha de investigação fundamental e prioritária a nível universitário, hospitalar e governamental (Brittberg *et al.*, 2001) (Campos, 2004) (Thevenot *et al.*, 2008) e como uma atividade industrial de importância crescente e com enorme impacto na economia e desenvolvimento de países mais avançados (Campos, 2004).

A engenharia tecidual tem, então, a finalidade de regenerar e restabelecer a função normal de um tecido ou órgão, através da utilização de células que são cultivadas em laboratório ou em matrizes artificiais, para posteriormente serem transplantadas num órgão recetor. Além do seu uso direto na terapêutica, a engenharia tecidual permite criar modelos de estudo de toxicidade de fármacos (Gay *et al.*, 1992). Para garantir esta finalidade é imprescindível a determinação da viabilidade das células cultivadas (Rodríguez-Morata *et al.*, 2008). Tinois e sua equipa descreveram, em 1991, um substituto dérmico de dupla camada composto por queratinócitos humanos diferenciados numa camada de colagénio tipo IV humano. Sugeriram que este poderia ser útil como modelo *in vitro* de estudos toxicológicos e farmacológicos (Ávalos, 2009). Em 1992, a equipa de Gay testou o uso de um modelo de pele obtida por engenharia tecidual no estudo de toxicidade farmacológica (Gay *et al.*, 1992). Para isso utilizaram o teste de azul de tiazol colorimétrico (MTT) para medir o funcionamento mitocondrial e a extensão da citotoxicidade induzida por algumas substâncias químicas irritativas. Testaram sete irritantes químicos e verificaram que as concentrações de inibição da conversão MTT a 50% correspondiam sensivelmente ao limiar da concentração causadora de irritação cutânea. Testaram ainda nove químicos não irritativos da pele humana e também não houve alterações no teste MTT. Foram também testados o tempo e a dose para libertação de mediadores inflamatórios e a permeabilidade a algumas substâncias. Estes estudos concluíram que os equivalentes cutâneos podem ser usados como modelos de estudos de irritação dérmica, mesmo quando a absorção percutânea não é semelhante (Gay *et al.*, 1992).

Para que consiga cumprir o seu objetivo, a engenharia tecidual requer uma fonte adequada de células que sejam funcionais e viáveis e biomateriais e sinais moleculares de diferentes naturezas (Alaminos *et al.*, 2007). De facto, a Engenharia Tecidual inclui-se no âmbito da Medicina Regenerativa, a qual também abrange outras tecnologias, incluindo o uso de moléculas solúveis, biomateriais, terapêutica genética, transplante de células estaminais e reprogramação de células e tecidos (Dieckmann *et al.*, 2010).

A pele tem sido amplamente investigada no âmbito da medicina regenerativa, existindo já vários modelos de pele humana artificial obtidos por engenharia tecidual (Dieckmann *et al.*, 2010), que serão abordados sucintamente no subcapítulo seguinte. Representam uma opção terapêutica e de investigação inovadora (Dieckmann *et al.*, 2010). Muitos materiais foram já aprovados pela FDA, como por exemplo: ácido poliglicólico, ácido poli-L-láctico e alguns polímeros como o PLGA. Estes permitiram criar materiais porosos onde se pudessem cultivar

células *in vitro*, desenvolver culturas e, em última instância, integrá-las num segmento de tecido funcional através de migração celular, proliferação e produção de matriz extracelular para substituir o biomaterial.

O desenvolvimento de técnicas de cultura de fibroblastos antecedeu a descoberta da cultura e o desenvolvimento de queratinócitos por Rheinwald e Green, em 1975 (Rheinwald *et al.*, 1975) (Wong *et al.*, 2007). Os fibroblastos da pele podem ser extraídos de biópsias cutâneas. O meio de cultura utilizado é geralmente suplementado com soro fetal de vitela. Os fibroblastos usados em engenharia tecidual podem ser alogénicos ou autólogos, não tendo estes últimos o risco de rejeição ou de infeção cruzada. No entanto, os fibroblastos alogénicos podem ser criopreservados, logo, mais rapidamente obtidos quando necessária a sua utilização (Wong *et al.*, 2007).

Em 1997, Eaglstein fez uma revisão do estado da arte dessas técnicas avançadas, nomeadamente para a construção da pele humana obtida por engenharia tecidual, designada *Apligraf®* (Organogenesis Inc., Canton, Massachusetts) (Eaglstein *et al.*, 1997). Este consiste num produto dermo-epidérmico alogénico de queratinócitos cultivados e uma camada dérmica de fibroblastos numa matriz de colagéneo tipo I (Bell *et al.*, 1981) (Eaglstein *et al.*, 1997) (Trent *et al.*, 1998).

A equipa de Huang, em 2005, estabeleceu um sistema original de cultura de fibroblastos embebidos numa matriz de colagénio em bicamada porosa e com um meio de cultura específico para as várias fases da cultura. Demonstrou mais uma vez a importância da matriz extracelular e dos fatores de crescimento epidérmicos na obtenção de pele mediante engenharia tecidual (Huang *et al.*, 2005).

Em 2006, Lee realçou a importância da membrana basal na criação de pele mediante engenharia tecidual e o papel dos queratinócitos epidérmicos e dos fibroblastos da derme na sua constituição. Demonstrou que os queratinócitos produzem a maior parte dos componentes da membrana basal (tais como, laminina, colagénio tipo IV e VII) e que os fibroblastos estimulam a expressão desses componentes da membrana basal e a formação da zona de membrana basal, por produção direta ou por influência nos efeitos dos queratinócitos (interação fibroblastos-queratinócitos) (Lee *et al.*, 2006).

Em 2007, Wong e colegas realçaram a importância dos fibroblastos, definidos como células mesenquimatosas que podem ser facilmente cultivadas em laboratório e que desempenham um papel importante nas interações epitélio-mesenquima, secretando vários fatores de

crescimento e citoquinas com efeito direto na proliferação, diferenciação e formação de matriz extracelular. Os queratinócitos produzidos em monocultura apenas originam uma camada fina de epiderme e, na ausência de suporte mesenquimatoso, sofrem apoptose em duas semanas. Os fibroblastos promovem o desenvolvimento de queratinócitos viáveis para as camadas basal, reticulada, granulosa e córnea, além de promover a proliferação desses queratinócitos (Wong *et al.*, 2007).

Assim, muitos avanços foram já conseguidos na área da engenharia tecidual da pele, embora ainda existam algumas limitações na produção de estrutura tecidual tão complexa.

2.6.1 – Pele Humana obtida através de Engenharia Tecidual

O trabalho piloto no desenvolvimento da engenharia tecidual da pele remonta à década de 60, com o trabalho de Rheinwald e Green no Instituto de Tecnologia de *Massachusetts* (Rheinwald *et al.*, 1975) (Eaglstien *et al.*, 1997). O seu método foi modificado e testado por inúmeros investigadores para produzir culturas de queratinócitos autólogos viáveis para enxerto (O'Connor *et al.*, 1981) (Eaglstien *et al.*, 1997). Dadas as desvantagens do tempo de produção do tecido e da estrutura frágil dos queratinócitos obtidos, os investigadores passaram a utilizar queratinócitos alogénicos obtidos do prepúcio de neonatos, conseguindo-se produzir monocamadas de células passíveis de criopreservação (Eaglstien *et al.*, 1997). Posteriormente, as experiências dirigiram-se para a obtenção de substitutos tecidulares da pele contendo a camada dérmica (Eaglstien *et al.*, 1997). A derme alogénica obtida era capaz de produzir matriz extracelular, mas mantinham-se os problemas de fragilidade queratinocítica, vascularização dérmica inconsistente e a ausência de fibroblastos viáveis. Entretanto foram também desenvolvidas matrizes acelulares que permitiram o fornecimento de suporte físico e produção funcional de tecido no local do enxerto de forma mais rápida. Algumas destas matrizes de colagénio foram incorporadas com fibroblastos autólogos ou queratinócitos cultivados (Hansbrough *et al.*, 1989) (Eaglestein *et al.*, 1997) O conceito de matriz de colagénio foi sendo desenvolvido, conseguindo-se equivalentes de pele humana cada vez mais consistentes, tais como o *Dermograft®* e o *Apligraf®*.

O substituto ideal da pele (para reparação de feridas) foi definido por Pruitt e Levine (Pruitt *et al.*, 1984) (Ehrenreich *et al.*, 2006) e por outros investigadores mais recentes com os seguintes

parâmetros: ausência de antigenicidade; compatibilidade tecidular; ausência de toxicidade local ou sistêmica; impermeabilidade a micro-organismos exógenos; transmissão de vapor de água similar à pele normal; adesão rápida e mantida à superfície da ferida; adaptação às irregularidades de superfície; elasticidade para permitir movimento dos tecidos subjacentes; resistência à tensão linear e de cisalhamento; rigidez que permita resistir a fragmentação; inibição de flora bacteriana de superfície; biodegradabilidade; translucência para observar o processo de cicatrização; tempo de reparação reduzido; não aumento de taxa de infecção; desconforto mínimo para o doente; minimização das necessidades de cuidados; aceitação do doente; baixo custo e longo período de vida com necessidade mínima de armazenamento.

Em 2004, Llames e sua equipa produziram um novo equivalente cutâneo mediante engenharia tecidular, que permitiu: (1) formação de grandes superfícies cutâneas por engenharia tecidular; (2) restauração de ambos os componentes da pele – derme e epiderme e (3) preservação das células estaminais epidérmicas funcionantes. O processo de construção deste equivalente cutâneo baseou-se na obtenção de queratinócitos e fibroblastos por biópsia cutânea única e na utilização de uma matriz baseada no plasma humano, que funciona como suporte às culturas das células anteriores (Llames *et al.*, 2004).

Em 2006, Lee e seus colegas desenvolveram um novo equivalente dérmico cutâneo através da cultura de fibroblastos dérmicos isolados num meio de cultura específico, sem componentes exógenos. Avaliaram a sua aplicabilidade *in vitro* e *in vivo* e demonstraram a sua eficácia experimental e na prática clínica, na reconstrução cutânea *in vitro* ou enxertos *in vivo* (Lee *et al.*, 2006).

Ehrenreich e sua equipa, em 2006, fizeram a revisão da utilização de dois equivalentes dérmicos: *Alloderm®* e *Integra®* (Ehrenreich *et al.*, 2006). Em 2007, Wong e colegas publicaram um artigo com a descrição sumária de alguns tipos de equivalentes de pele humana obtida por engenharia tecidular: *Apligraf®*, *OrCel®* e *Dermograft®* (Wong *et al.*, 2007). Em 2007, Pham e colegas fizeram uma revisão sistemática da segurança e eficácia dos substitutos cutâneos fabricados por engenharia tecidular, com base em 20 ensaios clínicos randomizados (Pham *et al.*, 2007). Dieckmann *et al.* (2010) publicaram uma revisão dos equivalentes de pele obtidos por engenharia tecidular já aplicados na prática clínica.

De seguida, iremos especificar sucintamente os principais equivalentes de pele obtidos por engenharia tecidular.

Biobrane® é um substitute epidérmico biossintético de dupla camada que consiste em uma membrana externa de silicone e uma malha de *nylon* (Pham *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010). Esta liga-se ao colagénio tipo I bovino por ligações cruzadas, formando uma estrutura tridimensional que permite uma rápida adesividade às feridas. Está indicado nas queimaduras superficiais e de segundo grau e nos defeitos epiteliais de grandes dimensões.

Suprathel® (Schwarze *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010) é um produto polimerizado sintético composto por três componentes (DL-lactidetrimetil10-carbono, trimetilenocarbonato e ϵ -caprolactone) com uma membrana porosa. Está indicado nas queimaduras de segundo grau e nos dadores de transplante de pele.

O *Integra®* é um equivalente de pele humana desenvolvido em 1980 pela equipa de Yannas IV (Yannas *et al.*, 1980) (Ehrenreich *et al.*, 2006) e aprovado pela FDA em 1996. Consiste numa membrana de dupla camada tridimensional com um componente dérmico composto por colagénio bovino em ligações cruzadas com camada de sulfato 6-condroitina de tubarão e por um componente epidérmico composto por camada exterior de silicone (Ehrenreich *et al.*, 2006) (Pham *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010). Após aplicado na pele a reparar é infiltrado com fibroblastos que se fixam na matriz extracelular e iniciam a remodelação do colagénio e vascularização da derme. Pode ser utilizado em queimaduras de elevada profundidade, em vários tipos de úlceras ou feridas crónicas ou traumáticas (Heimbach *et al.*, 2003) (Ehrenreich *et al.*, 2006) e em reparação cicatricial (Dieckmann *et al.*, 2010).

Matriderm® (Ryssel *et al.*, 2008) (Wetzig *et al.*, 2009) (Dieckmann *et al.*, 2010) é um produto alemão composto por uma matriz porosa de colagénio bovino tipos I, II e V, coberta por elastina hidrolisada de bovino. Caso seja utilizada uma camada final, apenas é viável em feridas bem vascularizadas e por períodos limitados.

Oasis® (Clark *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010) consiste numa matriz de colagénio acelular proveniente de submucosa intestinal de porco. Apresentou bons resultados nas úlceras venosas dos membros inferiores, não obstante o risco de contaminação por priões ou retrovírus porcos.

Permacol® (Clark *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010) é também uma matriz de colagénio acelular mas proveniente da pele de porco, que demonstrou bons resultados nas queimaduras de primeiro e segundo grau.

Como exemplos de equivalentes cutâneos aloplásticos temporários temos: (1) *Epigard®* - um equivalente cutâneo aloplástico composto por uma camada de *teflon* que mantém a membrana

permeável ao ar mas não às bactérias e secreções (Dieckmann *et al.*, 2010); (2) *Syspurderm*® - consiste numa almofada de camada dupla de uma espuma flexível de PUR. A camada mais interna promove uma matriz porosa para a granulação tecidular, enquanto a superfície externa serve de barreira às infeções secundárias (Dieckmann *et al.*, 2010); e (3) *Lyomosusse*®/*Lyof foam*® - composto por uma membrana porosa hidrofílica que não adere ao leito da ferida e uma camada externa hidrofóbica que assegura a impermeabilidade bacteriana (Dieckmann *et al.*, 2010).

O *Alloderm*® consiste numa matriz de tecido extracelular desidratada pelo frio obtida de pele de cadáver, que preserva as propriedades estruturais e bioquímicas da derme humana. Não apresenta componente epidérmico e o componente dérmico é acelular, pelo que não tem atividade antigénica. Pode ser utilizado como tratamento nas queimaduras (aprovado desde 1993) ou na correção de cicatrizes (desde 1995) (Ehrenreich *et al.*, 2006) (Dieckmann *et al.*, 2010).

Como equivalentes epidérmicos enumeram-se: (1) *Epichel*® (Wright *et al.*, 1998) (Dieckmann *et al.*, 2010) - foi o primeiro equivalente epidérmico comercializado, composto por queratinócitos autólogos cultivados *in vitro* na presença de fibroblastos de murino. Pode ser utilizado nas queimaduras profundas; (2) *EpiDex*® (Dieckmann *et al.*, 2010) - um produto epidérmico produzido a partir de bainha radicular exterior dos folículos pilosos, que é utilizado nas úlceras venosas dos membros inferiores; (3) *Laserskin*® (Lam *et al.*, 1999) (Dieckmann *et al.*, 2010) – consiste em um equivalente epidérmico mecanicamente mais estável pela associação com uma membrana de ácido hialurónico perfurada; e (4) *BioSeed*® (Dieckmann *et al.*, 2010) – consiste em queratinócitos autólogos cultivados *in vitro* e depois suspensos num gel tipo fibrina adesiva, que é aplicado no local da ferida com uma seringa. Parece ser eficaz nas úlceras crónicas dos membros inferiores.

A evolução da engenharia tecidular permitiu a produção de estruturas de dupla camada mais complexas, cujo componente celular dérmico é composto por fibroblastos dérmicos autólogos ou por fibroblastos alogénicos de prepúcio neonatal, originando vários substitutos dérmicos de acordo com a matriz de suporte utilizada: (1) *Hyalograft 3D*® (Dieckmann *et al.*, 2010) – composta por derivados benzil-esterificados do ácido hialurónico; (2) *TransCyte*® (Pham *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010) – composta por malha de *nylon* coberta com colagénio da derme do porco, cultivada com fibroblastos de neonatos humanos e fixada com membrana de silicone externa e (3) *Dermograft*®. Este não possui componente epidérmico, sendo o

componente dérmico composto por uma malha de poliglactina bioabsorvível cultivada com fibroblastos viáveis alogénicos de prepúcio neonatal (Wong *et al.*, 2007) (Pham *et al.*, 2007). Os fibroblastos proliferam e produzem colagénio dérmico, fatores de crescimento, glucosaminoglicanos e fibronectina e os materiais da malha são gradualmente absorvidos (Pham *et al.*, 2007). A eficácia e segurança do *Dermograft*® foram avaliados em três dos estudos, avaliados num seguimento de 14 a 28 dias (Pham *et al.*, 2007). Pode ser utilizado em úlceras diabéticas, queimaduras e úlceras venosas dos membros inferiores (Dieckmann *et al.*, 2010)

Os equivalentes cutâneos compostos são definidos como células epidérmicas cultivadas em substitutos dérmicos contendo fibroblastos.

O *PermaDerm*® (Dieckmann *et al.*, 2010) é um exemplo de um equivalente de pele dermoepidérmico autólogo baseado em colagénio. O componente dérmico é composto por colagénio bovino tipo I, cultivado em fibroblastos humanos e a componente epidérmica composta por queratinócitos humanos.

O *OrCel*® é um outro substituto da pele humana, constituído por: componente epidérmico, composto por queratinócitos alogénicos vivos cultivados em matriz de duas camadas de colagénio e componente dérmico, composto por essa matriz de dupla camada de colagénio tipo I bovino com fibroblastos viáveis (Wong *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010). Ambos podem ser usados como substitutos permanentes da pele em queimaduras severa (Dieckmann *et al.*, 2010).

O *Apligraf*® é um equivalente vivo de pele de dupla camada composto por queratinócitos e fibroblastos alogénicos (Dieckmann *et al.*, 2010). Foi inicialmente designado por *Graftskin*® (Veves *et al.*, 2001). A sua atividade antigénica é inerte porque a cultura *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos implica a perda gradual das células de *Langerhans*. Apresenta, como componente epidérmico, queratinócitos alogénicos provenientes do prepúcio neonatal vivo e, como componente dérmico, colagénio tipo I bovino com fibroblastos alogénico de prepúcio neonatal viável (Eaglstain *et al.*, 1997) (Wong *et al.*, 2007) (Pham *et al.*, 2007). O *Apligraf*® apresentou um estudo de eficácia a 2 anos (Pham *et al.*, 2007).

Como o *Apligraf*® é um modelo de pele produzido por engenharia tecidular similar ao que irá ser utilizado neste trabalho de investigação, a sua caracterização será alargada no subcapítulo subsequente.

2.6.2 – *Apligraf*®

Na mesma altura em que a equipa de Burke (Burke *et al.*, 1981) desenvolveram as matrizes, Bell e colegas (Bell *et al.*, 1981) começou a desenvolver um equivalente de pele humana. Os fibroblastos foram obtidos de prepúcio de neonatos humanos e foram cultivados numa matriz de colagénio bovino, que, por sua vez, foi cultivada com células epidérmicas para produzir um equivalente cutâneo com dupla camada. O produto obtido foi testado em animais, com bons resultados. Estes trabalhos da equipa de Bell constituíram os primórdios do *Apligraf*®.

O *Apligraf*® é composto por uma matriz de colagénio bovino contendo fibroblastos integrados com uma camada de epitélio estratificado. Os fibroblastos na “derme” e os queratinócitos na “epiderme” mantêm-se viáveis e reproduzem células, constituindo um dos melhores tecidos cutâneos obtidos por engenharia tecidular construído até à data (Parenteau *et al.*, 1992). Este substituto artificial da pele é, então, composto por componentes da epiderme e derme, sendo ambas obtidas por cultura de células vivas; é morfológica, bioquímica e metabolicamente similar à pele humana; tem uma morfologia organizada, proliferação cinética típica, perfil lipídico e de queratinócitos de uma epiderme morfológica e funcionalmente diferenciada (Parenteau *et al.*, 1992) (Eaglstain *et al.*, 1997) (Lee, 2000).

O processo de produção do *Apligraf*® é uma modificação do modelo produzido por Bell (Bell *et al.*, 1981) e foi descrito por Parenteau (Parenteau *et al.*, 1992) (Parenteau, 1994).

A duração total do procedimento é de 17 a 20 dias. Os passos fundamentais são: obtenção de amostras, formação da matriz, epidermalização, estratificação e maturação.

Primeiro, os fibroblastos e os queratinócitos são removidos do prepúcio de neonatos rastreados e são cultivados no meio de cultura de modo a obter culturas celulares de fibroblastos (Wilkins *et al.*, 1994).

Depois, a solução de colagénio tipo I bovino, extraída por purificação ácida, é misturada com os fibroblastos. Esta mistura é lançada na membrana porosa de cultura onde se neutralizam os geles. Os fibroblastos causam contração da matriz de colagénio e formação do equivalente dérmico em cerca de quatro a seis dias. No estadio de epidermalização, os queratinócitos são colocados e cultivados na superfície do equivalente dérmico durante dois dias, permitindo a cobertura do equivalente epidérmico. As culturas são depois expostas ao ar, para possibilitar a estratificação da epiderme.

Por fim, o material é cultivado numa interface ar-líquido para promover a organização e maturação da epiderme. Pode ser preservado a 37°C (Wong *et al.*, 2007).

O *Apligraf*® tem uma taxa de proliferação celular similar à da pele humana, ocorrendo a atividade mitótica nos queratinócitos basais da epiderme e nos fibroblastos da matriz (Parenteau *et al.*, 1992) (Eaglstain *et al.*, 1997) (Lee, 2000). Parece ser imunologicamente inerte, provavelmente devido à ausência de células de *Langerhans* (Bell *et al.*, 1991a). A membrana basal contém pilhas de lípidos lamelares e a matriz contém faixas de fibrilas de colagénio curtas e proteínas da matriz extracelular, tais como os glucosaminoglicanos produzidos pelos fibroblastos da derme (Bell *et al.*, 1991b) (Eaglstain *et al.*, 1997). A junção dermo-epidérmica é mais lisa no *Apligraf*® do que na pele humana, embora não seja conhecida a importância funcional deste facto. A taxa de proliferação celular é semelhante à da pele humana (Parenteau *et al.*, 1991). A atividade mitótica ocorre nos queratinócitos basais da epiderme e nos fibroblastos da matriz.

Na aplicação deste equivalente cutâneo em enxertos cutâneos de ratos verificou-se que continua a adaptar-se morfológica e fisiologicamente no local. A vascularização também ocorre rapidamente.

Como vantagens deste modelo referem-se a disponibilidade imediata para uso, com produção numa única fase e facilidade de manuseamento (Wilkins *et al.*, 1994) (Muhart *et al.*, 1997) (Lee, 2000).

Quando o *Apligraf*® é utilizado como substituto cutâneo para ensaios experimentais *in vitro* de produtos comerciais, demonstrou propriedades semelhantes às da pele humana (Bell *et al.*, 1991b). Alguns estudos demonstram que pode mesmo ser utilizado como veículo na terapia génica (Badiavas *et al.*, 1996).

Vários estudos foram feitos para avaliação da eficácia do *Apligraf*® em vários contextos: tratamento de feridas, tratamento de úlceras venosas, entre outros (Eaglstain *et al.*, 1995) (Eaglstain *et al.*, 1997). Como não contém células apresentadoras de antigénios (por exemplo, células de *Langerhans*, células dendríticas dérmicas, células endoteliais, melanócitos ou leucócitos) é considerado imunologicamente inerte, pelo que é utilizado nas úlceras venosas e diabéticas (Veves *et al.*, 2001) (Zaulyanov *et al.*, 2007) (Dieckmann *et al.*, 2010).

2.7 – MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade ou lesão celular induzida em modelos experimentais *in vitro* pode ser avaliada por vários métodos distintos. Estes baseiam-se essencialmente em quatro tipos de critérios:

- 1 – Parâmetros morfológicos;
- 2 – Parâmetros bioquímicos;
- 3 – Alteração da permeabilidade membranar;
- 4 – Parâmetros metabólicos.

Parâmetros Morfológicos
- Microscopia ótica (forma celular; alteração nuclear e citoplasmática; acumulação de vacúolos lipídicos; união-desunião celular) - Integridade membranar - Contagem celular
Parâmetros Bioquímicos
- Conteúdo em proteínas e/ou DNA - Ensaio de exclusão com azul de triptano - Secreção enzimática: LDH, transaminases - Liberação de Cr⁵¹
Alteração da Permeabilidade da Membrana Celular
- Fluxo de iões e pequenas moléculas (concentração de K⁺, fluxo de Ca²⁺) - Acumulação de moléculas exógenas (succinato)
Parâmetros metabólicos
- Teste de MTT (redução de sais compostos por desidrogenases mitocondriais) - Conteúdo em ATP - Síntese proteica total (por incorporação de amino-ácidos radioativos) - Índice de lactato/piruvato - Concentração de glutatião - Peroxidação lipídica

Tabela 8 - Critérios de avaliação de citotoxicidade *in vitro* (Adaptada de Ávalos, 2009).

Existem várias técnicas para avaliar a viabilidade celular e que podem ser usadas, quer em culturas de células, quer em células cultivadas em meio com compostos mais ou menos tóxicos (ensaios toxicológicos). De entre todos os métodos laboratoriais de estudo da viabilidade e funcionalidade celulares, destacam-se a avaliação da integridade da membrana celular, os ensaios funcionais, os ensaios de viabilidade através de biossensores de fluorescência, os estudos de morfologia celular, a microanálise por energia dispersiva de raios X e as técnicas de determinação da expressão genética mediante *microarrays*.

Tipo de Ensaio	Método de Avaliação
Avaliação da integridade da membrana celular	1 – Baseados em corantes ou substâncias fluorescentes 2 – Baseados em colorações catiónicas 3 – Baseados na determinação de libertação de moléculas
Ensaio funcionais	1 – Medição de ATP 2 – Taxa de DNA 3 – Síntese de proteínas
Ensaio com provas de fluorescência	Utilização de biossensores de fluorescência
Ensaio morfológicos	Baseados na observação microscópica
Microscopia Eletrônica Analítica (MEA)	Microanálise por energia dispersiva de raios X
Determinação da expressão génica global	1 - <i>Microarrays</i> de DNAC 2 – <i>Microarrays</i> de oligonucleótidos

Tabela 9 – Distribuição dos tipos de ensaio de avaliação da viabilidade celular e respetivos métodos de avaliação possíveis.

2.7.1 – Métodos Gerais

Atualmente, existem inúmeros métodos para avaliar a viabilidade celular *in vitro* (em culturas celulares), *ex vivo* (em tecidos e/ou órgãos “explantados”) e *in vivo* (em organismos modelo e/ou humanos) (Galluzzi *et al.*, 2009).

Alguns dos métodos clássicos de identificação de células em apoptose e mortas (por exemplo, técnicas baseada em microscopia ótica) continuam a ser largamente utilizados pelos investigadores, graças à sua simplicidade e baixo custo, mesmo sendo não específicos e, por isso, inapropriados na maioria dos contextos experimentais. Em oposição, a quantificação precisa de um único processo molecular pode ser excessivamente específico, e também pode originar sobre ou subestimativas da morte celular. Inúmeros métodos para detetar a morte celular apenas podem ser aplicados a um número limitado de ensaios, devido às características intrínsecas dos sistemas de modelos utilizado ou limitações técnicas da plataforma onde são implementados os protocolos (Galluzzi *et al.*, 2009).

De seguida especificam-se sucintamente os métodos de avaliação de citotoxicidade e viabilidade celular a utilizar no presente trabalho.

2.7.2 – Microscopia Eletrónica Analítica

A microanálise por energia dispersiva de raios X (EPXMA) é uma técnica que, através do uso de um feixe de eletrões, permite o estudo da composição química da amostra em simultâneo com a sua observação microscópica (Galluzzi *et al.*, 2009).

A microscopia eletrónica permite a visualização das modificações ultra estruturais finas que ocorrem na morte celular, incluindo edema mitocondrial, vacuolização plasmática e/ou da membrana mitocondrial externa e as primeiras fases da condensação da cromatina. A esta informação ultra estrutural deve associar-se um método de avaliação quantitativa robusto (Galluzzi *et al.*, 2009).

2.7.3 – Determinação da Expressão Génica Global (Microarrays)

A tecnologia de *microarrays*, ou microarranjos de DNA, possibilita a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos em determinado organismo, em diferentes estadios de desenvolvimento ou condições ambientais (Rosa *et al.*, 2007). A tecnologia de *microarrays* fornece uma medida indireta do nível de expressão génica, mediante quantificação da abundância dos RNAs transcritos (Rosa *et al.*, 2007).

A técnica de *microarrays* envolve uma série de procedimentos laboratoriais complexos - extração de RNA, transcrição reversa e marcação fluorescente e hibridização final, que tornam necessário uma cuidadosa planificação experimental e análise estatística dos dados, por forma a minimizar as variações dos resultados (Rosa *et al.*, 2007). Consiste na utilização de uma lâmina ou microarranjo na qual as *sondas* (amostras de DNA) foram imobilizadas em quantidade e posição precisamente definidas (*spots*) para se fazer a hibridização com um *pool* de mRNAs extraídos das amostras biológicas (*targets*) que foram, por sua vez, previamente marcadas com fluoróforos (marcadores fluorescentes) (Rosa *et al.*, 2007). Após o processo de hibridização e lavagem dos “alvo” excedentes (que não se ligaram às sondas), cada lâmina é exposta à ação de raios laser que excitam os fluoróforos incorporados aos “alvos”, fazendo com que estes emitam luz (fluorescência). Em princípio, quanto maior for a expressão de um determinado gene, maior será a quantidade de “alvos” marcados com o fluoróforo e, consequentemente, maior será a intensidade da fluorescência do complexo alvo-sonda após a hibridização (Hiendleder *et al.*, 2005) (Rosa *et al.*, 2007).

Note-se que a técnica de *microarrays* descrita pode sofrer diversas variações dependendo do substrato (tipo de lâminas), tipo de sonda (oligonucleotídeos de cadeia curta, oligonucleotídeos de cadeia longa, cDNA ou produtos de PCR), do método de deposição das amostras, técnica de extração e marcação do RNA ou protocolos de hibridização.

3 - HIPÓTESE DE TRABALHO

3.1 – HIPÓTESE

O *patch* de lidocaína a 5% apresenta níveis de citotoxicidade que explicam os seus efeitos secundários na pele.

3.2 – OBJETIVOS DO TRABALHO

O **objetivo geral** do presente trabalho consiste em:

- Determinar a toxicidade do *patch* de lidocaína a 5% na pele humana obtida através de técnicas de engenharia tecidular

O nosso objetivo geral é constituído por vários **objetivos específicos** que se enumeram de seguida:

- 1) Estabelecer três culturas primárias de queratinócitos humanos;
- 2) Determinar a viabilidade celular dos queratinócitos cultivados com lidocaína a 5%, mediante microscopia eletrónica analítica e *microarray* (às 12, 24 e 48 horas);
- 3) Estabelecer três culturas primárias de fibroblastos humanos;
- 4) Determinar a viabilidade celular dos fibroblastos cultivados com lidocaína a 5%, mediante microscopia eletrónica analítica e *microarray* (às 12, 24 e 48 horas);
- 5) Determinar a viabilidade de um modelo de pele artificial, obtida mediante engenharia tecidular, cultivado com *patch* de lidocaína a 5% ou com o *patch* placebo (controlo), mediante microscopia eletrónica analítica e *microarray* (às 12, 24 e 48 horas).

Como forma de conseguir alcançar estes objetivos, definimos as seguintes **questões orientadoras**:

- Qual a viabilidade celular dos queratinócitos e dos fibroblastos humanos cultivados com lidocaína a 5%?

- Há diferença estatisticamente significativa entre o nível de toxicidade do *patch* de lidocaína a 5% aplicado no equivalente de pele humana obtido por engenharia tecidual quando comparada com a aplicação de *patch* “placebo”, pelo mesmo período de tempo?
- Há diferença estatisticamente significativa entre o nível de toxicidade do *patch* de lidocaína a 5% aplicado no equivalente de pele humana obtido por engenharia tecidual por períodos de tempo diferentes (12, 24 e 48 horas)?
- Os efeitos secundários, relatados para o *patch* de lidocaína, serão devidos à toxicidade celular nos fibroblastos ou nos queratinócitos ou em ambos os tipos celulares?

4 - METODOLOGIA

4.1 – MATERIAIS

4.1.1 – Componentes dos Meios de Cultura

- 1 – Água mili-Q (Nota: todas as soluções devem ser filtradas através de um filtro de 0,22 µm para esterilidade)
- 2 – EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M, pH 8,0 (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 15575)
- 3 – PBS (Tampão salino de fosfato) (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 14190)
- 4 – Tripsina a 0,25% (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 15050)
- 5 – EDTA 5mM (adicionando 5 ml de EDTA a 0,5 mM em 500 mL de PBS)
- 6 – EDTA-PBS a 10% (solução de 50 mL de EDTA 5 mM com 450 mL de PBS)
- 7 – Tripsina a 0,1% (adicionando 50 mL de tripsina 0,25% com 75 mL de PBS)
- 8 – Tripsina-EDTA a 50% (solução de 50 mL de tripsina 0,1% com 50 mL de EDTA 5 mM)
- 9 – 100x HEPES (800 mM) – dissolver 47,24 g em 250 mL ddH₂O (água bidestilada), armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*Sigma, St. Louis, MO*, cat.# H-4034)
- 10 – 100x Adenina (18 mM) – dissolver 0,972 g em 2,4 mL de NaOH 4 N, q.s. até 400 mL com ddH₂O, armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*MP biomedicals, Solon, OH*, cat.# 100190)
- 11 – 500x Hidrocortisona (0,25 mg/mL) – dissolve 0,0538 g em 200 mL de ddH₂O, armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*Sigma, St. Louis, MO*, cat.# H-4881)
- 12 – 1,000x toxina da cólera (10⁻⁷ M) – dissolver 9 ng/mL em ddH₂O, armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*Sigma, St. Louis, MO*, cat.# H-8052)
- 13 – 1,000x EGF (fator de crescimento epidérmico) (10 µg/mL) – dissolver 10 µg/mL em BSA (*bovine serum albumin*) 0,1%, armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*Austral Biological, San Ramol, CA*, cat.# GF-010-9)
- 14 – 1,000x Insulina (5 mg/mL) – dissolver 50 mg em 10 mL de HCl 0,005 N, armazenável a -20°C por mais de 1 ano (*Sigma, St. Louis, MO*, cat.# I-2643)

- 15 – Triiodotironina (T3) a 10 nM – adicionar 1 mL de T3 a 99 mL de ddH₂O para 500x stock (Sigma, cat.# T-5516)
- 16 – Progesterona a 2 µM – dissolver 1 mg em 1 mL de etanol absoluto, adicionar 14,7 mL de ddH₂O, diluir 1 mL em 100 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) para 1,000x stock (Sigma, St. Louis, MO, cat.# P-8783)
- 17 - BCS (*Bovine Calf Serum*) quelado – quelar o soro através da mistura de 10 g de CHELEX 100 (Sigma, St. Louis, MO, cat.# C-7901) a 100 mL de soro e mexer durante 3 horas a 4°C, seguido de filtragem através do papel de *Whatman* e, depois, através de um filtro estéril
- 18 – Transferrina (5 mg/mL) - (BioSource, cat.# 352-020, 200 mL)
- 19 – 500x PES – contém o-fosfariletanolamina (0,01 mM final), etanolamina (10 µM final) e selênio (10 µg/mL final) - (BioSource, cat.# P02-45-100)

4.1.1.1 – Meio 010

- 1 – 43 g pó DME (*JRH BioSciences*), sem glucose nem CaCl₂
- 2 – 5 L ddH₂O
- 3 – 0,5 g MgSO₄
- 4 – 18,5 g NaHCO₃

4.1.1.2 – Meio de Cultura de Queratinócitos

- 1 – 338 mL de meio DMEM (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 11885)
- 2 – 112 mL de meio F12 (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 11765)
- 3 – 25 mL FBS (*fetal bovine serum*) (5% final) (*Hyclone, Logan, UT*, cat.# SH30071.03)
- 4 – 5 mL de adenina a 18 mM (0,18 mM final)
- 5 – 3,4 mL 100x penicilina/estreptomicina (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 15140-122)
- 6 – 5 mL de HEPES a 800 mM (8 mM final)
- 7 – 1 mL de hidrocortisona a 0,25 mg/mL (0,5 µg/mL final)
- 8 – 0,5 mL toxina da cólera a 10⁻⁷ M (10⁻¹⁰ M final)
- 9 – 0,5 mL de EGF a 10 µg/mL (10 ng/mL final)

10 – 0,5 mL de insulina a 5 mg/mL (5 µg/mL final), armazenável mais de 2 semanas a 4°C

4.1.1.3 – Meio de Cultura de Fibroblastos

1 – 500 mL de meio DMEM (*Invitrogen, Carlsbad, CA, cat.# 11885*)

2 – 55,6 mL de FBS (10% final) (*Hyclone, Logan, UT, cat.# SH30071.03*)

3 – 5,6 mL de HEPES a 800 mM (8 mM final)

4 – 3,4 mL 100x penicilina/estreptomicina (*Invitrogen, Carlsbad, CA, cat.# 15140-122*), armazenável mais de 2 semanas a 4°C

4.1.1.4 – Meio de Cultura 3T3

1 – 500 mL de meio DME (*Invitrogen, Carlsbad, CA, cat.# 11885*)

2 – 55,6 mL de *Bovine Calf Serum* (*Hyclone, Logan, UT, cat.# SH30072.03*) (10% final)

3 – 3,4 mL 100x penicilina/estreptomicina (*Invitrogen, Carlsbad, CA, cat.# 15140-122*)

4.1.2 – Componentes da Construção do Equivalente de Pele Humana Tridimensional

1 – Placa de cultura de 6 poços com inserções de 3 µm de membranas porosas de policarbonato (*Organogenesis, Canton, MA, cat.# MS-10-305*)

2 – Tendão de colagénio bovino do tipo I (*Organogenesis, cat.# 200-055*)

3 – Fibroblastos prepuciais humanos

4 – Meio de cultura de fibroblastos (descrito na secção anterior)

5 – EDTA

6 – Queratinócitos prepuciais humanos de neonatos

7 – PBS

8 – PBS-EDTA

9 – Centrifugadora (1,000 – 2,000 rpm)

4.2 – METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS

4.2.1 – Obtenção das Amostras

Os fibroblastos humanos dérmicos (FHD) e os queratinócitos humanos epidérmicos (QHE) são derivados de prepúcio de neonatos obtidos para uso comercial mediante as *guidelines* internacionais de consentimento informado.

O prepúcio é extensamente lavado em múltiplas lavagens com tampão salino de fosfato (PBS), contendo 50 mcg/mL de gentamicina e 250 mcg/mL de anfotericina B. A superfície tecidual é descontaminada através de uma lavagem de um minuto com etanol a 95%, com agitação, seguida de uma re-hidratação em solução PBS. De seguida, é retirado o tecido celular subcutâneo do prepúcio e um quarto deste tecido prepucial é dissociado enzimaticamente em solução de 1,2 mg/mL de tripsina e 5 mg/mL de colagenase (*Sigma* ou *Worthington*).

4.2.2 – Estabelecer três Culturas Primárias de Fibroblastos Humanos

A suspensão celular obtida dos 25% do tecido prepucial é depois cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*, com 4,5 g/L de glucose, Ham's F 12, L-glutamina e sulfato de gentamicina) contendo 10% de NBS (*Newborn Calf Serum*), para obter as culturas primárias de fibroblastos.

Os fibroblastos são cultivados a 37°C em incubadora humidificada com 5% de CO₂.

Quando já crescidos nas condições de cultura selecionada, cada tipo celular é transferido em série para outros meios de cultura semelhantes por forma a permitir o desenvolvimento de um maior banco de células de trabalho. Assim, os FHD são expandidos em meio DMEM-10% NBS, usando frascos ou microcarregadores (*Gelibead, Hazelton, Lenexa, KS*).

4.2.3 – Estabelecer três Culturas Primárias de Queratinócitos Humanos

Os restantes três quartos de tecido prepucial são explantados em porções de 1 a 2 mm² e colocados numa superfície plástica coberta com colagénio, para obter o crescimento de queratinócitos epidérmicos.

Os queratinócitos são cultivados no meio de cultura MBSM (*Minimally Supplemented Basal Medium*), que consiste na solução 3:1 de meio DMEM sem cálcio e Ham's F12, suplementado como descrito por Johnson *et al.* (1992). São cultivados a 37°C em incubadora humidificada com 10% de CO₂.

Quando já cultivados nas condições de cultura selecionada, cada tipo celular é transferido em série para outros meios de cultura semelhantes, de forma a permitir o desenvolvimento de um maior banco de células de trabalho. Assim, os QHE são expandidos em meio MSBM em outras superfícies plásticas revestidas com colagénio.

O esquema típico de expansão dos queratinócitos epidérmicos neonatais no banco principal de células é o seguinte:

- 1 – Um banco de células formado a partir de três quartos do tecido prepucial neonatal extraído rende 2 a 8×10^7 células epidérmicas ou 6 a 26 frascos primários com 3×10^6 células por frasco;
- 2 – Após 2 passagens adicionais o banco de células expande-se para um potencial de 3×10^{10} células para uso na construção do equivalente cutâneo. Como 0,5 a $1,0 \times 10^5$ células são plantadas por cm² de superfície de equivalente de pele, cada frasco de cultura primária contém potencial para gerar 3 a 6×10^5 cm² de equivalente cutâneo humano.

As células écrinas são isoladas da população mista de queratinócitos. Os QHE são cultivados numa placa revestida de colagénio em MSBM. Quando atingem os 40% de confluência, as concentrações de cálcio aumentam para 1,8 mM. O aumento de cálcio origina diferenciação da subconfluência dos queratinócitos mas não interfere com as células écrinas. Quando as células são tripsinizadas, as células écrinas separam-se em células individuais, enquanto os queratinócitos escamosos diferenciados se separam sob a forma de amontoados. Após nova passagem os amontoados de queratinócitos não se fixam, ao contrário das células écrinas que se fixam e proliferam. À terceira passagem num meio rico em cálcio apenas se mantêm as células écrinas.

4.2.4 – Colagénio

O colagénio utilizado na produção do equivalente de pele humana por engenharia tecidular é produzido e distribuído em lotes. Cada lote de colagénio bovino tipo I nativo é extraído por acidificação. É sujeito a uma série de testes laboratoriais de qualidade que incluem esterilização, análise de proteínas por eletroforese, análise de aminoácidos e análise espectrofotométrica.

O gel de colagénio dérmico é mantido submerso em DMEM 5% suplementado com NSCS com insulina (5 mcg/mL) e ascorbato de sódio (50 mcg/mL) durante a sua condensação com os queratinócitos, durante cerca de 6 dias.

As estirpes celulares são comparadas e selecionadas para maior expansão de acordo com as suas características basais de crescimento e longevidade no meio MSBM, o seu desempenho na cultura orgânica (equivalente cutâneo) e manejo das culturas primárias.

Os bancos de células de trabalho são tipicamente criopreservados através de cinco a seis passagens para os FHD e três passagens para os QHE. Geralmente, ambos os tipos celulares são descongelados e cultivados em uma passagem antes de serem incorporados no equivalente cutâneo. Mas podem ser utilizadas células cultivadas frescas.

4.3 – METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DE PELE MEDIANTE ENGENHARIA TECIDULAR

Para o desenvolvimento de pelo menos sete amostras de pele humana artificial obtidas mediante engenharia tecidular vai ser utilizado um procedimento adaptado do método de produção descrito por Egles e sua equipa em 2010 (Egles *et al.*, 2010)

4.3.1 – Construção de Matriz de Colagénio com Fibroblastos Dérmicos

- 1 – Cultivar os Fibroblastos Humanos Dérmicos (FHD) prepuais em monocamada, de forma a ficarem quase confluentes um dia antes da incorporação no colagénio.

2 – No dia prévio à sua incorporação, fazer a passagem para uma subcultura numa razão de separação de 9:10, de forma a ficarem mitoticamente ativos no dia após a incorporação no gel de colagénio.

3 – A realização das passagens celulares, a partir de uma placa confluenta, garante que uma maior fração de células em divisão ativa seja incorporada no gel de colagénio. A passagem na razão de separação de 9:10, é realizada através da ressuspensão das células tripsinizadas em 10 mL de meio e adicionando 9 mL da suspensão de células numa nova placa.

4 – No dia seguinte, a matriz de colagénio é preparada através da construção de camadas sucessivas de colagénio acelular e colagénio celular na membrana de polycarbonato. Preparar o colagénio acelular como uma mistura que é arrefecida em gelo (para prevenir gelificação prematura).² Para o fazer, as pipetas devem ser gelificadas a -20°C por 15 minutos antes do seu uso (para prevenir o aquecimento do colagénio). Evitar as bolhas de ar enquanto se processa a mistura. O colagénio deve passar de uma coloração amarelo-palha, para um rosa claro, para assegurar uma gelificação ótima. Se a cor se tornar amarelo brilhante, deve ser adicionado uma gota de bicarbonato de sódio e centrifugar até surgir a cor amarelo-palha.

5 – Adicionar 1 mL de colagénio acelular em cada inserção da placa. Assegurar que a matriz cubra a totalidade da superfície do fundo do local de inserção e deixar à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Não mover a placa durante o período da gelificação. A cor irá mudar para rosa quando o colagénio estiver totalmente gelificado.

6 – Tripsinizar, contar e ressuspender os fibroblastos para uma concentração final de 3×10^5 células/mL. Será usado um total de 5×10^5 fibroblastos por cada placa de 6 poços.

² O fabrico do gel de colagénio requer que todos os componentes sejam mantidos no gelo até que a mistura do gel seja inserida na placa. Isto permite que o colagénio não precipite prematuramente destas soluções. As pipetas de plástico usadas para o colagénio devem ser geladas antes de usar. As quantidades listadas são correspondentes a uma placa de 6 poços:

- 0,6 mL 10x MEM (*Minimum Essential Medium with Earle's salts*) (Cambrex, Walkersville, MD, cat.# 12-684F)

- 54 µl L-glutamina a 200 mM (*Invitrogen, Carlsbad, CA*, cat.# 25030-081)

- 0,68 mL FBS (*Hyclone, Logan, UT*, cat.# SH30071.01)

- 187 µL NaHCO₃ a 71,2 mg/mL (*Cambrex, Walkersville, MD*, cat.# 17-605E)

7 – Preparar o colagénio celular como uma mistura que é arrefecida em gelo. (ver nota de rodapé 2). Os fibroblastos devem ser adicionados logo após o colagénio ter sido neutralizado, de modo a que as células não sejam lesadas pelo pH alacalino que existe antes da neutralização. Ressuspender a suspensão células/colagénio através de uma fragmentação suave apenas para incorporar os fibroblastos no gel de colagénio.

8 – Fragmentar suavemente a matriz celular e adicionar 3 mL em cada local de inserção no topo da matriz de colagénio acelular. Transferir cuidadosamente a mistura para a incubadora por 30 minutos.

9 – Quando a matriz celular se tornar rosa e estiver totalmente gelificada (usualmente num período inferior a 30 minutos), suprir o gel com 12 mL de meio de fibroblastos através da adição de 10 mL de meio em torno do local de inserção e 2 mL de meio diretamente na inserção.

10 – Depois, incubar os geles por 5 a 7 dias, de modo a permitir a contração completa do gel (numa malha fibrilhar).

11 – Durante os primeiros dias, os lados do gel contraem e formam uma placa no centro. Os geles estarão estáveis entre 5 a 10 dias após a contração inicial.

4.3.2 – Adição de Queratinócitos à superfície do Gel de Colagénio Contraído

1 – Os queratinócitos humanos epidérmicos (QHE) são cultivados numa camada de fibroblastos 3T3 de rato mitoticamente inativos. Os QHE devem ser cultivados para uma confluência máxima de 50%, de modo a minimizar o número de células diferenciadas cultivadas no gel de colagénio. Alternativamente, os QHE podem crescer numa cultura de monocamada num meio pobre em cálcio e sem soro.³

- 5 mL de colagénio bovino tipo I (*Organogenesis, Canton, MA, cat.# 200-055*) fresco e usado imediatamente (não pode ser armazenado quando misturado).

³ A proliferação dos QHE e a elevada fração de crescimento são os fatores mais críticos no fabrico bem sucedido de equivalentes humanos de pele. A maioria dos queratinócitos cultivados nas culturas de equivalentes de pele humana vão aderir ao substrato conectivo, mas apenas as células em fase replicativa podem crescer após serem cultivadas. Os queratinócitos que atingem a fase de diferenciação final enquanto submersos na cultura também vão aderir ao substrato, mas não proliferam

2 – Remover as células de suprimento 3T3 da cultura através da incubação das placas em PBS-EDTA por 5 minutos a uma temperatura de 37°C. As células 3T3 podem depois ser removidas por pipetagem cuidadosa, permitindo a manutenção da adesão dos QHE. É importante não permitir que as culturas sejam incubadas em tempo excessivo, para evitar que os queratinócitos também se desconectem da placa. A partir do momento em que as células 3T3 se começam a destacar, substituir a solução PBS/EDTA por PBS simples, enxaguar suavemente a placa três vezes com PBS até os 3T3 estarem completamente removidos. Depois, o PBS é removido, deixando apenas as colônias de QHE aderentes à placa.

3 – Tripsinizar os QHE com tripsina-EDTA (0,05%) durante 5 minutos a 37°C, para obter uma única suspensão celular. Remover as células não aderentes para um tubo de 15 mL contendo meio de queratinócitos (para neutralizar a tripsina) e fazer a contagem. O número desejado de células é retirado do tubo com células tripsinizadas para um outro tubo de 15 mL. As células são centrifugadas a 2,000x g durante 5 minutos e ressuspensas num volume que contenha um total de 5×10^5 queratinócitos a ser usados para inserção na placa.

4 – Remover o meio de fibroblastos das placas com colagénio contraído vinte minutos antes de cultivar os queratinócitos, de modo a permitir que estes sejam cultivados em um gel de colagénio húmido. Os QHE devem ser plantados diretamente no gel de colagénio contraído numa alíquota de 50 µL contendo 5×10^5 células. Para modificar a natureza do substrato no qual os queratinócitos são plantados, a derme desepidermalizada ou revestimentos de policarbonato podem, nesta fase, ser aplicados diretamente no topo do gel de colagénio contraído⁴.

até à fase final de equivalente cutâneo bem estratificado. Então, será importante que os QHE cresçam de tal forma que a maior fração de crescimento esteja presente quando as culturas em monocamada são cultivadas no gel de colagénio do equivalente de pele humana. Isto pode ser possível através do crescimento dos QHE como pequenas colônias com elevada densidade clonal em culturas submersas nas camadas de suprimento 3T3, de modo a que a diferenciação terminal seja mínima e a fração de células em fase replicativa seja máxima. As estirpes de queratinócitos podem ser testadas por ensaios de eficiência de colônias que determinam quais as que apresentam maior eficiência de formação de colônias, as quais têm diferenciação morfológica e arquitetura tecidular ótima para os equivalentes cutâneos.

⁴ Há alguma variabilidade no grau de suporte dos fibroblastos aos queratinócitos crescidos após incorporados no gel de colagénio. Parece que o suporte de fibroblastos na organização e crescimento

5 – Ressuspender os QHE num volume de meio de Epidermalização I, para uma concentração final de 500.000 células/50 µL. Adicionar cuidadosamente os 50 µL da suspensão celular no centro do gel de colagénio contraído (ou no centro do substrato colocado no gel de colagénio). Não mover a placa durante 15 minutos para permitir que os queratinócitos adiram. A construção é depois incubada a 37°C durante 30 a 60 minutos, sem nenhum meio que permita aos QHE aderirem totalmente.

6 - Adicionar 12 mL de meio de Epidermalização I a cada local de inserção, através de adição de 10 mL no fundo da placa e 2 ml cuidadosamente colocados no local de inserção por cima dos queratinócitos. Incubar a 37°C.

7 – As culturas são supridas com meio de cultura cada 2 dias, da seguinte forma:

I – Meio de Epidermalização I (12 mL por placa nos primeiros 2 dias)

II – Meio de Epidermalização II (12 mL por placa nos 2 dias seguintes)

III – Meio de cornificação – Nesta fase, as culturas crescem numa *interface* ar-líquido, através da adição de 7 mL por placa para o fundo da caixa de tal modo que o local de inserção do cultivo apenas contacte com o meio. Aspirar o meio de dentro do local de inserção para os tecidos poderem crescer na *interface* ar-líquido. Adicionar o meio de cornificação extra cada dois dias até terminar a experiência.

As culturas podem ser mantidas na *interface* cerca de 17 dias. Após este tempo a camada superficial do epitélio torna-se excessivamente espessa por falha da descamação. Assim, as camadas inferiores do epitélio ficam comprimidas e a longevidade da cultura torna-se limitada.

O tempo total de construção do equivalente de pele humana mediante esta técnica de engenharia tecidual é de aproximadamente 3 a 4 semanas.

Após 7 a 10 dias de cultura pode ser aspirado todo o meio de cultura do equivalente de pele humana e removido o material inserido na placa, colocando-o em posição invertida num prato estéril. Pode ser usado um bisturi para cortar a membrana de inserção e aparar a

do equivalente cutâneo de pele está diretamente relacionado com o grau pelo qual os FHD são capazes de contrair o colagénio. Em geral, estirpes de fibroblastos que demonstram maior contração do gel de colagénio antes da adição dos queratinócitos têm maior capacidade de suporte do crescimento desses queratinócitos.

cultura cortando em torno da região da plataforma crescida para remover a parte do colagénio não coberta de queratinócitos.

4.3.3 – Colheita e Incorporação Tecidular para Análise

- 1 – Remover o meio dos locais de inserção e enxaguar suavemente os tecidos duas vezes com PBS.
- 2 – Cortar a membrana de inserção do plástico na base, usando um bisturi.
- 3 – Bifurcar a cultura e colocar metade numa *cassette* de processamento de tecido e imergir imediatamente em formalina 10%. Os tecidos são muito finos, pelo que necessitam de um curto período de fixação (uma hora) antes do processamento em parafina.
- 4 – A restante metade do tecido deve ser colocada em uma solução de sucrose a 2 M preparada em água. O tecido deve ser ensopado em sucrose a 4°C por pelo menos uma hora, mas não mais de 24 horas. A sucrose substitui a água no gel de colagénio hidratado e protege contra lesão de congelamento durante a incorporação e o processamento.
- 5 – Para incorporar o tecido ensopado em sucrose para preservação congelado, fazer um pequeno molde com folha de alumínio utilizando o fundo de uma garrafa pequena (cerca de 2 cm de diâmetro). Preencher $\frac{3}{4}$ do molde com o meio incorporado.
- 6 – Remover cuidadosamente o tecido da sucrose utilizando *fórceps* de ponta estreita, garantindo a manutenção do tecido na membrana de *nylon*. Cuidadosamente tocar o lado membranoso do tecido para remover o excesso de sucrose.
- 7 – Colocar o tecido no meio embebido durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8 – Colocar a prateleira de metal dentro de uma caixa *Styrofoam* e preencher com azoto líquido até ao topo. Colocar o molde de alumínio no topo da prateleira e manter o tecido no seu interior na posição correta. Os vapores do azoto líquido congelam o meio de incorporação e o tecido durante 5 minutos. Depois o tecido já pode ser armazenado a -80°C.

4.4 – INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA E CITOTOXICIDADE CUTÂNEA

1 - Aplicação de lidocaína a 5% nas culturas primárias de fibroblastos durante:

- a. 12 horas
- b. 24 horas
- c. 48 horas

2 - Aplicação de lidocaína a 5% nas culturas primárias de queratinócitos durante:

- a. 12 horas
- b. 24 horas
- c. 48 horas

3 - Aplicação de *patch* de lidocaína a 5% em 3 amostras de pele humana obtida por engenharia tecidual durante respetivamente:

- a. 12 horas
- b. 24 horas
- c. 48 horas

4 - Aplicação de *patch* “placebo” em 3 amostras de pele humana obtida por engenharia tecidual durante respetivamente:

- a. 12 horas
- b. 24 horas
- c. 48 horas

4.5 – MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CUTÂNEA

4.5.1 – Determinação da Viabilidade Celular mediante Microanálise por Energia Dispersiva de Raios X

Para analisar a viabilidade celular das células da pele humana obtida por engenharia tecidual (fibroblastos e queratinócitos) estas serão cultivadas sobre placas de suporte cobertas com piolofórmio, serão lavadas e criofixadas.

1 – Adesão das células ao suporte

As células, mantidas em frascos de cultura, subcultivar-se-ão em grades de ouro, de 3 mm de diâmetro, especiais para microscopia eletrônica (*Fedelco* ref. G100-G3), recobertas com Piolofórmio (SPI-CHEM ref. 2466). Para isso, em primeiro lugar eliminam-se os restos de matéria orgânica que podem estar depositados sobre as grades de ouro, através de lavagem com clorofórmio. De seguida, aclaram-se com etanol absoluto e lavam-se novamente em ácido acético a 2%, deixando-se secar ao ar. Para permitir o crescimento das células sobre as grades de ouro, aplica-se sobre elas uma capa fina de Piolofórmio. Este composto orgânico solúvel de clorofórmio permite a formação de películas muito finas de um material similar ao plástico que permite a adesão e crescimento celular na sua superfície de suporte. Por fim, as grades de ouro cobertas com Piolofórmio são depositadas sobre uma tampa de vidro de 11 mm de diâmetro (*Fedelco* ref. 06-K-F 0513), esterilizando-se através de irradiação de luz ultravioleta durante 12 horas.

2 – Incubação das células

Uma vez subcultivadas as células sobre as grades de ouro cobertas com Piolofórmio, as células ficam a incubar durante 24 a 48 horas em meio de cultura que permita a adesão das células à superfície.

3 – Eliminação do meio de cultura

De modo a eliminar a contribuição do meio extracelular no espectro de raios X da análise, procede-se à lavagem das grades contendo as células, de acordo com os critérios estabelecidos previamente por diferentes autores, (*Wroblewski et al.*, 1984) (*Abraham et al.*, 1985) (*Lechene*, 1988) (*von Euler et al.*, 1992) (*Wroblewski*, 1993) (*Warley*, 1994) (*Borgmann et al.*, 1994), escolhendo como solução de lavagem a água destilada. Desta forma, todas as amostras serão lavadas por imersão em água destilada a uma temperatura de 4°C, durante 5 segundos. A solução de lavagem deve manter-se em constante movimento através de agitação magnética.

4 – Criofixação e criodissecação das amostras

Depois de lavar as grades contendo as células a analisar, elimina-se rapidamente o excesso de água com um papel de filtro, realizando-se a criofixação celular mediante imersão rápida de todas as amostras em nitrogénio líquido. As grades com células criofixadas introduzem-se depois num porta-amostras de alumínio pré-arrefecido a -196°C por imersão em nitrogénio

líquido. As células criofixadas e depositadas no interior do porta-amostras são transferidas de forma imediata para um sistema de criodissecação de alto vázio *Emitech K775* (*Emitech, Watford, Reino Unido*) com o objetivo de extrair a água de todas as células por sublimação. As amostras são criodissecadas num total de 12 horas a uma precisão de vázio de 10^{-5} mbar, segundo o perfil de temperaturas descrito na tabela 10 e de acordo com os critérios de *Warley e Skepper* (*Warley et al., 2000*).

SEGMENTO	TEMPERATURA INICIAL	TEMPERATURA FINAL	TEMPO
1	-100°C	-100°C	1 hora
2	-100°C	-70°C	1 hora
3	-70°C	-70°C	1 hora
4	-70°C	-50°C	1 hora
5	-50°C	-50°C	1 hora
6	-50°C	+25°C	12 horas

Tabela 10 – Perfil de temperaturas e intervalos de tempo utilizados para a criodissecação das amostras num sistema de alto vázio.

5 – Recobrimento das amostras

Após a criodissecação, as células vão-se recobrir com uma superfície condutora de eletricidade para facilitar a varredura do feixe de eletrões durante a sua observação microscópica e deteção analítica. Em concreto, as grades criodissecadas e montadas sobre o porta-amostras de alumínio vão ser recobertas com uma fina capa de carbono utilizando um evaporador *Emitech* (*Watford, Reino Unido*) dotado com um fio de grafite (*Electron Microscopy Sciences, Madrid*) em condições de alto vázio.

6 – Observação e análise das amostras mediante microscopia eletrónica analítica

No trabalho que se pretende desenvolver, vai ser determinado o conteúdo iónico de Na, K, P, Mg, S, Cl e Ca das populações celulares (fibroblastos e queratinócitos) sujeitas a diferentes períodos de contacto com o *patch* de lidocaína a 5%. Vão ser analisadas 30 células de cada vez.

A quantificação do conteúdo iónico das células cultivadas será feita através da microscopia eletrónica analítica, utilizando um Microscópio Eletrónico de Varrimento *Philips XL-30* (*Phillips, Eindhoven, Holanda*) associado a um sistema de Energia Dispersiva de Raios X

(EDAX DX4i) e a um sistema de detecção de elétrons retro-dispersados de estado sólido (*K.E. Development, Cambridge, Reino Unido*). A configuração geométrica deste equipamento possibilita a detecção simultânea de elétrons secundários e raios X.

Para a visualização das amostras no microscópio eletrônico de varrimento por elétrons secundários, irão ser fixados os seguintes parâmetros:

Voltagem do microscópio: 10 kV

Angulação de superfície: 0°

Distância de trabalho: 10 mm

Para a detecção microanalítica, as condições instrumentais serão as seguintes:

Voltagem do microscópio: 10 kV

Aumentos: 10000

Angulação de superfície (*tilt*): 0°

Contas por segundo (CPS) registadas pelo detetor: 500

Tempo de aquisição: 200 s

Tamanho do feixe de elétrons (*Spot size*): 6

Distância de trabalho: 10 mm

Área de análise: Punctiforme e estática

Para determinar quantitativamente o conteúdo elementar de cada célula, utiliza-se o método da razão pico fundo (método P/B) com referência a padrões de calibração de matriz orgânica, previamente conhecidos (Boekstein *et al*, 1980) (Roomans, 1988) (Statham, 1998). A concentração de cada elemento será determinada de acordo com a seguinte equação:

$$C_{\text{spc}} = C_{\text{std}} \frac{(P/B)_{\text{spc}} * Z^2/A_{\text{spc}}}{(P/B)_{\text{std}} * Z^2/A_{\text{std}}}$$

Onde:

- C_{spc} é a concentração do elemento a quantificar;
- P corresponde às contagens “netas” do sinal característico do elemento;
- B é a radiação contínua medida debaixo do pico, nomeadamente, tomada entre os mesmos níveis de energia do sinal característico;
- Z^2/A é o valor médio do número atómico ao quadrado pelo peso atómico, correspondendo a um valor específico para o dextrano e as células (Warley, 1997).

A preparação dos padrões de calibração vai ser realizada de acordo com as pautas previamente estabelecidas no laboratório utilizado (Crespo *et al.*, 1993) (López-Escámez *et al.*, 1994) utilizando diferentes sais (NaHPO_4 , MgCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e K_2SO_4) dissolvidos em matriz orgânica. Para isso, serão preparadas soluções de cada um dos sais a diferentes concentrações de dextrano a 20% (300 kD). Os padrões serão montados sobre as membranas microporosas das unidades *Millicell*® e serão crio-fixadas mediante imersão em azoto líquido. Nesta fase do processo, assim como na posterior criodissecação, montagem e recobrimento, será seguido o mesmo procedimento exposto para a preparação de células humanas para microanálise. Os padrões serão analisados no microscópio eletrônico de varrimento e serão microanalisadas imediatamente após a sua preparação para evitar a sua contaminação ou modificação química, adquirindo-se entre 15 e 20 espectros de cada concentração padrão, utilizando as mesmas condições de análise que se utilizarão para as células cultivadas sobre a grade de ouro.

A análise dos padrões de dextrano a 20% contendo concentrações conhecidas de Na, Cl, Mg, P, S, K e Ca irá permitir a realização da calibração das concentrações dos elementos referidos perante o sinal P/B. A concentração de cada elemento *standard* é diretamente proporcional à razão P/B de acordo com a seguinte fórmula:

$$C_{ts} = K * (P_{std}/B_{std})$$

Na qual:

- C_{ts} é a concentração do elemento na solução padrão, a qual é conhecida;
- (P_{std}/B_{std}) é a razão P/B, que se medido entre o mesma classificação de energia do sinal característico obtido da análise dos *standard*;
- K é a constante de calibração característica para cada elemento e configuração experimental utilizada.

A relação (P_{std}/B_{std}) para a concentração de cada elemento será estudada mediante regressão linear simples.

Uma vez que a constante de calibração K depende da diferença do Z^2/A (fator G) entre o *standard* e a célula, no trabalho a realizar utilizar-se-à a seguinte equação para quantificar a influência do referido fator no ajuste da curva:

$$Y = (P_{std}/B_{std}) * (Z^2/A)_{std}$$

Na qual Z^2/A é a média do valor de Z^2/A para todos os elementos presentes no volume analisado de solução *standard*:

$$Z^2/A = \sum (f_i * Z_i^2 / A_i)$$

Onde:

- Z_i é o número atômico do elemento i
- A_i é o peso atômico do referido elemento i
- f_i é a fração de massa do elemento i e é expressa como massa elementar/massa total (Hall *et al.*, 1984)

4.5.2 – Determinação da Expressão Génica Global mediante Microarrays

Para a análise da expressão génica global mediante *microarrays*, irá ser utilizado o sistema comercial RNAeasy da casa comercial QIAgen (referência 74204) para a extração de RNA total das amostras a analisar. Uma vez extraído o RNA, este será quantificado mediante espectrofotometria e irá ser avaliada a sua qualidade mediante eletroforese e observação no gel de agarose sob condições desnaturalizantes.

Para realizar a análise mediante *Microarrays* de oligonucleótidos, serão marcados 10 mcg de RNA total com um pigmento fluorescente e serão hibridinizados num sistema de *microarray* humano *Affymetrix Genechip Human Genome U133 plus SetTM*, o qual inclui mais de 50.000 provas génicas humanas, incluindo todos os genes e sequências génicas expressadas (EST). Deste modo, pode ser quantificada a expressão de praticamente todos os genes ou sequências expressadas pela célula humana.

Em primeiro lugar, todos os RNA são transformados em DNAC mediante *transcriptase inversa* (*Superscript II*, *Life Technologies, Inc.*, *Carlsbad, California*, EUA) com um oligonucleótido rico em caudas de timina (T7-polyT primer), o qual permite a amplificação de qualquer RNA mensageiro presente na célula. Depois são sintetizados os RNAC correspondentes a todos os DNAC mediante transcrição *in vitro*, utilizando UTP e CTP marcados com biotina (*Enzo Diagnostics, Farmingdale*, Nova Iorque, EUA). Uma vez sintetizados e para favorecer a hibridação, estes RNAC são fragmentados quimicamente acrescentando uma concentração elevada de sais a altas temperaturas. Por fim, os RNAC marcados e fragmentados hibridam com os *chips* que constituem o sistema de *microarray*.

Para a análise dos dados, serão calculadas as médias da expressão génica para cada grupo de amostras e serão determinados os valores de expressão diferencial entre os grupos a comparar (*Fold-Changes* ou *FC*).

4.6 – INSTRUMENTOS DE RECOLHA DE DADOS

Os dados serão recolhidos, registados e analisados através de base de dados construída no programa *Statistical Package for the Social Sciences* SPSS 17.0

4.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo projetado ir-se-ão comparar os conteúdos intracelulares de sódio, magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio e cálcio entre os grupos de amostras em estudo. O mesmo se fará para a análise dos dados de expressão génica determinados mediante *microarrays*.

4.7.1 – Determinação da Viabilidade Celular mediante Microanálise

Para identificar as diferenças globais entre a viabilidade das amostras de pele sujeitas a aplicação de *patch* de lidocaína a 5% durante períodos diferentes (12, 24 ou 48 horas) vai ser utilizado o teste estatístico de *Kruskal-Wallis*. A obtenção de valores significativos neste teste indicará a existência de diferenças globais de citotoxicidade cutânea de acordo com o tempo de aplicação do *patch*. Para a comparação das concentrações intracelulares médias de cada elemento analisado entre os grupos de amostras vai ser utilizado o teste paramétrico U de *Mann-Whitney*.

Os testes estatísticos terão um valor significativo para valores de $p < 0,05$.

A aplicação dos testes estatísticos será efetuada no programa *Statistical Package for the Social Sciences* SPSS 17.0

4.7.2 – Determinação da Expressão Génica mediante Microarrays

Após efetuada a análise das amostras, ir-se-à calcular a média e o desvio padrão para cada gene e para cada amostra celular analisada neste trabalho de investigação. Irão ser selecionados os genes/EST cuja expressão média seja superior a 1000 unidades fluorescentes (f.u.) de *Affymetrix* em cada tipo celular, considerando que esta expressão corresponde a genes/EST altamente expressados. Para determinar as funções génicas que se encontram sobrerrepresentadas no conjunto de genes/EST selecionados em cada tipo celular, ou seja, funções que aparecem em maior número do que o esperado, irão ser utilizados programas informáticos *BINGO*® e *Cytoscape*® (Boyer *et al.*, 2006). Estes irão indentificar as funções génicas que se expressam abundantemente no conjunto de genes/EST selecionados, calculando um valor estatístico p de acordo com uma distribuição hipergeométrica. O valor p calculado indica a possibilidade deste enriquecimento génico funcional se dever à aleatoriedade.

Para a identificação dos genes/EST significativamente mais expressados num dos grupos celulares a comparar, ir-se-à utilizar o teste estatístico t de *Student*. Serão considerados significativos os genes/EST com $p < 0,01$ e cuja expressão média relativa ao *Fold Change* (FC) seja superior a 2 ou inferior a 0,5. Desta forma, apenas os genes/EST cuja expressão seja, pelo menos, o dobro, num dos grupos amostrais, relativamente a outro estudados, serão considerados.

4.8 – CRONOGRAMA

	2011				2012										2013-2016
ATIVIDADES	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Out	Nov	Dez	A definir
<i>Reunião de orientação</i>															
<i>Participação em eventos científicos</i>															
<i>Redação do enquadramento teórico</i>															
<i>Formulação da metodologia</i>															
<i>Conclusão</i>															
<i>Esboço final do relatório de investigação</i>															
<i>Redação definitiva do relatório de investigação</i>															
<i>Entrega do relatório de investigação</i>															
<i>Projeto a 3º Ciclos de Formação PG</i>															
<i>Recolha de dados</i>															
<i>Análise de dados</i>															
<i>Interpretação dos resultados</i>															
<i>Conclusão</i>															
<i>Esboço final do Tese</i>															

Tabela 11 – Cronograma de Projeto

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 – DISCUSSÃO DE RESULTADOS ESPERADOS E ABORDAGEM FUTURA

Tendo em conta os efeitos secundários cutâneos descritos para o *patch* de lidocaína a 5%, é esperado que este trabalho possa concluir que esses mesmos efeitos são devidos à citotoxicidade e diminuição da viabilidade das células do equivalente de pele humana, obtido por engenharia tecidual.

De facto, será esperado que o aumento do tempo de exposição ao fármaco aumente o nível de citotoxicidade celular, quer dos fibroblastos quer dos queratinócitos em cultura. No que diz respeito ao equivalente de pele humana obtido por engenharia tecidual, atendendo à sua organização estrutural, pode ser expectável que o grau de citotoxicidade seja mais intenso e mais rapidamente incrementado nos queratinócitos, já que compõem a camada mais externa da pele.

O desenvolvimento do presente projeto de investigação visa o seguimento do cronograma de trabalhos supracitado em secção anterior, em 3º ciclo de formação pós-graduada

5.2 – CONCLUSÕES

O presente projeto de investigação aplica técnicas da área da biotecnologia com o objetivo de resolver problemas clínicos pertinentes, através de uma área recente da medicina chamada Engenharia Tecidual. O desenvolvimento futuro deste projeto pode colmatar a lacuna encontrada no que diz respeito ao estudo dos efeitos secundários do *patch* de lidocaína a 5% aplicado na dor neuropática da nevralgia pós-herpética. A aplicação da engenharia tecidual, com a construção de um tecido biológico artificial equivalente à pele humana, permite fazer o estudo da citotoxicidade deste fármaco, contornando os limites éticos próprios da experimentação humana ou animal. A compreensão do mecanismo subjacente às alterações cutâneas provocadas pelo *patch* de lidocaína a 5% permitirá, num futuro próximo, corroborar o seu uso seguro, em posologias minimamente inócuas e cujo benefício ultrapasse

positivamente os riscos e consequências do seu uso. Este conhecimento terá uma enorme aplicabilidade no âmbito dos Cuidados Paliativos, onde, como já vimos, é frequente a dor neuropática por NPH, e onde é ainda mais imperativo o conhecimento e aplicação na prática clínica do balanço custo-benefício de cada fármaco ou atitude terapêutica. Embora este trabalho possa ser enquadrado num nível de investigação experimental básico, os seus resultados poderão ser de extrema pertinência para a prática clínica concreta e racional de uma das áreas de investigação no âmbito dos Cuidados Paliativos – a Dor. De facto, apenas o conhecimento fundamentado em estudos científicos multidisciplinares permitirá a melhoria da prática de controlo da dor nos doentes paliativos, nomeadamente, na dor neuropática, tantas vezes, resistente a vários tipos de tratamentos. O objetivo último será, então, a melhoria da qualidade de vida dos doentes com dor neuropática por NPH, em contexto de Cuidados Paliativos, garantindo a segurança e o princípio da não maleficência destes indivíduos.

Texto escrito conforme o Acordo Ortográfico.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, *et al.* 1985. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol*, 248(1Pt1), C154-164.
- Alaminos M, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, *et al.* 2007. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 350-359.
- Alonso J, Ferrer M, Gandek B, *et al.* 2004. Health-related quality of life associated with chronic conditions in eight countries: results from the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *Qual Life Res*, 13(2), 283-298.
- Alves MI. 2009. Compreender a dor neuropática crónica – revisão bibliográfica. Tese de Mestrado. ICBAS - Universidade do Porto, Porto.
- Argoff CE, Galer BS, Jensen MP, *et al.* 2004. Effectiveness of the lidocaine patch 5% on pain qualities in three chronic pain states: assessment with the Neuropathic Pain Scale. *Curr Med Res Opin*, 20(Suppl 2), S21-28.
- Argoff CE. 2011. Review of current guidelines on the care of postherpetic neuralgia. *Posgrad Med*, 123(5), 134-142.
- Attal N, Cruccu G, Baron R, *et al.* 2010. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol*, 17(9), 1113-1188.
- Attal N, Cruccu G, Haanpa M, *et al.* 2006. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol*, 13, 1153–1169.
- Ávalos MV. 2009. Evaluación de la Viabilidad y Caracterización genética de células endoteliales transdiferenciadas a partir de células madre de la gelatina de Wharton. Tese de Doutoramento. Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada. 2009. Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR 3861-2009. ISBN: 978-84-692-7849-9
- Backonja M. 2007. High concentration capsaicin for treatment of PHN and HIV neuropathy pain. *Eur J Pain*, 11(1), S40.

- Badiavas E, Mehta PP, Falanga V. 1996. Retrovirally mediated gene transfer in a skin equivalent model of chronic wounds. *J Dermatol Sci*, 13, 56-62.
- Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins.
- Barkin RL, Barkin SJ, Irving GA, *et al.* 2011. Management of chronic noncancer pain in depressed patients. *Postgrad Med*, 123(5), 143-154.
- Baron R, Haendler G, Schulte H. 1997. Afferent large fiber polyneuropathy predicts development of postherpetic neuralgia. *Pain*, 73, 231–238.
- Baron R, Mayoral V, Leijon G, *et al.* 2009(a). Efficacy and safety of combination therapy with 5% lidocaine medicated plaster and pregabalin in post-herpetic neuralgia and diabetic polyneuropathy. *Curr Med Res Opin*, 25(7), 1677-1687.
- Baron R, Mayoral V, Leijon G, *et al.* 2009(b). Efficacy and safety of 5% lidocaine (lignocaine) medicated plaster in comparison with pregabalin in patients with postherpetic neuralgia and diabetic polyneuropathy: interim analysis from an open-label, two-stage adaptive, randomized, controlled trial. *Clin Drug Investig*, 29(4), 231-241.
- Baron R, Saguer M. 1995. Mechanical allodynia in postherpetic neuralgia: evidence for central mechanisms depending on nociceptive C-fiber degeneration. *Neurology*, 45(Suppl 8), S63–S65.
- Baron R, Saguer M. 1993. Postherpetic neuralgia. Are C-nociceptors involved in signaling and maintenance of tactile allodynia? *Brain*, 116, 1477–1496.
- Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, *et al.* 1981. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211, 1052-1054.
- Bell E, Parenteau N, Nolte GC, *et al.* 1991(b). The living skin equivalent: Its manufacture, its organotypic properties and its responses to irritants. *Toxicol in Vitro*, 5(5-6), 591-596.
- Bell E, Rosenberg M, Kemp P, *et al.* 1991(a). Recipes for reconstituting skin. *J Biomech Eng*, 113, 113-119.

- Bennett MI, Simpson KH. 2004. Gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Palliat Med*, 18, 5–11.
- Berger A, Sadosky A, Dukes E, *et al.* 2012. Clinical characteristics and patterns of healthcare utilization in patients with painful neuropathic disorders in UK general practice: a retrospective cohort study. *BMC Neurol*, 12, 8.
- Binder A, Bruxelle J, Rogers P, *et al.* 2009. Topical 5% lidocaine (lignocaine) medicated plaster treatment for post-herpetic neuralgia: results of a double-blind, placebo controlled, multinational efficacy and safety trial. *Clin Drug Investig*, 29(6), 393-408.
- Boekestein A, Stols AL, Stadhouders AM. 1980. Quantitation in X ray microanalysis of biological bulk specimens. *Scan Electron Microsc*, Pt 2, 321-334.
- Borgmann S, Granitzer M, Crabbé J, *et al.* 1994. Electron microprobe analysis of electrolytes in whole cultured epithelial cells. *Scanning Microsc Suppl*, 8, 139-147.
- Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, *et al.* 2008. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136 (3), 380-387.
- Boureau F, Legallicier P, Kabir-Ahmadi M. 2003. Tramadol in post-herpetic neuralgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*, 104(1–2), 323–331.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, *et al.* 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, 441(7091), 349-353.
- Bradley N, Davis L, Chow E. 2005. Symptom distress in patients attending an outpatient palliative radiotherapy clinic. *J Pain Symptom Manage*, 30(2), 123–131.
- Brennan F, Carr DB, Cousins M. 2007. Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg*, 105(1), 205-221.
- Brisson M, Edmunds WJ, Law B, *et al.* 2001. Epidemiology of varicella zoster virus infection in Canada and United Kingdom. *Epidemiol Infect*, 127, 305-307.
- Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, *et al.* 2001. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res*, 236, 270-283.

- Brogan SE. 2010 Interventional pain therapies. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.605-617.
- Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, *et al.* 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 194, 413-428.
- Campbell BJ, Rowbotham M, Davies PS, *et al.* 2002. Systemic absorption of topical lidocaine in normal volunteers, patients with post-herpetic neuralgia, and patients with acute herpes zoster. *J Pharm Sci*, 91(5), 1343-1350.
- Campos A. 2004. *Cuerpo, histología y medicina: de la descripción microscópica de la ingeniería tisular*. Instituto de Espana Real Academia Nacional de Medicina, Madrid.
- Caraceni A, Portenoy RK. 1999. An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. IASP Task Force on Cancer Pain. International Association for the Study of Pain. *Pain*, 82(3), 263–274.
- Cassel EJ. 1982. The nature of suffering and the goals of medicine. *N Engl J Med*, 306, 639–645.
- Cebrián-Cuenca AM, Díez-Domingo J, Rodríguez MSM, *et al.* 2010. Epidemiology of herpes zoster infection among patients treated in primary care centres in the Valencian community (Spain). *BMC Fam Pract*, 11, 33.
- Chidiac C, Bruxelles J, Daures JP, *et al.* 2001. Characteristics of patients with herpes zoster on presentation to practitioners in France. *Clin Infect Dis*, 33(1), 62-69
- Chu EA, Byrne PJ, Odland RM, *et al.* [s.d.]. *Skin Flap Physiology and Wound Healing*, [Em linha] p.1064-1079. Disponível em www.mdconsult.com [Consult. 28 abril 2012].
- Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. 2007. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*, 127(5), 1018–1029.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1-32.

- Crespo PV, López-Escámez JA, Canizarez FJ, *et al.* 1993. X-ray microanalytical determination of P, S, and K concentrations in the gelatinuos membrana of utricle. *Acta Otolaryngol*, 113(2), 176-180.
- Cruciani RA, Nieto NJ. 2006. Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 5, 312-327.
- Dakin H, Nuijten M, Liedgens H, *et al.* 2007. Cost-effectiveness of a lidocaine 5% medicated plaster relative to gabapentin for postherpetic neuralgia in the United Kingdom. *Clin Ther*, 29(7), 1491-1507.
- Davies PS, Galer BS. 2004. Review of lidocaine patch 5% studies in the treatment of postherpetic neuralgia. *Drugs*, 64(9), 937–947.
- De Barutell C. 2002. Dolor oncológico. En *Tratamiento del Dolor, teoria y práctica*, 2ª ed, Barcelona, Publicaciones Permanyer.
- DGS nº 015/2010. Orientações técnicas sobre o controlo da dor crónica na pessoa idosa. Ministério da Saúde, 14/12/2010.
- DGS nº 043/2011. Norma de Orientação - Terapêutica da Dor Neuropática. Ministério da Saúde, de 23/12/2011.
- Dieckmann C, Renner R, Milkova L, *et al.* 2010. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Exp Dermatol*, 19(8), 697–706.
- Dubinsky RM, Kabbani H, El-Chami Z, *et al.* 2004. Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice parameter: treatment of postherpetic neuralgia: an evidence-based report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 63(6), 959-965.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, *et al.* 2003. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*, 60(11), 1524–1534.

- Dworkin RH, Boon RJ, Griffin DR, *et al.* 1998. Postherpetic neuralgia: impact of famciclovir, age, rash severity, and acute pain in herpes zoster patients. *J Infect Dis*, 178(Suppl1), S76–S80.
- Dworkin RH, Gnann JW, Oaklander AL, *et al.* 2008. Diagnosis and assessment of pain associated with herpes zoster and postherpetic neuralgia. *J Pain*, 9(Suppl1), S37-S44.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J *et al.* 2010. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, 85(3), S3-S14.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, *et al.* 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, 132(3), 237-251.
- Dworkin RH, Perkins FM, Nagasako EM. 2000. Prospects for the prevention of postherpetic neuralgia in herpes zoster patients. *Clin J Pain*, 16(Suppl2), S90–S100.
- Dworkin RH, Portenoy RK. 1994. Proposed classification of herpes zoster pain. *Lancet*, 343(8913), 1648.
- Dworkin RH, Schmader KE. 2001. The epidemiology and natural history of herpes zoster and postherpetic neuralgia. In: Watson CP, Gershon AA. *Herpes zoster and postherpetic neuralgia*. 2nd revised and enlarged edition, New York, Elsevier Press, p. 39–64.
- Eaglstein WH, Falanga V. 1997. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther*, 19(5), 894-905.
- Egles C, Garlick JA, Shamis Y. 2010. Three-Dimensional Human Tissue Models of Wounded Skin. *Methods Mol Biol*, 585, 345-359.
- Ehrenreich M, Ruszczak Z. 2006. Update on dermal substitutes. *Acta Dermatovenerol Croat*, 14(3), 172-187.
- Eisenberg E, McNicol ED, Carr DB. 2006. Efficacy of mu–opioid agonists in the treatment of evoked neuropathic pain: systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Pain*, 10(8), 667–676.

- Eisenberg E, Peterson D 2010. Neuropathic pain pharmacotherapy. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.1194-1207.
- Epstein JB, Schubert MM, Bhama PK *et al.* 2010 Pain caused by cancer of the head and neck and oral mucositis. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.618-628.
- Fields HL, Rowbotham M, Baron R. 1998. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis*, 5, 209–227.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, *et al.* 2005. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain*, 118(3), 289–305.
- Fitzgibbon DR 2010(a) Cancer Pain. Principles of management and pharmacotherapy. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.559-582.
- Fitzgibbon DR 2010(b) Mechanisms, assessment, and diagnosis of Pain due to Cancer. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.582-604.
- Fleming JA, O'Connor BD. 2009. Use of lidocaine patches for neuropathic pain in a comprehensive cancer centre. *Pain Res Manag*, 14(5), 381–388.
- Fodor WL. 2003. Tissue Engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:102.
- Foley KM 2005. Management of cancer pain. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology*. 7th ed, NewYork, Lippincott Williams and Wilkins, p.2615–2649.
- Foley KM. 1979. Pain syndromes in patients wit cancer. *Adv Pain Res Ther*, 2, 59-75.
- Frampton JE, Foster RH. 2005. Pregabalin in the treatment of postherpetic neuralgia. *Drugs*, 65, 111–118.

- Freynhagen R, Strojek K, Griesing T, *et al.* 2005. Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible and fixed-dose regimens. *Pain*, 115, 254–263.
- Galer BS, Jensen MP, Ma T, *et al.* 2002. The lidocaine patch 5% effectively treats all neuropathic pain qualities: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled, 3-week efficacy study with use of the neuropathic pain scale. *Clin J Pain*, 18(5), 297-301.
- Galer BS, Rowbotham MC, Perander J, *et al.* 1999. Topical lidocaine patch relieves postherpetic neuralgia more effectively than a vehicle topical patch: results of an enriched enrollment study. *Pain*, 80, 533–538.
- Galluzi L, Aaronson SA, Abrams J, *et al.* 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16(8), 1093-1107.
- Galvez R, Rejas J, Pérez M, *et al.* 2005. Prevalencia del dolor neuropático en Espana: implicaciones clínicas, laborales y asistenciales. *Med Clin (Barc)*, 125(6), 221-229.
- Gammaitoni, AR, Alvarez, NA, *et al.* 2003. Safety and tolerability of the lidocaine patch 5%, a targeted peripheral analgesic: a review of the literature. *Clin Pharmacol*, 43(43), 111-117.
- Garnock-Jones KP, Keating GM. Lidocaine 5% medicated plaster: a review of its use in postherpetic neuralgia. *Drugs* 2009;69(15):2149-2165
- Garroway N, Chhabra S, Landis S, *et al.* 2009. What measures relieve postherpetic neuralgia? *J Fam Pract*, 58(7), 384d-384f.
- Gauthier A, Breuer J, Carrington D, *et al.* 2009. Epidemiology and cost of herpes zoster and post-herpetic neuralgia in the United Kingdom. *Epidemiol Infect*, 137, 38–47.
- Gay R, Swiderek M, Nelson D, *et al.* 1992. The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicol In Vitro*, 6(4), 303-315.
- George RJ, Jennings AL. 1993. Reviews in Medicine. Palliative medicine. *Postgrad Med J*, 69, 429-449.
- Gilron I, Bailey JM, Tu D, *et al.* 2005. Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *N Engl J Med*, 352(13), 1324–1334.

- Gimbel JS, Richards P, Portenoy RK. 2003. Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology*, 60(6), 927–934.
- Glover J, Dibble SL, Dodd MJ, *et al.* 1995. Mood states of oncology outpatients: does pain make a difference? *J Pain Symptom Manage*, 10(2), 120–128.
- Gnann JW Jr, Whitley RJ. 2002. Clinical practice: herpes zoster. *N Engl J Med*, 347, 340–346
- Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ, *et al.* 2005. Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. *Pain*, 116(1–2), 109–118.
- Gonçalves, F. 1998. Cuidados paliativos em oncologia. *Arquivos de Medicina*, 12(3), 170-173.
- Grond S, Zech D, Diefenbach C, *et al.* 1996. Assessment of cancer pain: a prospective evaluation in 2266 cancer patients referred to a pain service. *Pain*, 64(1), 107–114.
- Habif TP 2009. *Clinical Dermatology*, 5th ed. [em linha] Philadelphia, Mosby Elsevier. Disponível em www.mdconsult.com [Consult. 28 abril 2012]
- Hagen NA 2010. Epidemiology, prevalence, and cancer pain syndromes. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4^a Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.537-558.
- Hall TA, Gupta BL. 1984. The application of EDXS to the biological sciences. *J Microsc*, 136(Pt2), 193-208.
- Hammack JE, Michalak JC, Loprinzi CL, *et al.* 2002. Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Pain*, 98(1–2), 195–203.
- Hans G, Sabatowski R, Binder A, *et al.* 2009. Efficacy and tolerability of a 5% lidocaine medicated plaster for the topical treatment of post-herpetic neuralgia: results of a long-term study. *Curr Med Res Opin*, 25(5), 1295-305.

- Hansbrough JF, Boyce ST, Cooper ML, *et al.* 1989. Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen glycosaminoglycan substrate. *JAMA*, 262, 2125-2130.
- Harati Y, Gooch C, Swenson M, *et al.* 1998. Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. *Neurology*, 50(6), 1842–1846.
- Head H, Campbell AW. 1997. The pathology of herpes zoster and its bearing on sensory localization. *Rev Med Virol*, 7(3), 131–143.
- Heimbach DM, Warden GD, Luterman A, *et al.* 2003. Multicenter post approval clinical trial of Integra derma regeneration template for burn treatment. *J Burn Care Rehabil*, 24, 42-48.
- Hempenstall K, Nurmikko TJ, Johnson RW, *et al.* 2005. Analgesic therapy in postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. *PLoS Med*, 2(7), e164.
- Hernández N, Hernández J, Moreno C. 2009. Uso de los parches de lidocaína en el alivio del dolor neuropático localizado. *Ver. Iberoamericana del Dolor*, 1(4), 15-28.
- Hiendleder S, Bauersachs S, Boulesteix A *et al.* 2005. Functional genomics: tools for improving farm animal health and welfare. *Revue Scientifique Et Technique (International Office Of Epizootics)*, 24(1), 354-377.
- Huang YC, Wang TW, Sun JS, *et al.* 2005. Epidermal morphogenesis in an in-vitro model using a fibroblasts-embedded collagen scaffold. *J Biomed Sci*, 12(6), 855-867.
- Huse E, Larbig W, Flor H, *et al.* 2001. The effect of opioids on phantom limb pain and cortical reorganization. *Pain*, 90(1–2), 47–55.
- Hwang SS, Chang VT, Cogswell J, *et al.* 2004. Study of unmet needs in symptomatic veterans with advanced cancer: incidence, independent predictors and unmet needs outcome model. *J Pain Symptom Manage*, 28(5), 421–432
- Infarmed 2010. Folheto Informativo: Informação para Utilizadores. Vessatis 5% emplastro medicamentoso, 25-03-2010.
- Insinga RP, Itzler RF, Pellissier JM, *et al.* 2005. The incidence of herpes zoster in a United States administrative database. *J Gen Intern Med*, 20(8), 748–753.

- IASP - International Association for the Study of Pain. 1994. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, 2nd Ed., Elsevier, ISBN-13:978-0-931092-05-3
- IASP - International Association for the Study of Pain. 2012. Identification and treatment of neuropathic pain in patients with cancer. Pain Clinical Updates, XX(2), 1-5.
- IASP - International Association for the Study of Pain. 2012. Pain terminology [em linha] Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Home&template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=4697#Pain>. [Consult. 11 junho de 2012]
- IASP – International Association for the Study of Pain. 2010. Pharmacological management of neuropathic pain. Pain Clinical Updates, XVIII(9), 1-8.
- IASP - International Association for the Study of Pain. 2008. Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndroms and definitions os pain terms. Pain, Suppl 3, S1-S226.
- Jackson JL, Gibbons R, Meyer G, *et al.* 1997. The effect of treating herpes zoster with oral acyclovir in preventing postherpetic neuralgia: a meta-analysis. Arch Intern Med, 157, 909–912.
- Johnson EW, Meunier SF, Roy CJ, *et al.* 1992. Serial cultivation of normal keratinocytes: a defined system for studying the regulation of growth and differentiation. In Vitro Cell Dev Bio, 28A, 429-435.
- Jorge LL, Feres CC, Teles VE. 2010. Topical preparations for pain relief: efficacy and patient adherence. J Pain Res, 4, 11–24.
- Jung BF, Johnson RW, Griffin DR, *et al.* 2004. Risk factors for postherpetic neuralgia in patients with herpes zoster. Neurology, 62, 1545–1551.
- Khaliq W, Alam S, Puri N. 2007. Topical lidocaine for the treatment of postherpetic neuralgia. Cochrane Database Syst Rev, 2:CD004846.
- Lam PK, Chan ES, To EW, *et al.* 1999. Development and evaluation of a new composite Laserskin graft. J Trauma, 47(5), 918–922.

- Langley PC. 2011. The prevalence, correlation and treatment of pain in the European Union. *Curr Med Res Opin*, 27(2), 463-480.
- Lazar AJF, Murphy GF. 2009. The skin: more than a mechanical barrier. In Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th ed, Saunders.
- Lechene C. 1988. Eletron probe analysis of transport properties of cultured cells. In: K. Zierold, H. K. Hagler. *Electron Microanalysis. Applications in Biology and Medicine*, Heidelberg, Springer.
- Lee DY, Lee JH, Yang JM, Lee ES, Park KH, Mun GH. 2006. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. *J Dermatol Sci*, 43(2), 95-104.
- Lee KH. 2000. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. *Yonsei Med J*, 41(6), 774-779.
- Leipzig R, Cumming R, Tinetti M. 1999. Drugs and falls in older people: a systematic review and meta-analysis. I: psychotropic drugs. *J Am Geriatr Soc*, 47, 30–39.
- Llames SG, Del Rio M, Larcher F, *et al.* 2004. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*, 77(3), 350-355.
- López-Escámez JA, Campos A. 1994. Standards for X-ray microanalysis of calcified structures. *Scanning Microsc Suppl*, 8, 171-185.
- Lunn MPT, Hughes RAC, Wiffen PJ. 2009. Duloxetine for treating painful neuropathy or chronic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 4, Art. No.: CD007115. DOI: 10.1002/14651858.CD007115.pub2
- Lynch ME, Watson PN. 2006. The pharmacotherapy of chronic pain: a review. *Pain Res Manage*, 11(1), 11-38.
- Matgorzata MM. 2011. Postherpetic neuralgia (PHN). *Adv Pall Med*, 10(3-4), 95-104.
- Mathew P, Elting L, Cooksley C, *et al.* 2005. Cancer in an incarcerated population. *Cancer*, 104(10), 2197–2204.

- Meier T, Wasner G, Faust M, *et al.* 2003. Efficacy of lidocaine patch 5% in the treatment of focal peripheral neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Pain*, 106(1–2), 151–158.
- Mercadante S, Arcuri E, Tirelli W, *et al.* 2002. Amitriptyline in neuropathic cancer pain in patients on morphine therapy: a randomized placebo-controlled, double-blind crossover study. *Tumori*, 88(3), 239–242.
- Miranda JP, Leonella J, Rodrigo O, *et al.* 2009. Dosis de gabapentoides en manejo del dolor neuropático en pacientes de la unidad de dolor y cuidados paliativos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. *Revista El Dolor*, 51, 10-16.
- Moore RA, Straube S, Wiffen PJ, *et al.* 2009. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, Issue 3, Art. No.: CD007076. DOI: 10.1002/14651858.CD007076.pub2
- Morelli JG. 2011. Morphology of the skin. In Kliegman: *Nelson Textbook of Pediatrics*, 19th ed., [s.l.] Saunders, p.2215e1-e2.
- Morley JS, Bridson J, Nash TP, *et al.* 2003. Low dose methadone has an analgesic effect in neuropathic pain: a double-blind randomized controlled crossover trial. *Palliat Med*, 17(7), 576–587.
- Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, *et al.* 2007. Pharmacological management of chronic neuropathic pain – consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag*, 12(1), 13–21.
- Mounsey AL, Matthew LG, Slawsow DC. 2005. Herpes zoster and postherpetic neuralgia: prevention and management. *Am Fam Physician*, 72(6), 1075-1082.
- Muhart M, McFalls S, Kirsner R, *et al.* 1997. Bioengineered skin. *Lancet*, 350(9085), 1142.
- Nalamachu S, Crockett RS, Gammaitoni AR, *et al.* 2006. A comparison of the lidocaine patch 5% vs naproxen 500 mg twice daily for the relief of pain associated with carpal tunnel syndrome: a 6-week, randomized, parallel-group study. *Med Gen Med*, 8(3), 33.

- NICE – National Institute for Health and Clinical Excellence 2010. Neuropathic Pain. The pharmacological management of neuropathic pain in adults in non-specialists settings. NICE Clinical Guidelines, Nº 96, London, Disponível em PMID: 22319807
- Norris D. 2011. Structure and Function of the Skin. In Goldman: Glodman's Cecil Medicine, 24th ed., [s.l.], Saunders, p2498-2503
- O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel, *et al.* 1981. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1. 75-78.
- Oaklander AL, Romans K, Horasek S, *et al.* 1998. Unilateral postherpetic neuralgia is associated with bilateral sensory neuron damage. *Ann Neurol*, 44, 789–795.
- Opstelten W, Van Essen GA, Schellevis F, *et al.* 2006. Gender as an independent risk factor for herpes zoster: a population-based prospective study. *Ann Epidemiol*, 16(9), 692–695.
- Opstelten W, Mauritz JW, de Wit NJ *et al.* 2002. Herpes zoster and postherpetic neuralgia: incidence and risk indicators using general practice research database. *Fam Pract*, 19(5), 471-475.
- Parenteau NL, Bilbo P, Nolte CJM, *et al.* 1992. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology*, 9(1-3), 163-171.
- Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo PR, *et al.* 1991. Epidermis generated in vitro: Practical considerations and applications. *J Cell Biochem*, 45(3), 245-251.
- Parenteau NL. 1994. Skin equivalents. In Leigh I, Watt F. *Keratinocyte Methods*, London, Cambridge University Press, p.45-55.
- Pergolizzi J, Ahlbeck K, Aldington D, *et al.* 2012. Defining chronic pain: should we change? *Curr Med Res Opin*, 28(2), 249-256.
- Peterson KL, Fields HL, Brennum J, *et al.* 2000. Capsaicin-evoked pain and allodynia in postherpetic neuralgia. *Pain*, 88(2), 125–133.
- Pham C, Greenwood J, Cleland H, *et al.* 2007. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns*, 33(8), 946-957.

- Plaghki L, Adriaensen H, Morlion B, *et al.* 2004. Systematic overview of the pharmacological management of postherpetic neuralgia: an evaluation of the clinical value of critically selected drug treatments based on efficacy and safety outcomes from randomized controlled studies. *Dermatology*, 208(3), 206–216.
- Plested M, Budhia S, Gabriel Z. 2010. Pregabalin, the lidocain plaster and duloxetine in patients with refractory neuropathic pain: a systematic review. *BMC Neurol*, 10, 116.
- Pruitt BA, Levine NS. 1984. Characteristics and uses of biologic dressing and skin substitutes. *Arch Surg*, 119, 312-322.
- Raja SN, Haythornthwaite JA, Pappagallo M, *et al.* 2002. Opioids versus antidepressants in post herpetic neuralgia: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology*, 59(7), 1015–1021.
- Rao RD, Michalak JC, Sloan JA, *et al.* 2007. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossovertrial (N00C3). *Cancer*, 110(9), 2110–2118.
- Raskin J, Pritchett YL, Wang F, *et al.* 2005. A double-blind, randomized multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain Med*, 6(5), 346–356.
- Raskin J, Smith TR, Wong K, *et al.* 2006. Duloxetine versus routine care in the long-term management of diabetic peripheral neuropathic pain. *J Palliat Med*, 9(1), 29–40.
- Rehm S, Binder A, Baron R. 2010. Post-herpetic neuralgia: 5% lidocaine medicated plaster, pregabalin, or a combination of both? A randomized, open, clinical effectiveness study. *Curr Med Res Opin*, 26(7), 1607-1619.
- Reid K, Harker J, Bala M, *et al.* 2011. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Curr Med Res Opin*, 27(2), 449-462.
- Rheinwald JG, Green H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6(3), 331–334.

- Rodríguez-Morata A, Gárzon I, Alaminos M, *et al.* 2008. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg*, 22(3), 440-448.
- Roomans GM. 1988. Introduction to X-ray microanalysis in biology. *J Electron Microsc Tech*, 9(1), 3-17.
- Rowbotham MC, Davies PS, Fields HL. 1995. Topical lidocaine gel relieves postherpetic neuralgia. *Ann Neurol*, 37(2), 246-253.
- Rowbotham MC, Davies PS, Verkempick C, *et al.* 1996. Lidocaine patch: double-blind controlled study of a new treatment of post-herpetic neuralgia. *Pain*, 65(1), 39-44.
- Rowbotham MC, Harden N, Stacey B, *et al.* 1998(b) Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *JAMA*, 280, 1837-1842.
- Rowbotham MC, Peterson KL, Fields HL. 1998 (a) Is postherpetic neuralgia more than one disorder? *Pain Forum*, 7, 231-237.
- Rowbotham MC, Reisner LA, Davies PS, *et al.* 2005. Treatment response in antidepressant-naïve postherpetic neuralgia patients: double-blind, randomized trial. *J Pain*, 6, 741-746.
- Rowbotham MC, Twilling L, Davies PS, *et al.* 2003. Oral opioid therapy for chronic peripheral and central neuropathic pain. *N Engl J Med*, 348(13), 1223-1232.
- Ryssel H, Gazyakan E, Germann G, *et al.* 2008. The use of MatriDerm in early excision and simultaneous autologous skin grafting in burns—a pilot study. *Burns*, 34(1), 93-97.
- Sabolinski ML, Alvarez O, Auletta M, *et al.* 1996. Cultured skin as a “smart material” for healing wounds: Experience in venous ulcers. *Biomaterials*, 17(3), 311-320.
- Sampathkumar P, Drage LA, Martin DP. 2009. Herpes zoster (shingles) and postherpetic neuralgia. *Mayo Clin Proc*, 84(3), 274-280.
- Schwarze H, Kuntscher M, Uhlig C *et al.* 2007. Suprathel, a new skin substitute, in the management of donor sites of split-thickness skin grafts: results of a clinical study. *Burns*, 33, 850-854.

- Simpson DM. 2001. Gabapentin and venlafaxine for the treatment of painful diabetic neuropathy. *J Clin Neuromuscul Dis*, 3, 53–62.
- Soyuncu S, Berk Y, Eken C, *et al.* 2009. Herpes zoster as a useful clinical marker of underlying cell-mediated immune disorders. *Ann Acad Med Singapore*, 38, 136-138.
- Stacey B. 2005. Management of peripheral neuropathic pain. *Am J Phys Med Rehabil*, 84(Suppl3), S4–16.
- Statham PJ. 1998. Measuring performance of energy-dispersive X-ray systems. *Microsc Microanal*, 4(6), 605-615.
- Taylor RS. 2006. Epidemiology of refractory neuropathic pain. *Pain Pract*, 6(1), 22–26.
- Thakur R, Kent JL, Dworkin RH 2010. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. In: Ballantyne J, Fithman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.338-356.
- Thevenot P, Nair A, Dey J, *et al.* 2008. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*, 14(4), 319-331.
- Torrance N, Smith BH, Bennett MI. 2006. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain*, 7(4), 281-289.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, *et al.* 2008. Redefinition of neuropathic pain and grading system for clinical use: consensus statement on clinical and research diagnostic criteria. *Neurology*, 70(18), 1630-1635.
- Tremont-Lukats IW, Challapalli V, McNicol ED, *et al.* 2005. Systemic administration of local anesthetics to relieve neuropathic pain: a systematic review and metaanalysis. *Anesth Analg*, 101(6), 1738–1749.
- Trent JF, Kirsner RS. 1998. Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent. *Int J Clin Pract*, 52(6), 408-413.
- Twycross R, Harcourt J, Bergl S. 1996. A survey of pain in patients with advanced cancer. *J Pain Symptom Manage*, 12(5), 273–282.

- Twycross RG, Fairfield S. 1982. Pain in far-advanced cancer. *Pain*, 14(3), 303–310.
- Tying SK. 2007. Management of herpes zoster and postherpetic neuralgia. *J Am Acad Dermatol*, 57(Suppl6), S136-142.
- Vainio A, Auvinen A. 1996. Prevalence of symptoms among patients with advanced cancer: an international collaborative study. Symptom Prevalence Group. *J Pain Symptom Manage*, 12(1), 3–10.
- van den Beuken – van Everdingen MH, de Rijke JM, Kessels AG, *et al.* 2007. Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. *Ann Oncol*, 18(9), 1437–1449.
- Varrasi G, Müller-Schwefe G, Pergolizzi J, *et al.* 2010. Pharmacological treatment of chronic pain – the need for change. *Curr Med Res Opin*, 26(5), 1231-1245.
- Veves A, Falanga V, Armstrong D, *et al.* 2001. Graftskin, a human skin equivalent is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 24(2), 290-295.
- Von Euler A, Wroblewski R, Roomans GM. 1992. Correction for extraneous background in X-ray microanalysis of cell cultures. *Scanning Microsc*, 6(2), 451-456.
- Walk D, Backonja MM 2010. Painful neuropathies. In: Ballantyne J, Fiddman S e Rathmell JP 2010. *Bonica's Management of Pain*. 4ª Ed. Baltimore, Lippincott William & Wilkins. ISBN 978-0-7817-6827-6, p.303-313.
- Warley A, Fernández-Segura E, López-Escámez JA, *et al.* 1994. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int*, 18(9), 915-916.
- Warley A, Skepper JN. 2000. Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *J Microsc*, 198(Pt2), 116-123.
- Warley A. 1997. X-ray microanalysis for biologists. *Practical methods in electron microscopy*, 1st ed., Cambridge, Portland Press, 1997.

- Wasner G, Kleinert A, Binder A, *et al.* 2005. Postherpetic neuralgia: topical lidocaine is effective in nociceptor-deprived skin. *J Neurol*, 252, 677–686.
- Watson C. 1989. Postherpetic neuralgia. *Neurol Clin*, 7, 231–248.
- Watson CP, Babul N. 1998(a). Efficacy of oxycodone in neuropathic pain: a randomized trial in postherpetic neuralgia. *Neurology*, 50(6), 1837–1841
- Watson CP, Deck JH, Morshead C, *et al.* 1991(b) Postherpetic neuralgia: further post-mortem studies of cases with and without pain. *Pain*, 44, 105–117.
- Watson CP, Moulin D, Watt-Watson J, *et al.* 2003. Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a randomized controlled trial in painful diabetic neuropathy. *Pain*, 105(1–2), 71–78.
- Watson CP, Vernich L, Chipman M, *et al.* 1998(b) Nortryptiline vs. amitriptyline in postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *Neurology*, 51, 1161–1171.
- Watson CP, Watt VR, Chipman M, *et al.* 1991(a). The prognosis with postherpetic neuralgia. *Pain*, 46, 195–199.
- Wernicke JF, Pritchett YL, D’Souza DN, *et al.* 2006. A randomized controlled trial of duloxetine in diabetic peripheral neuropathic pain. *Neurology*, 67(8), 1411–1420.
- Wetzig T, Gebhardt C, Simon JC. 2009. New indications for artificial collagen-elastin matrices? Covering exposed tendons. *Dermatology*, 219, 272–273.
- Whizar-Lugo VM, Ochoa-Ortíz G. 2005. Conceptos Actuales en Dolor por Cáncer Anestesia en México, 17(1), 53-69.
- Wildsmith JAW. 2011. Lidocaine: a more complex story than a “simple” chemistry suggests. In *Proceedings of the History of Anaesthesia Society*, 43, 9-16.
- Wilkins LM, Watson SR, Prosky SJ, *et al.* 1994. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol Bioeng*, 43, 747-756.
- Wilson KG, Chochinov HM, McPherson CJ, *et al.* 2007. Suffering with advanced cancer. *J Clin Oncol*, 25(13), 1691–1697.

- Wilson KG, Graham ID, Viola RA, *et al.* 2004. Structured interview assessment of symptoms and concerns in palliative care. *Can J Psychiatry*, 49(6), 350–358.
- Wolff RF, Bala MM, Westwood M, *et al.* 2010. 5% lidocaine medicated plaster in painful diabetic peripheral neuropathy (DPN): a systematic review. *Swiss Med Wkly*, 140(21-22), 297-306.
- Wong T, McGrath JA, Navsaria H. 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br Dermatol*, 156(6), 1149-1155.
- WHO - World Health Organization. Programmes and projects. Country Statistics 2012(b) [em linha], [s.l.] WHO. Disponível em: <http://www.who.int/gho/countries/prt/en> [Consult. 16 de agosto 2012]
- World Health Organization. Publications. World Health Statistics 2012(a) [em linha], [s.l.] WHO. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/EN_WHS2012_Full.pdf [Consult. 16 de agosto 2012]
- Wright KA, Nadire KB, Busto P, *et al.* 1998. Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns*, 24, 7–17.
- Wroblewski J, Roomans GM. 1984. X-ray microanalysis of single and cultured cells. *Scan Electron Microsc*, (Pt4), 1875-1882.
- Wroblewski R. 1993. Intracellular and extracellular elemental composition of the endolymphatic sac studied by X-ray microanalysis. *Scanning Microsc*, 7(4), 1221-1232.
- Yannas IV, Burke JF. 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*, 14(1), 65-81.
- Yarnitsky D, Eisenberg E. 1998. Neuropathic pain: between positive and negative ends. *Pain Forum*, 7, 241–242.
- Zaulyanov L, Kirsner RS. 2007. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging*, 2(1), 93-98.