



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FELIPE HERTZING FARIAS

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA, P2X₇ E ENZIMA COX-2
DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL NA HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA
PERIFÉRICA

PARTICIPATION OF NMDA, P2X₇ RECEPTORS AND COX-2 ENZYME OF
DORSAL ROOT GANGLIA IN PERIPHERAL INFLAMMATORY
HYPERALGESIA

CAMPINAS – SP

2018

FELIPE HERTZING FARIAS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA, P2X₇ E ENZIMA COX-2
DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA**

**PARTICIPATION OF NMDA, P2X₇ RECEPTORS AND COX-2 ENZYME OF
DORSAL ROOT GANGLIA IN PERIPHERAL INFLAMMATORY
HYPERALGESIA**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de concentração de Fisiologia.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Functional and Molecular Biology in the area of Physiology.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FELIPE HERTZING FARIAS E ORIENTADO PELO PROF. DR. CARLOS AMILCAR PARADA.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

CAMPINAS - SP

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F225p Farias, Felipe Hertzling, 1986-
Participação dos receptores NMDA, P2X₇ e enzima COX-2 do gânglio da raiz dorsal na hiperalgesia inflamatória periférica / Felipe Hertzling Farias. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gânglios espinhais. 2. Receptores de N-metil-D-aspartato. 3. Receptores purinérgicos P2X₇. 4. Ciclooxygenase 2. 5. Hiperalgesia. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Participation of NMDA, P2X₇ receptors and COX-2 enzyme of dorsal root ganglia in peripheral inflammatory hyperalgesia

Palavras-chave em inglês:

Ganglia, Spinal

Receptors, N-methyl-D-aspartate

Receptors, Purinergic P2X₇

Cyclooxygenase 2

Hyperalgesia

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Carlos Augusto Valadão

Alexandre César Santos de Rezende

André Schwambach Vieira

Data de defesa: 03-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 03/08/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Prof.(a) Dr.(a) Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

Prof. Dr. Alexandre César Santos de Rezende

Prof. Dr. André Schwambach Vieira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas**, ao **Instituto de Biologia**, ao **Departamento de Biologia Estrutural e Funcional** e à **Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular** pela estrutura e suporte concedidos para a realização desse trabalho;

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada**, agradeço pela oportunidade e confiança depositada em meu trabalho ao longo destes anos. Obrigado pela orientação, amizade, inspiração e conhecimentos divididos. Tudo isso foi muito importante para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **CAPES** pelo suporte financeiro para a realização do doutorado.

Ao **Prof. Dr. César Sartori** e à **Profa. Dra. Cláudia Tambeli** pelo apoio, sugestões e discussões científicas, fundamentais para a realização deste trabalho;

Aos membros da banca do exame de Qualificação, **Prof. Dr. André Schwambach Vieira**, **Prof. Dr. César Sartori** e **Dra. Elayne Vieira** pelas considerações, sugestões e ensinamentos;

Aos membros da banca examinadora de defesa de tese: Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Prof. Dr. Carlos Augusto Valadão, Prof. Dr. Alexandre Rezende, Prof. Dr. André Schwambach Vieira, Dra. Juliana Maia Teixeira, Prof. Dr. César Renato Sartori, Profa. Dra. Karina Velloso Braga Yazbek por aceitarem avaliar esse trabalho e por atenderem prontamente ao convite.

À **Andréia Aparecida Vigilato**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, agradeço pela ajuda, atenção e gentileza dispensada durante esses anos de convívio como aluno de pós-graduação;

Ao técnico **César Bissoto** pela incrível dedicação e cuidado com os animais, com o laboratório e com a qualidade do estudo, assim como à técnica e grande amiga **Dra. Catarine Nishijima** pela atenção, paciência e boas risadas ao longo destes anos, vocês foram indispensáveis para a concretização deste;

Ao grupo de discussões para estudos do gânglio da raiz dorsal, o qual tive o imenso prazer de coordenar ao longo dos anos. Tenham certeza de que sem vocês nossos trabalhos não teriam alcançado tal patamar, sou muito grato a todos.

Aos amigos do laboratório na Unicamp **Dionéia**, **Elayne**, **Juliana**, **Maria Athiê**, **Jozi**, **Felipe de Faria**, **Luís Manzo**, **Ivan**, **Amanda**, **Gilson**, **Gal**, **Willians**, **Silviane**, **Fernanda**,

Kauê, Kiko, Arthur, Maria Júlia, Júlia e Nathalia por compartilharem inúmeros momentos divertidos, boas conversas, boas discussões, ajuda e ótimos momentos de convívio.

Ao **Prof. Dr. Silvio Roberto Consonni**, que colaborou com muita paciência, enorme conhecimento e dedicação para o sucesso das imagens de microscopia eletrônica deste trabalho;

Ao **Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB)**, por fornecer os animais de pesquisa utilizados neste trabalho, aos quais devo eterno reconhecimento e respeito.

Muito obrigado a todos que estiveram ao meu lado durante esses cinco anos: **à minha família**, pelo apoio, mesmo à distância; **aos professores e amigos** que me acompanharam nesta jornada; **em especial minha amada esposa Taiana**, que foi meu exemplo de pessoa batalhadora e meu apoio nesta jornada, estando sempre ao meu lado independente dos obstáculos, me incentivando a nunca desistir.

RESUMO

O gânglio da raiz dorsal (GRD) tornou-se um grande foco de estudos ao longo dos últimos anos, devido ao seu papel modulatório no desenvolvimento das hiperalgesias. Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e receptores NMDA, nas células do gânglio da raiz dorsal, participam do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória no tecido periférico. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi investigar se a ativação do receptor NMDA media um crosstalk entre neurônios e células gliais satélites, e se é dependente da ativação do receptor purinérgico P2X₇ e/ou enzima COX-2. A administração ganglionar (gl.) de oligodeoxinucleotídeo antisense (ODN-AS) contra o receptor P2X₇ e enzima COX-2 preveniu a hiperalgesia induzida pela administração ganglionar do agonista do receptor NMDA. Em contraste, o tratamento com ODN-AS contra os receptores NMDA não afetou a hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de 2'(3')-O-(4-Benzoilbenzoil) adenosina 5'-trifosfato trietilamônio (BzATP) ou interleucina-1 β (IL-1 β). A histologia do GRD, realizada através de microscopia eletrônica de transmissão, mostrou um tecido diversificado, onde, há uma relação íntima entre neurônios e células satélites. Através da técnica de imunogold observou-se que as subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA e o receptor P2X₇ são expressos em neurônios e células satélites. Em conjunto, nossos achados sugerem que a hiperalgesia do tecido periférico é desencadeada pela ativação dos receptores NMDA, que ativa os receptores P2X₇, induzindo a liberação de IL-1 β que ativa a ciclooxigenase-2. A ativação da COX-2 no gânglio da raiz dorsal produz e libera prostaglandina-E₂, que sensibilizará os nociceptores aferentes primários.

PALAVRAS-CHAVE: Gânglio da raiz dorsal, receptor NMDA, receptor P2X₇, enzima COX-2, hiperalgesia inflamatória periférica.

ABSTRACT

The dorsal root ganglion (DRG) has become a major focus of several studies over the last few years mainly because of its modulatory role in hyperalgesia development. We have previously demonstrated that the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme and NMDA receptors (NMDAR), in the dorsal root ganglion cells, participate of the development of inflammatory hyperalgesia in the peripheral tissue. Thus, the aim of this study was to investigate, in male Wistar rats, whether NMDA receptor activation mediates a crosstalk between neurons and satellite glial cells, and if it is dependent on P2X purinergic receptor 7 (P2X₇) and/or COX-2 activation. Ganglionar (gl.) administration of oligodeoxynucleotide antisense (ODN-AS) against P2X₇ receptor and COX-2 enzyme prevented the hyperalgesia induced by ganglionar administration of NMDAR agonist. In contrast, the treatment with ODN-AS against NMDAR did not affect the mechanical hyperalgesia induced by ganglionar administration of 2' (3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate triethylammonium (BzATP) or interleukin-1 β (IL-1 β). The histological analysis of DRG cuts, performed through transmission electron microscopy, showed a diversified tissue and an intimate relationship between neurons and satellite cells. By the immunogold technique, followed by observation with transmission electron microscopy, we demonstrated that NMDAR NR1 and NR2B subunits and P2X₇ receptor are expressed in both neurons and satellite glial cells of DRG. Our in vitro experiments (DRG culture) indicate that the NMDA receptor inhibition interferes with the calcium influx in satellite cells induced by the P2X₇ receptor agonist. Taken together, our findings suggest the hyperalgesia is triggered by NMDAR activation, which activates P2X₇ receptors, inducing the release of IL-1 β , which activates COX-2. The activation of COX-2 in DRG cells produces and releases prostaglandin-E₂, which sensitizes primary afferent nociceptors.

KEYWORDS: dorsal root ganglion, NMDA receptor, P2X₇ receptor, COX-2 enzyme, peripheral inflammatory hyperalgesia.

LISTA DE ABREVIACÕES

A-740003 – [N-(1-{[(Cianoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide]

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BzATP – 20,30-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP – Agonista de receptor P2X₇

Ca²⁺ – Íon cálcio

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX-1 – Enzima ciclooxigenase-1

COX-2 – Enzima ciclooxigenase-2

CS – Células satélites

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – meio de cultura

EP – Receptor de prostaglandina

gl. – administração ganglionar

GRD – Gânglio da raiz dorsal

GRD-L5 – Gânglio da raiz dorsal correspondente à 5^a vertebra lombar

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidróxi-1-piperazinil)-etanosulfônico] – Tampão

IB4 – Integrina β₄

IL-1β – Interleucina-1 beta

i.pl. – Intraplantar

i.t. – Intratecal

K⁺ - Íon potássio

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

Mg²⁺ – Íon magnésio

MK801 - Dizocilpina

Na⁺ - Íon sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NMDA – N-metil-D-aspartato

ODN-AS – Oligodeoxinucleotídeo Antisense

ODN-MM – Oligodeoxinucleotídeo Mismatch

PANX-1 – Panexina-1

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PKC – Proteína quinase C

P2X₃ – Receptores purinérgicos ionotrópicos do tipo 3

P2X₇ – Receptores purinérgicos ionotrópicos do tipo 7

TRPV1 – Receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1

UTP – Uridina-5'-trifosfato

Zn²⁺ – Íon zinco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIACÕES.....	9
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Vias de Detecção e Transmissão da Informação Dolorosa	14
1.3. Gânglio da Raiz Dorsal.....	16
1.4. Receptores N-metil-D-aspartato	16
1.5. Receptores P2X ₇	18
1.6. Interleucina-1 β e enzima COX-2.....	19
1.7. Interação entre as células do GRD	20
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1. Objetivos Específicos.....	21
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	22
4.1. Histologia do GRD através de microscopia eletrônica de transmissão.....	22
4.2. Localização das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA e o receptor P2X ₇ nos corpos neuronais e células satélites do GRD	22
4.3. Participação da subunidade NR1 do receptor de NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de IL-1 β	23
4.4. Participação da enzima COX-2, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.....	23
4.5. Participação da subunidade NR1 do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de BzATP.	23
4.6. Participação do receptor P2X ₇ presente no GRD na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.....	24
4.7. Envolvimento da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. do agonista NMDA	24
4.9. Avaliação do efeito do antagonista do receptor P2X ₇ (A-740003) no influxo de Ca ²⁺ gerado pelo agonista do receptor NMDA (NMDA) nos corpos neuronais e células satélites do GRD	25
4.10. Avaliação do efeito do antagonista do receptor NMDA (MK801) no influxo de Ca ²⁺ gerado pelo agonista do receptor P2X ₇ (BzATP) nos corpos neuronais e células satélites do GRD.	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Animais.....	26
5.2. Administração de drogas pela via ganglionar	26
5.3. Administração de drogas intraplantar	27
5.5. Avaliação da hiperalgesia.....	28

5.5.1.	Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico.....	28
5.6.	<i>Western blot</i>	29
5.6.1.	Homogeneizado e extração de proteínas de gânglios das raízes dorsais	29
5.6.2.	Eletroforese e ImmunoBlot.....	29
5.7.	Isolamento dos gânglios e cultura das células primárias de neurônios e células satélites do gânglio da raiz dorsal.....	31
5.8.	Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular	31
5.9.	Microscopia eletrônica de transmissão: conservação em resina EPON	32
5.10.	Microscopia eletrônica de transmissão: conservação em resina LR White	33
5.10.1.	Técnica de imunogold	33
5.11.	Anticorpos utilizados.....	34
6.	RESULTADOS	35
6.1.	Histologia do GRD através de microscopia eletrônica de transmissão.....	35
6.1.1.	Ultraestrutura de células neuronais do GRD	36
6.1.2.	Ultraestrutura de células satélites do GRD	36
6.2.	Localização das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA em células neuronais e células satélites do GRD	38
6.3.	Localização do receptor P2X ₇ em células neuronais e células satélites do GRD.....	40
6.4.	Correlação entre a ativação do receptor NMDA, P2X ₇ e liberação de PGE ₂ no GRD no desenvolvimento da hiperalgesia	40
6.4.1.	Participação do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de IL-1 β	41
6.4.2.	Participação da enzima COX-2, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de agonista NMDA.....	41
6.4.3.	Participação do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de BzATP	43
6.4.4.	Participação do receptor P2X ₇ , presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de NMDA	45
6.4.5.	Envolvimento da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pela ativação do receptor NMDA no GRD	46
6.4.6.	Participação do receptor NMDA do GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina.....	47
6.5.	Estudo da correlação entre os receptores de NMDA e P2X ₇ vista a partir do influxo de Ca ²⁺ observado em células do GRD mantidas em cultura	48
6.5.1.	Efeito do antagonista do receptor P2X ₇ (A-740003) no influxo de Ca ²⁺ gerado pelo agonista NMDA em células neuronais e células satélites do GRD	48
6.5.2.	Efeito do antagonista do receptor NMDA (MK-801) no influxo de Ca ²⁺ gerado pelo BzATP em neuronais e células satélites do GRD	50
7.	DISCUSSÃO	54

8. CONCLUSÃO	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética	71
ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DIREITOS AUTORAIS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como *uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato*. A percepção dessa, ainda que desagradável, tem seu valor biológico e é uma vantagem para sobrevivência, pois trata-se do “anúncio” de uma possível lesão ou lesão real tecidual devido a estímulos algésicos. Tal reação permite a detecção de desafios à integridade tecidual e, por consequência, previne maiores injúrias ao organismo (Gosselin et al. 2011). Por outro lado, durante processos patológicos, seja no tecido periférico (inflamação) ou vias neuronais (neuropatias), a dor fisiológica ou nociceptiva propicia à sensibilização dos nociceptores (Gosselin et al. 2011).

1.1. Vias de Detecção e Transmissão da Informação Dolorosa

Os estímulos ambientais internos ou externos ao organismo são detectados por estruturas receptoras localizadas por todo o corpo conhecidas como *receptores sensoriais*. Estes receptores traduzem a informação produzida pelos diferentes tipos de estímulo ambientais de natureza mecânica, química ou térmica, em estímulos elétricos os quais serão transmitidos até o sistema nervoso central (SNC) por meio das fibras nervosas aferentes (ou primárias). Estas fibras aferentes estabelecem contato com os neurônios de segunda ordem (ou secundários) que, por sua vez, conduzem a informação até os centros superiores para seu processamento (Bonica 1990).

As fibras primárias, presentes nos tecidos periféricos e normalmente associadas aos receptores sensoriais, podem estar envoltas por uma estrutura lipídica, produzida pelas células de Schwann, denominada bainha de mielina, responsável pelo aumento da velocidade de condução da informação ao longo da fibra nervosa. As fibras que tem como função primária a condução de estímulos a grandes velocidades possuem maior quantidade desse envoltório mielínico (Gasser 1941).

Em 1941, Gasser (1941) classificou as fibras nervosas periféricas em três tipos (fibras A β , A δ e fibras C) com base na velocidade do potencial de ação. Fibras associadas a mecanorreceptores - especializadas na condução de estímulos de origem mecânica, são um exemplo. Essas fibras, chamadas A-beta (A β), são capazes de responder a estímulos táteis, possuem largo diâmetro e conduzem o estímulo em maiores velocidades (30 a 100 m/s).

Fibras de diâmetros menores e com terminações livres possuem alto limiar de ativação e estão diretamente relacionadas às vias nociceptivas (Aguggia 2003). Por isso,

genericamente, são denominadas nociceptores e subdivididas em dois tipos distintos: fibras A-delta ($A\delta$), de médio diâmetro, finamente mielinizadas, com velocidade de condução média, entre 12 e 30 m/s (correspondentes a 20% das fibras de dor e responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante após estimulação nociva), e fibras C não-mielinizadas, de pequeno diâmetro, com menor velocidade de condução (0,5 a 2 m/s) (correspondentes a 80% das fibras condutoras da informação dolorosa e responsáveis pela dor com característica lenta e difusa) (Millan 1999; Julius & Basbaum 2001). Levando em conta o critério funcional, as fibras $A\delta$ respondem à estimulação mecânica, porém podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo C respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, sendo classificadas, por isso, como nociceptores polimodais.

Emery et al (2016) atualizaram a classificação das fibras aferentes polimodais, visto que estudos eletrofisiológicos indicavam a existência de fibras polimodais e estudos utilizando camundongos transgênicos, onde alguns tipos de células ou biomarcadores foram deletados, eram consistentes com a existência de apenas fibras neuronais modalidades específicas. Seus resultados *in vivo* indicaram que a maioria das fibras neuronais aferentes presentes no gânglio da raiz dorsal (GRD) possuem uma modalidade de estímulo preferencial, ou seja, possui uma maior resposta a um determinado estímulo, mas também pode responder, em menor grau, a estímulos de outra natureza. O mesmo trabalho ainda mostrou que após a exposição das fibras neuronais aferentes a um agente inflamatório (prostaglandina E2) uma maior quantidade de fibras foram responsivas ao estímulo (Emery et al. 2016).

As fibras neuronais aferentes possuem corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminiais, no caso dos neurônios sensoriais que inervam a região orofacial. Destes gânglios saem prolongamentos em direção à medula espinal (ou tronco encefálico, no caso dos neurônios orofaciais), onde estão localizados os neurônios secundários. A ativação dos neurônios sensoriais primários leva à liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, além de peptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, nas fendas sinápticas (Millan 1999).

1.2. Hiperalgesia

Em determinadas condições, a dor é acompanhada por fenômenos paralelos, como a chamada hiperalgesia. Este fenômeno é resultado principalmente da sensibilização das fibras neuronais primárias, embora também possa ocorrer na sensibilização dos neurônios de segunda ordem. Esta sensibilização consiste na diminuição do limiar de despolarização destes neurônios, ou seja, ocorre um aumento na probabilidade de disparos de potenciais de ação em resposta a

um estímulo. Portanto, a hiperalgesia é um processo distinto da nocicepção propriamente dita (Loeser & Treede 2008).

1.3. Gânglio da Raiz Dorsal

Os neurônios aferentes primários possuem seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal. Esta estrutura situada no local de penetração da fibra nervosa na barreira meníngea, possui 2/3 de sua totalidade fora da barreira hemato-neural, uma característica morfológica que o torna um alvo farmacológico periférico interessante.

O GRD abriga neurônios sensoriais, com grande heterogeneidade Quanto à espessura das fibras, tamanho dos corpos celulares e quantidade de mielina (Amaya et al. 2000). Estes neurônios são classificados como “pseudounipolares”, ou seja, a partir de seu corpo celular, parte um único prolongamento que, após dezenas ou centenas de microns, se divide em dois, formando um “T” ou “Y”. Outro dado importante com relação ao GRD foi a demonstração, por meio de técnicas de imunocitoquímica e registros eletrofisiológicos, da presença de receptores para mediadores inflamatórios no soma celular (Shinder & Devor 1994).

A célula satélite (CS), presente no GRD, também é importante na fisiopatologia da hiperalgesia neste tecido. Há alguns anos, pensava-se que as CS tinham apenas funções de suporte metabólico e isolamento dos neurônios frente ao ambiente ganglionar (Pannese et al. 1972). No entanto, diversos estudos apontaram mecanismos de comunicação entre CS-CS e CS-corpo neuronal, e de que forma tal interação se reflete na fisiopatologia da hiperalgesia inflamatória periférica (Liu et al. 2012; Araldi et al. 2013; Ferrari et al. 2014; Costa & Moreira Neto 2015; Chang et al. 2016; Chen et al. 2016).

Alguns estudos indicam que a interação entre neurônios e células satélites ocorre através da fusão de vesículas nas membranas de ambas as células e através de *gap junctions* (Costa & Moreira Neto 2015). Após lesão do axônio periférico, a quantidade de *gap junctions* entre corpos neuronais-CS e destas com as CS vizinhas aumenta substancialmente, indicando uma função protetiva das CS em relação ao corpo neuronal frente a lesão (Pannese et al. 2003; Spray & Hanani 2017).

1.4. Receptores N-metil-D-aspartato

O canal iônico associado ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é um canal catiônico que permite a passagem de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} e é bloqueado por Mg^{2+} . A permeabilidade preferencial ao Ca^{2+} foi suspeitada precocemente, mas foi definitivamente estabelecida por experimentos de MacDermott et al. (1986) e Mayer e Westbrook (1987). Estes autores

mostraram que agonistas de receptores NMDA induzem entrada de Ca^{2+} via canais voltagem-dependentes e, a intensidade de permeabilidade ao Ca^{2+} parece ser dependente da estrutura que compõe o receptor NMDA.

Estudos demonstraram que, em condições basais de potencial de membrana, o poro do canal permanece bloqueado por um “*plug*” de Mg^{2+} , o qual é voltagem-dependente (Johnson & Ascher 1987). Desta forma, é necessária uma despolarização neuronal prévia para que haja liberação do “*plug*” de Mg^{2+} do poro do canal, permitindo o influxo de Ca^{2+} . Contudo, Ferrari et al. (2014), demonstraram que no GRD devido a presença de subunidades NR3 ocorre o influxo de Ca^{2+} independente do plug de Mg^{2+} , diminuindo assim a sensibilidade dos receptores NMDA ao bloqueio pelo Mg^{2+} .

Os receptores NMDA são complexos heteroméricos formados por diferentes subunidades dentro de um repertório de três subtipos: NR1, NR2 e NR3. Apesar de existirem 8 tipos de subunidades NR1 geradas por pequenas variações em um mesmo gene, consideramos essa subunidade como sendo a mais importante dos NMDARs, pois nelas está localizado o sítio de ligação para o co-agonista glicina (tipo de variante desta subunidade pode também influenciar certas características como inibição de NMDARs por prótons e Zn^{2+}). Existem 4 tipos de subunidades NR2 (NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), importantes para se determinar muitas características biofísicas e farmacológicas, incluindo alta afinidade pelo glutamato, modulação pela glicina, sensibilidade ao bloqueio pelo Mg^{2+} e propriedades cinéticas. Por fim, são reconhecidos 2 subtipos de NR3 codificados por seis genes diferentes (NR3A e NR3B) e, quando expressas com NR1/NR2, reduzem a permeabilidade ao Ca^{2+} e o fluxo de corrente pelo canal. A expressão de NMDARs funcionais em células mamíferas requer a co-expressão de pelo menos uma subunidade NR1 e uma NR2. Tem sido descrito que os NMDARs se apresentam como tetrâmeros compostos por duas subunidades NR1 e duas NR2 do mesmo tipo ou diferentes a maioria dos NMDARs nativos funciona apenas com essa configuração (Cull-Candy & Leszkiewicz 2004). Nas células que expressam a subunidade NR3, considera-se que estas se ligam a NR1 e NR2, formando complexos tetraméricos ternários NR1/NR2/NR3 (Sasaki et al. 2002).

Marvizón et al. (2002) mostraram, através da técnica de *western blot*, a presença das subunidades NR1, NR2B, NR2C e NR2D dos receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal de ratos. Os mesmos autores, através da imuno-histoquímica, afirmam haver uma maior presença de subunidades NR1 e NR2 em neurônios de diâmetro pequeno a médio em comparação aos de maior diâmetro. A subunidade NR2C/D predominou nas células de pequeno tamanho. A marcação com anticorpo monoclonal N52 (contra neurofilamentos – Fibra A)

confirmou a co-marcação com as subunidades NR1 e NR2B mas não com as subunidades NR2C e D. Marvizón et al. (2002) também tentaram mostrar, através de microscopia confocal de alta resolução, a localização no soma celular das subunidades do receptor NMDA. Receptores NR1 e NR2 aparecem co-localizados no citoplasma neuronal, em estruturas arredondadas e mais próximas à membrana co-localizando receptores NR1 e NR2C/D. Somado a isso, os sítios intracelulares contendo NR1 e NR2, co-localizaram com marcadores para CGRP e IB4 (indicadores de diferentes tipos de fibras C), diferentemente das subunidades NR2C/D. Os mesmos autores ainda afirmam que no GRD estão presentes dois tipos de tetrâmeros de receptores NMDA, um formado por duas subunidades NR1 e duas NR2B, e outros por uma subunidade NR2C, uma NR2D e duas NR1.

1.5. Receptores P2X₇

Os receptores P2X são canais catiônicos permeáveis aos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ (Abbracchio et al. 2009). Os receptores P2X, são classificados como receptores purinérgico, ou seja, receptores que reconhecem o ATP extracelular e/ou outros nucleotídeos relacionados, como a adenosina, o ADP e o UTP. Estes receptores possuem 7 subtipos expressos no sistema nervoso central (P2X₁₋₇) (North 2002). Dos sete subtipos de receptores P2X, o mais fortemente ligado aos processos de inflamação neuronal é o receptor P2X₇ (Lister et al. 2007). Estudos *in vivo*, entretanto, têm sido usados para demonstrar o envolvimento do receptor P2X₇ na ativação do inflamossoma em uma ampla variedade de modelos de doenças em roedores, incluindo isquemia cerebral (Kuan et al. 2015), epilepsia (Engel et al. 2012), doença de Parkinson (Marcellino et al. 2010), doença de Alzheimer (Diaz-Hernandez et al. 2012), depressão e ansiedade (Basso et al. 2009) e esclerose múltipla (Sharp et al. 2008). Estudos mostram que os receptores do tipo P2X possuem um papel importante na nocicepção e na sensibilização de nociceptores por agentes inflamatórios (Ding et al. 2000; Andó et al. 2010; Prado et al. 2013).

Os receptores P2X₇ geralmente encontrados em células do sistema imune e da glia (Sperlágh et al. 2006) possuem características peculiares que os diferem dos demais receptores P2X. Este receptor é ativado por concentrações altas de ATP (Beamer et al. 2016) que, após um estímulo sustentado, induz a formação de um poro na membrana celular permeável a solutos hidrofílicos de peso molecular até 900 Da (Surprenant et al. 1996).

Os receptores P2X₇ estão presentes em células satélites do gânglio da raiz dorsal (Zhang et al. 2005), cujo papel ainda não está elucidado. Tem sido sugerido que a ativação de receptores P2X₇ em células satélites pode induzir uma inibição tônica da expressão dos receptores P2X₃ neuronais, apresentando, portanto, um efeito anti-hiperalgésico (Chen et al.

2008). Por outro lado, um papel pró-hiperalgésico destes receptores P2X₇ foi evidenciado pelo fato de uma variação genética do receptor P2X₇ comprometer a formação de poros na membrana celular, associada a uma menor sensibilidade à dor crônica observada tanto em camundongos quanto em humanos (Sorge et al. 2013).

Outra via pró-hiperalgésica observada pela ação dos receptores P2X₇ ocorre através da ativação destes receptores por ATP em células da glia e consequente liberação de citocinas. Trabalhos indicam que a ativação de receptores P2X₇ por ATP é um passo essencial para a maturação (via caspases) e liberação de interleucina 1 β (IL-1 β) (Ferrari et al. 1997; Solle et al. 2001; Ferrari et al. 2006; Stoffels et al. 2015).

1.6. Interleucina-1 β e enzima COX-2

As prostaglandinas (PGs), principalmente as da série E, são mediadores que causam hiperalgesia inflamatória (Ferreira 1973; Araldi et al. 2013). As PGs são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico (AA) e sua ativação ocorre por estímulos mecânicos, químicos ou infecciosos (Ferreira & Vane 1967).

Inicialmente foi descrita a existência de pelo menos duas isoformas da COX, as chamadas COX-1 e COX-2, sendo a COX-1 expressa constitutivamente em muitos tecidos, incluindo os rins, estômago, músculo liso vascular e plaquetas, e a COX-2, indetectável em muitos tecidos, podendo ser induzida por mediadores inflamatórios, tal como citocinas ou fatores de crescimento (Trifan & Hla 2003; Hardman et al. 2011).

Em cultura de células do GRD, o RNAm para a COX-1 e COX-2 foi detectado, entretanto somente a proteína para COX-1 e não a COX-2 é constitutivamente expressa neste tecido. A COX-1 é expressa em neurônios de pequeno e médio diâmetro, no citoplasma e principalmente na membrana nuclear, assim como no axônio, sugerindo que as prostaglandinas podem ser sintetizadas e liberadas pelos terminais centrais e periféricos dos neurônios aferentes primários (Vanegas & Schaible 2001). Além disso, em cultura de células do GRD estimuladas com interleucina-1 β (IL-1 β), os níveis de RNAm para COX-1 não se alteram, enquanto os níveis de RNAm para a COX-2 aumentam substancialmente (Inoue et al. 1999).

Dentre os estímulos inflamatórios capazes de induzir a síntese e liberação de PGs está a IL-1 β , além evidentemente dos próprios agentes inflamatórios que induzem sua liberação endogenamente como a carragenina e o lipopolissacarídeo de *E. coli* (Poole et al. 1999).

A interleucina-1 β é um polipeptídeo produzido por uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, sinoviócitos, mastócitos, células da glia e neurônios (Bianchi et al. 1998). Exerce a maioria de suas ações biológicas por meio da

indução da transcrição de diferentes genes que irão codificar quimiocinas, citocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão celular e enzimas envolvidas na produção de mediadores pró-inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzida, a COX-2 e a fosfolipase A2 (Dinarello 1996; Wesche et al. 1997).

Foi bem definido, através de estudos realizados em nosso laboratório, o papel importante da enzima COX e da citocina IL-1 β no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória periférica no GRD (Araldi et al. 2013). O aumento da expressão de COX no GRD e o consequente aumento local da síntese e liberação de prostaglandinas, são essenciais para o desenvolvimento da hiperalgesia durante uma inflamação do tecido periférico, somado a isso, mostrou-se também que a inibição dos receptores 4 de prostaglandinas E2 (EP4) e receptores 2/1 de prostaglandina E2 (EP1/EP2) do GRD previnem a hiperalgesia induzida pela administração de IL-1 β periféricamente (Araldi et al. 2013).

1.7. Interação entre as células do GRD

A interação entre as células neuronais e as células satélites, tornou-se um grande foco de estudos, mostrando inicialmente que, além da comunicação através da liberação de mediadores em vesículas, os neurônios e células satélites também trocam informações através de *gap junctions* (Costa & Moreira Neto 2015). Contudo, a presença de *gap junctions* entre neurônios e células satélites são raras, quando comparadas a presença de *gap junctions* entre as próprias células satélites, interação esta que aumenta ainda mais em situações de hiperalgesias e neuropatias (Costa & Moreira Neto 2015).

Apesar da comunicação entre as células neuronais e as células satélites do GRD ser de fundamental importância para a indução da hiperalgesia, o papel que as *gap junctions* exercem sobre a hiperalgesia é muito maior, pois a função de propagação da sensibilização de um único neurônio para neurônios vizinhos ocorre pela comunicação via *gap junctions* entre as CS que os envolvem e CS que circundam neurônios vizinhos não afetados diretamente pelo estímulo primário, induzindo assim um recrutamento de mais fibras aferentes primárias (Spray & Hanani 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes demonstraram a participação do gânglio da raiz dorsal (GRD) como centro modulação do impulso elétrico no sistema nervoso periférico envolvido na hiperalgesia inflamatória. A partir destes relatos o GRD passou a ser alvo de estudos para melhor

compreensão dos mecanismos envolvidos na hiperalgesia inflamatória periférica e, evidentemente, como foco para o tratamento da mesma nas diferentes patologias em que se manifesta (Araldi et al. 2013; Wang et al. 2017).

Nosso grupo de pesquisa, através do trabalho de Ferrari et al. (2014), demonstrou a presença e a participação dos receptores N-metil-D-Aspartato do GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de PGE₂ na pata e, somado a isso, que as principais subunidades dos receptores NMDA envolvidas na hiperalgesia inflamatória são as subunidades NR1, NR2B, NR2D e NR3A.

Dados ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstram, também, a participação importante dos receptores P2X₇ na hiperalgesia inflamatória, através da qual este receptor purinérgico está diretamente ligado a liberação de IL-1 β e consecutivamente, à sensibilização dos neurônios sensoriais presentes nos GRD.

A correlação entre os receptores NMDA e P2X₇ já foi estudada anteriormente no córtex cerebral em modelo de dor neuropática (Mannelli et al. 2015). Bravo et al. (2015) realizaram uma ampla revisão bibliográfica sobre a interação entre os receptores NMDA, P2X₇ e panexina-1 no sistema nervoso central. Gu & MacDermott (1997) mostraram que a ativação de receptores P2X em neurônios pré-sinápticos (GRD) induz a um aumento da liberação de glutamato no corno dorsal da medula. Contudo, nenhum estudo foi encontrado abordando a interação entre os receptores NMDA, P2X₇ e enzima COX-2 no GRD na hiperalgesia inflamatória periférica.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a localização e correlação dos receptores NMDA, P2X₇ e enzima COX-2 do gânglio da raiz dorsal na hiperalgesia inflamatória periférica.

3.1. Objetivos Específicos

- ✓ Compreender melhor a histologia do GRD através de microscopia eletrônica de transmissão.
- ✓ Localizar as subunidades NR1 e NR2 do receptor NMDA e o receptor P2X₇ nos corpos neuronais e células satélites do GRD.
- ✓ Avaliar a participação do receptor de NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar (gl.) de IL-1 β .

- ✓ Avaliar a participação da enzima COX-2, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.
- ✓ Avaliar a participação do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de 20,30-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP).
- ✓ Avaliar a participação do receptor P2X₇, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.
- ✓ Avaliação do envolvimento da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar do agonista NMDA.
- ✓ Avaliar a participação do receptor NMDA do GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina.
- ✓ Avaliar o efeito do antagonista do receptor NMDA no influxo de Ca²⁺ gerado pelo agonista do receptor P2X₇ nos corpos neuronais e células satélites do GRD.
- ✓ Avaliar o efeito do antagonista do receptor P2X₇ no influxo de Ca²⁺ gerado pelo agonista do receptor NMDA nos corpos neuronais e células satélites do GRD.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

4.1. Histologia do GRD através de microscopia eletrônica de transmissão.

Para melhor compreender a histologia do GRD, foi realizada coleta dos gânglios da raiz dorsal L4 e L5 de ratos, sendo o material coletado e encaminhado para o protocolo de microscopia eletrônica de transmissão (MET) pelo método de conservação com ósmio associado ao glutaraldeído e mantidos em resina EPON.

4.2. Localização das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA e o receptor P2X₇ nos corpos neuronais e células satélites do GRD.

Visando localizar as subunidades NR1 e NR2B dos receptores NMDA e os receptores P2X₇, foi realizada coleta de gânglios dorsais L4 e L5 de ratos, sendo o material coletado e encaminhado para o protocolo de microscopia eletrônica de transmissão pelo método de conservação em resina LRWhite e posteriormente, submetido ao protocolo de imunogold e MET.

4.3. Participação da subunidade NR1 do receptor de NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de IL-1 β .

Foram realizados ensaios comportamentais para avaliar a interferência da administração de oligodeoxinucleotídeo antisense (ODN-AS) contra o receptor NMDA na hiperalgesia mecânica induzida pela IL-1 β . Para isso, administrou-se diariamente ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor NMDA, seu controle ODN-Mismatch ou salina, todos pela via ganglionar (gl.) durante 5 dias. Após 15 horas da última administração de ODN-AS ou seus controles, administrou-se IL-1 β (gl.) ou salina (gl.). A hiperalgesia mecânica foi avaliada através do von Frey eletrônico três horas após a administração de IL-1 β (Araldi et al. 2013).

Para confirmar se o ODN-AS foi capaz de diminuir temporariamente a expressão da proteína NMDA NR1, foi realizado o ensaio de *Western Blot* com os gânglios das raízes dorsais L5 que receberam o ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor NMDA.

4.4. Participação da enzima COX-2, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.

Foram realizados ensaios comportamentais para avaliar a interferência da administração de ODN-AS contra COX-2 na hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista do receptor NMDA. Primeiramente realizou-se a curva dose-resposta do agonista NMDA administrando em doses crescentes (NaCl, 25, 80, 240 e 720 ng/3 μ L/gl.) e após a terceira hora (Ferrari et al., 2014), foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Após estabelecida a dose do agonista, administrou-se diariamente ODN-AS contra a enzima COX-2, seu controle ODN-Mismatch ou salina, todos pela via ganglionar, durante 4 dias. Após 15 horas da última administração de ODN-AS ou seus controles, administrou-se agonista NMDA (gl.) ou salina (gl.) e avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico três horas após a administração do agonista.

Para confirmar se o ODN-AS foi capaz de diminuir temporariamente a expressão da COX-2, foi realizado o ensaio de *Western Blot* com os gânglios das raízes dorsais L5 que receberam o ODN-AS contra a enzima COX-2.

4.5. Participação da subunidade NR1 do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de BzATP.

Foram realizados ensaios comportamentais para avaliar a interferência da administração de ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor NMDA na hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista do receptor P2X₇ (BzATP). Primeiramente foram realizadas

as curvas tempo/resposta (0,5, 1, 2, 3, 4 horas) e dose-resposta (NaCl, 50, 100, 500, 1000 nM/3 μ L/gl.) do BzATP. Após estabelecidos tempo e dose, administrou-se diariamente, ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor NMDA, seu controle ODN-Mismatch ou salina, todos pela via gl. durante 5 dias. Após 15 horas da última administração de ODN-AS ou seus controles, administrou-se BzATP (gl.) ou salina (gl.) e avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico 0,5 horas após administração do agonista.

Para confirmar se o ODN-AS foi capaz de diminuir temporariamente a expressão da proteína NMDA NR1, foi realizado o ensaio de *Western Blot* com os gânglios das raízes dorsais L5 que receberam o ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor NMDA.

4.6. Participação do receptor P2X₇ presente no GRD na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de agonista NMDA.

Foram realizados ensaios comportamentais para avaliar a interferência da administração de ODN-AS contra o receptor P2X₇ na hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista do receptor NMDA. Para isso, administrou-se diariamente ODN-AS contra o receptor P2X₇, seu controle ODN-Mismatch ou salina, todos pela via gl. durante 4 dias. Após 15 horas da última administração de ODN-AS ou seus controles, administrou-se o agonista NMDA (gl.) ou salina (gl.) e, três horas após (Ferrari et al. 2014), avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico.

Para confirmar se o ODN-AS foi capaz de diminuir temporariamente a expressão da proteína P2X₇, foi realizado o ensaio de *Western Blot* com os gânglios das raízes dorsais L5 que receberam o ODN-AS contra P2X₇.

4.7. Envolvimento da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. do agonista NMDA.

Foram realizados ensaios comportamentais para avaliar a influência da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista do receptor NMDA. Para isso, administrou-se capsaicina (10 μ g/10 μ L) ou salina (10 μ L) pela via intratecal, destruindo as fibras C. Passados 48 horas, administrou-se o agonista NMDA (240 ng/3 μ L) ou salina (3 μ L) pela via ganglionar e, após três horas (Ferrari et al. 2014), avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico.

Para confirmar a efetividade da capsaicina em destruir as fibras C, após 8 horas da administração do agonista NMDA, administrou-se capsaicina (0,5 μ g/0,5 μ L/pata) intraplantar e avaliou-se a quantidade de *flinchs* durante 5 minutos.

4.8. Avaliação da participação do receptor NMDA do GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina.

Foram realizados ensaios comportamentais para verificar a participação dos receptores NMDA presentes no GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de carragenina periférica. Para isso, administraram-se o agente hiperalgésico (Carragenina) ou seu veículo (salina) pela via i.pl., e após 2h30 administraram-se MK801 (antagonista NMDA) ou seu veículo pela via ganglionar. Passados 30 minutos da última administração, avaliou-se a hiperalgesia através do teste de von Frey eletrônico.

4.9. Avaliação do efeito do antagonista do receptor P2X₇ (A-740003) no influxo de Ca²⁺ gerado pelo agonista do receptor NMDA (NMDA) nos corpos neuronais e células satélites do GRD.

Foram realizados experimentos *in vitro* utilizando culturas primárias de neurônios e células satélites isolados de gânglios da raiz dorsal. Primeiramente, realizou-se uma curva dose-resposta do agonista do receptor NMDA (NMDA) e do antagonista do receptor P2X₇ (A-740003). No primeiro estímulo a cultura recebeu NMDA (500 μM), após, foi lavada por 4 vezes com Hanks, e consecutivamente, incubada com Hanks com ou sem o antagonista A-740003 (50 nM) por 10 minutos. Passado este período, a cultura recebeu um segundo estímulo de NMDA (500 μM) e avaliou-se as variações na concentração do cálcio intracelular ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) no primeiro e segundo estímulo.

Para avaliação apenas das fibras C e como controle positivo de que a cultura estava viva, os neurônios que foram considerados na avaliação, foram apenas aqueles responsivos a um estímulo final de Capsaicina (5 μM).

4.10. Avaliação do efeito do antagonista do receptor NMDA (MK801) no influxo de Ca²⁺ gerado pelo agonista do receptor P2X₇ (BzATP) nos corpos neuronais e células satélites do GRD.

Foram realizados experimentos *in vitro* utilizando culturas primárias de neurônios e células satélites isolados de gânglios da raiz dorsal. Primeiramente, realizou-se uma curva dose-resposta do agonista do receptor P2X₇ (BzATP) e do antagonista do receptor NMDA (MK801). No primeiro estímulo a cultura recebeu BzATP (8 μM), após, foi lavada por 4 vezes com Hanks, e consecutivamente, incubada com Hanks com ou sem o antagonista MK801 (400 μM) por 10 minutos. Passado este período, a cultura recebeu um segundo estímulo de BzATP

(8 μM) e avaliou-se as variações na concentração do cálcio intracelular ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) no primeiro e segundo estímulo.

Para avaliação apenas das fibras C e como controle positivo de que a cultura estava viva, os neurônios que foram considerados na avaliação, foram apenas aqueles responsivos a um estímulo final de Capsaicina (5 μM).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (200-250 g, n=6/grupo) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – Unicamp). Os animais permaneceram por um mês no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia – UNICAMP, em gaiolas plásticas (máximo de 4 animais/gaiola) contendo maravalha, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com acesso à comida e água *ad libitum*, até o dia do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética no Uso Animal (protocolo número 3871-1) e seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (Zimmermann, 1983).

5.2. Administração de drogas pela via ganglionar

As injeções foram realizadas próximo ao gânglio da raiz dorsal a nível da vértebra L5 (L5), ipsilateral ao estímulo inflamatório, de acordo com o protocolo descrito por Ferrari et al. (2014). Resumidamente, após tricotomia e antisepsia da região os animais receberam, na câmara de anestesia, isoflurano a 3-4 V% e, após indução, foram mantidos em máscara de anestesia acoplado a região rostral da face recebendo o mesmo anestésico inalatório (2 V%) pelo tempo necessário (máximo 8 minutos). Os animais permaneceram em decúbito esternal durante todo o procedimento e sobre um pequeno cilindro, de modo que sua região lombar ficasse hiperfletida. A injeção ganglionar (gl) foi realizada utilizando um cateter PE-10 de 30 cm (diâmetro interno 0,28 mm e diâmetro externo 0,61 mm) calibrado de maneira que cada 25 mm correspondem a um volume injetado de 1 μL , acoplado a uma agulha gengival 30 G (0,30 mm x 25 mm). A 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas, foi inserida uma cânula-guia (25x10, 19 G) na pele com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival através

deste tecido. Após a agulha gengival atravessar a pele, esta foi direcionada ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral fosse atingido. Com movimentos finos a agulha atinge o GRD e neste momento ocorre um reflexo (*flinch*) característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no GRD do quinto nervo espinal lombar, o qual está localizado sob o processo transversal da quinta vértebra lombar. O *flinch* foi usado como um sinal de que a ponta da agulha se aproximou do gânglio da raiz dorsal L5. Em seguida, o êmbolo da seringa de vidro foi deslocado 7,5 cm totalizando um volume de 3 µL injetado. Após a injeção do tratamento, os animais foram recolocados na caixa para se recuperarem da anestesia. O procedimento total de administração ganglionar (gl.) durou em torno de 5 a 10 minutos até a recuperação do estado consciente dos animais.

O ODN antisense contra o receptor NMDA NR1 (sequência: 5'-TCT TCC AAG AGC CGT C-3'; 20 µg/3 µL/5 dias), seu controle *ODN-Mismatch* (5'-TGT TCG ATG AGG CGT C-3'; 20 µg/3 µL/5 dias), ODN antisense contra o receptor P2X₇ (sequência: 5'-TTT CCT TAT AGT ACT TGG C-3'; 35 µg/3 µL/4 dias), seu controle *ODN-Mismatch* (5'-TTC CGT TAA AGA AGT AGG C-3'; 35 µg/3 µL/4 dias), ODN antisense contra a enzima COX-2 (sequência: 5'-GAA CAG TCG CTC GTC ATC C-3'; 30 µg/3 µL/4 dias) e seu controle *ODN-Mismatch* (sequência: 5'-GAT CAG CCG TTC ATG ATG C-3'; 30 µg/3 µL/4 dias) foram diluídos em solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e injetados na região L5 do GRD diariamente, pelo período de cada ODN antisense, previamente ao estímulo inflamatório. Os grupos controles que receberam salina (3 µL), pelo mesmo período dos tratamentos com ODN antisense.

Os agentes hiperalgésicos utilizados foram: o agonista do receptor NMDA (240 ng/3 µL; TOCRIS - EUA), BzATP (100 nM/3 µL; #B6396 Sigma-Aldrich, MO, USA) e a IL-1β (0,5 pg/3 µL; NIBSC - Inglaterra), todos diluídos em solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e injetados pela via gl. em L5, sendo avaliado a hiperalgisia mecânica na pata ipsilateral através de von Frey eletrônico.

5.3. Administração de drogas intraplantar

A administração de drogas pela via intraplantar (i.pl.) foi realizada de uma agulha hipodérmica 26 G (0,45 mm x 13 mm) inserida, após antissepsia, no tecido subcutâneo da superfície plantar do membro posterior direito correspondente à área inervada pelo GRD L5 (campo periférico da L5) (Araldi et al. 2013). Os agentes hiperalgésicos empregados foram capsaicina (0,5 µg/50 µL/pata), avaliado imediatamente após administração através da

contagem de *flinch* e carragenina (1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$) avaliada três horas após administração por meio do teste de pressão crescente von Frey eletrônico.

5.4. Administração de drogas intratecal

A administração de drogas via intratecal (i.t.) foi realizada como descrito anteriormente por Papir-Kricheli (Papir-Kricheli et al. 1987). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com 2-3% de isoflurano através de mascaró facial em decúbito esternal, foi realizada então tricotomia e antisepsia da região dorsal entre as vértebras L1 e Co2. O animal foi colocado sobre um pequeno cilindro, de modo que sua região lombar ficasse hiperfletida. As vértebras L5 e L6 foram identificadas por palpação e uma agulha BD *Ultra-Fine*[®] (29G) foi inserida em um ângulo de aproximadamente 45° através da pele, em direção ao espaço intervertebral entre as vértebras L5 e L6. Movimentos delicados foram feitos com a agulha até o reflexo do “flinch” caudal ser observado. Então, para destruir fibras C, 10 μL de capsaicina (1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{L}$) foram injetados em cada animal.

5.5. Avaliação da hiperalgesia

5.5.1. Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico

A avaliação da hiperalgesia mecânica em ratos foi realizada através do método de pressão crescente descrito por Möller et al. (Möller et al. 1998) na região plantar do membro avaliado. Empregou-se um anestesiómetro eletrônico (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), composto por um transdutor de pressão conectado a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. A precisão do aparelho é de 0,1 g e este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de força com a pata foi realizado através de uma ponteira Universal Tips 10 μL (T-300, Axygen) pressionada diretamente na região alvo. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 20 minutos antes do experimento para ambientação. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região alvo. O experimentador foi previamente treinado para aplicar o estímulo (ponteira) em ângulo reto na região plantar do membro posterior direito com pressão gradualmente crescente, até provocar uma resposta reflexa do animal com flexão característica (“*flinch*”) do membro estimulado, sendo o estímulo interrompido após o mesmo. Realizaram-se cinco estímulos distintos por animal, para compor a média aritmética das medidas. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na força (Δ de reação em gramas)

obtida subtraindo-se o valor obtido antes do estímulo hiperalgésico e após o estímulo hiperalgésico, os quais variaram de acordo com os protocolos experimentais.

5.6. Western blot

5.6.1. Homogeneizado e extração de proteínas de gânglios das raízes dorsais

Os animais que receberam os tratamentos, por via gl., com ODN-AS ou seus controles, após eutanásia, tiveram seus GRDs (L5, direito), isolados, dissecados e imediatamente colocados em nitrogênio líquido e armazenados em temperatura de -80 °C até a realização dos experimentos.

Realizou-se um pool de 4 gânglios de cada grupo, sendo os mesmos encaminhados para homogeneização, a qual foi realizada com o uso do criostato. Em seguida, o material obtido foi centrifugado (1.500 rpm por 5 minutos a 4 °C), adicionado ao tampão de lise RIPA (Ortovanadato de sódio, Inibidor de protease e PMSF - Santa Cruz, EUA) e encaminhado para o homogeneizador FastPrep. As amostras foram agitadas (5 vezes/20 segundos), em intervalos de 5 minutos a 4 °C. Subsequentemente, o material foi mantido em geladeira (4 °C) por 3 horas sob agitação contínua em agitador orbital. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 0,5 mL e procedeu-se a quantificação do total de proteínas pelo método colorimétrico Bradford (Bradford 1976). Alíquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer -80 °C para serem utilizadas posteriormente e a quantidade escolhida foi de 30 µg.

5.6.2. Eletroforese e ImmunoBlot

Amostras do homogenato foram desnaturadas a 90 °C durante 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese segundo Laemmli (1970), utilizando-se o sistema Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). O gel de separação foi de acrilamida 8 % p/v, bisacrilamida 0,3 % p/v, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 e SDS 0,1 % p/v. O gel de concentração foi de acrilamida 4 % p/v, bisacrilamida 0,3 % p/v, Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 e SDS 0,1 % p/v. A corrida foi feita sob voltagem constante de 90 V, utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1 % p/v.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de PVDF (BioRad) previamente ativadas, utilizando-se o sistema de transferência Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de PVDF foram incubados no tampão de transferência [glicina 192 mM, Tris-Base-

HCl 25 mM, pH 8,3, 20 % (v/v) de metanol e 0,1 % (p/v) de SDS] por 30 minutos. Posteriormente foi montado o sistema para transferência contendo esponja, três pedaços de papel de filtro, o gel, a membrana, três pedaços de papel de filtro e finalmente mais uma esponja. As esponjas e os papéis de filtro foram previamente umedecidos no tampão de transferência. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 110 V durante 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com uma mistura de TBS-T (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.05 % de Tween 20) contendo 5 % (p/v) de leite em pó desnatado por 1 hora sob agitação contínua. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes de 5 minutos cada com TBS-t 0,05 % e posteriormente incubada overnight a 4 °C com os seguintes anticorpos primários:

- **NMDA NR1** (Alomone, Alomone Labs, Jerusalem, ISR): IgG de Coelho. A titulação foi de 1:500.

- **COX-2** (Alomone, Alomone Labs, Jerusalem, ISR): IgG de Coelho. A titulação foi de 1:500.

- **P2X7** (Abcam, Alomone Labs, Jerusalem, ISR): IgG de Coelho. A titulação foi de 1:1000.

- **β -actina** (Cell Signaling Technology – EUA): IgG de Mouse. A titulação foi de 1:1000.

Ato continuo as membranas foram lavadas com TBS-T 0.05 % por três vezes durante 5 minutos cada e foram incubadas durante 1 horas em temperatura ambiente sob agitação contínua com os seguintes anticorpos secundários:

- Anticorpo IgG de Cabra Anti-Coelho conjugado à peroxidase (Invitrogen, CA – EUA): A titulação foi de 1:10.000.

- Anticorpo IgG de cabra Anti-Mouse conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch, PA – USA): A titulação foi de 1:10.000.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas com TBS-T 0.05% por três vezes durante 5 minutos cada. Para a revelação por quimioluminescência as membranas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente com a mistura das soluções A e B do kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções.

As membranas foram visualizadas em fotodocumentador (SYNGENE - Cambridge, Reino Unido) sendo as imagens capturas com uma câmera digital (SYNOPTICS) e do analisadas utilizando o “software” Gene link (SYNGENE).

Em todos os experimentos de *Western Blot* foi utilizado um padrão de peso molecular (Bio-Rad – Kaleidoscope Prestained Standards, Catalog 161-0324) com os seguintes pesos:

Myosin	Blue	197,211
B-galactosidase	Magenta	125,275
Bovine serum albumin	Green	83,426
Carbonic anhydrase	Violet	37,095
Soybean trypsin inhibitor	Orange	31,168
Lysozyme	Red	17,154
Aprotinin	Blue	6,990

5.7. Isolamento dos gânglios e cultura das células primárias de neurônios e células satélites do gânglio da raiz dorsal

As culturas foram realizadas conforme protocolo descrito por Linhart et al. (Linhart et al. 2003). Ratos Wistar machos (200 g) foram anestesiados e, em seguida, eutanasiados por decapitação sendo os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica dissecados (20 gânglios/ animal), removidos e colocados em solução salina de Hank's incompleto estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37 °C por 60 minutos em solução salina de Hank's contendo 0,5 % de colagenase (tipo 2, Sigma) e depois por 6 minutos em solução contendo 0,1 % de tripsina. Os gânglios foram lavados 3 vezes em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 1 % de penicilina e streptomina. As células em DMEM foram dissociadas mecanicamente com pipeta pasteur de vidro. As células então foram cultivadas em placas cobertas com poli D-lisina e laminina e mantidas em atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C com o mesmo meio de cultura já descrito. Os experimentos foram realizados após 48 horas da coleta dos GRD.

5.8. Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular

As placas de cultura de células dos GRD foram lavadas em tampão Hanks contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) e incubadas com 5 µM do indicador de cálcio intracelular Fluo-4 AM. Após 30 minutos de incubação com o indicador para cálcio (no escuro, em estufa em atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C) as placas foram lavadas três vezes e mantidas com o tampão. As drogas foram administradas diretamente no tampão e a dinâmica de cálcio intracelular foi gravada por 60 segundos após a adição dos agonistas.

A fluorescência foi excitada a 506 nm e a fluorescência emitida pelas células (a 526 nm) aumentou de acordo com o aumento de cálcio intracelular. Para a análise, foram obtidas séries temporais de imagens a cada segundo através de microscopia de fluorescência. Os dados são mostrados como $(\Delta F/F_0)$, ou seja, a variação de intensidade de fluorescência ($\Delta F = F - F_0$) dividida pela fluorescência basal (F_0) de forma a normalizar as variações de concentração do indicador fluorescente nas células. Cada imagem representativa de um campo da cultura apresentou de 20 a 30 células satélites responsivas, por isso a análise foi obtida de várias células simultaneamente. Já a quantidade de neurônios responsivos aos agonistas e a capsaicina foi de 5-10 células por campo. Cada placa foi considerada 1 "n", sendo utilizado no mínimo 6 placas por tratamento.

5.9. Microscopia eletrônica de transmissão: conservação em resina EPON

Previamente a perfusão, os animais foram sedados utilizando-se a associação de cetamina (100 mg/kg), xilazina (50 mg/kg) e fentanil (10 ug/kg), passados 10 minutos, os mesmos foram submetidos a perfusão de 300 mL de salina, seguido de 300 ml de paraformaldeído (PFA) 4 % associado a glutaraldeído 0,1 % (recém diluído). Após perfusão, realizou-se coleta dos gânglios dorsais L4 e L5, do lado direito e esquerdo.

No dia seguinte, o material foi fixado com glutaraldeído 2,5 % (recém diluído) em tampão cacodilato 0,15 M e CaCl_2 3 mM por 3 horas no gelo. Passado este período o material foi lavado com tampão cacodilato 0,15 M associado a CaCl_2 3 mM por 5 vezes durante 2 minutos cada em gelo. A pós-fixação foi realizada com ósmio 1 % em tampão cacodilato 0,15 M associado ao CaCl_2 3 mM e a 0,8 % de ferrocianeto de potássio por 1 hora no gelo. Após, lavou-se o material com água mili-Q por 5 vezes durante 2 minutos ainda em gelo. A desidratação do material realizou-se em concentrações crescentes de etanol (20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % e 2x em 100 %) por 20 minutos em cada concentração, sendo esta etapa realizada em gelo. Em seguida, realizou-se 2 trocas em acetona 100 % por 20 minutos cada na temperatura ambiente.

A embebição do material foi realizada em resina EPON e acetona (proporção de 1:1) à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação, após, realizou-se 5 trocas completas (1 hora cada, sendo uma delas overnight) com resina EPON pura a temperatura ambiente. A polimerização foi realizada à 60 °C em estufa controlada por 60-72 horas. Após a polimerização, os blocos de resina passaram pelo procedimento de trimagem (aproximação do plano de corte do tecido), cortes semi-finos (estabelecer o plano de corte exato a ser utilizado, 1 um de espessura), confecção dos grids para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e,

em seguida, cortes ultra-finos (80 nm) alocados nos grids. Após secar (em torno de 48 horas), seguiu para a MET.

5.10. Microscopia eletrônica de transmissão: conservação em resina LR White

Para a análise através de MET o material conservado em resina LR White os animais passaram pelo mesmo protocolo de sedação e perfusão, assim como o material coletado passou pelas mesmas etapas citadas no item anterior.

Após a coleta, os tecidos foram mantidos em “eppendorfs” com PFA 4 % e glutaraldeído 0,1 % “overnight” na temperatura de 4 °C (geladeira). Decorrido a fixação, o material foi lavado com tampão fosfato 0,1 M por 3 vezes durante 5 minutos cada em gelo. Realizou-se, em seguida, o bloqueio com tampão fosfato 0,1 M e glicina 0,2 M por uma hora em gelo e, passado este período, o material foi lavado com água mili-Q por 3 vezes durante 5 minutos cada ainda em gelo. A desidratação do material realizou-se em concentrações crescentes de etanol (20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % e 2 x em 100 %) por 30 minutos em cada concentração, sendo esta etapa realizada dentro do freezer (-20 °C) com recipiente imerso em etanol previamente resfriado.

A embebição do material foi realizada em resina LRWhite e etanol (proporção de 1:1) à temperatura ambiente, por 1 hora sob agitação. Realizaram-se 5 trocas completas (1 hora cada, sendo uma delas overnight) com resina LRWhite pura e balanceada (pH ajustado com etanolamina) à 20 °C. Na última troca, adicionou-se 80 µL de catalizador para 10 ml de resina LR White pura e balanceada, e o material foi mantido sob vácuo e deixado polimerizando em sob luz UV por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de resina passaram pelo mesmo procedimento da trimagem até os cortes ultra-finos como no material da resina EPON. Após secar (em torno de 48 horas), o material seguiu para técnica de imunogold.

5.10.1. Técnica de imunogold

Para realização da técnica de imunogold, os grids contendo os cortes foram lavados com água ultra-pura (em gotas) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após, foram pré-incubados com tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) contendo glicina 0,05 %, BSA 1 % e triton X-100 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente (Figura 01). O anticorpo primário foi diluído em tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) contendo glicina 0,01 %, BSA 0,2 % e triton X-100 0,02 %, overnight em geladeira (4 °C).

No dia seguinte, os grids foram lavados com a solução de diluição dos anticorpos primários por 3 vezes durante 5 minutos cada. Consecutivamente, a mesma solução dos

anticorpos primários, foi utilizada para diluição dos anticorpos secundários (1:100, anti-rabbit), sendo os “grids” incubados por 1 hora em temperatura ambiente nesta solução contendo os anticorpos secundários ligados a partículas de ouro de 10 nm. Em seguida, os grids foram lavados com tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) por 3 vezes durante 5 minutos, logo após, três lavagens com água ultra-pura por 5 minutos cada e lavagem por gotejamento suave, escoando o excesso de água com papel filtro, deixando secar os grids por no mínimo 10 minutos. A contrastação do material foi realizada com acetato de uranila por 2 minutos e citrato de chumbo por 20 segundos seguindo-se para avaliação no microscópio eletrônico de transmissão.

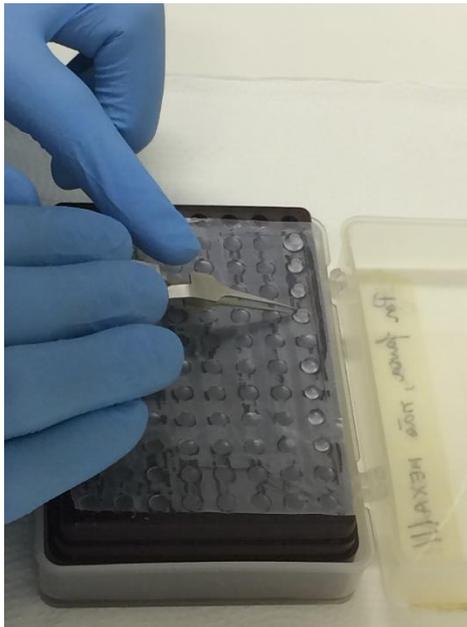


Figura 01 – Ilustra o momento das lavagens, em gotas de água mili-Q, dos grids contendo os cortes ultrafinos previamente à microscopia eletrônica de transmissão.

5.11. Anticorpos utilizados

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e para técnica de western blot (WB) os anticorpos utilizados foram:

- Anticorpo contra a subunidade NR1 do receptor NMDA = Anti-NMDA Receptor 1 (GluN1) (MET 1:250; WB 1:500, rabbit policlonal; Alomone Labs AGC-001).
- Anticorpo contra a subunidade NR2b do receptor NMDA = Anti-NMDA Receptor 2B (GluN2B) (MET 1:250, rabbit policlonal; Alomone Labs AGC-003).
- Anticorpo contra o receptor P2X₇ = Anti-P2X₇R (MET 1:250; rabbit policlonal; Alomone Labs APR-004).
- Anticorpo contra o receptor P2X₇ = Anti-P2RX₇ antibody (WB 1:600; rabbit policlonal; Abcam ab109054).

5.12. Análise estatística

Todos os resultados estão apresentados como média \pm EPM de n observações independentes. As comparações estatísticas foram feitas usando o software estatístico GraphPad Prism 5.0. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Nos experimentos in vivo, a variável dependente foi a intensidade da hiperalgesia, expressa em gramas (g). Conforme especificado nas legendas das figuras, a ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey ou pelo teste t de Student não pareado foi realizada para comparar a intensidade da hiperalgesia ou o número de elevações da pata, entre diferentes grupos-tratados. Os resultados do Western Blot são expressos por unidades arbitrárias.

6. RESULTADOS

6.1. Histologia do GRD através de microscopia eletrônica de transmissão

A histologia do gânglio da raiz dorsal revelou-se muito diversificada, sendo observados corpos neuronais de diferentes tamanhos (Figura 02A), os quais, na maior parte das vezes apresentaram-se envoltos por células satélites (Figura 02A). Outras estruturas frequentemente encontradas foram axônios mielinizados e não mielinizados, fibroblastos, células de Schwann (Figura 02B), vasos sanguíneos e fibras de colágeno.

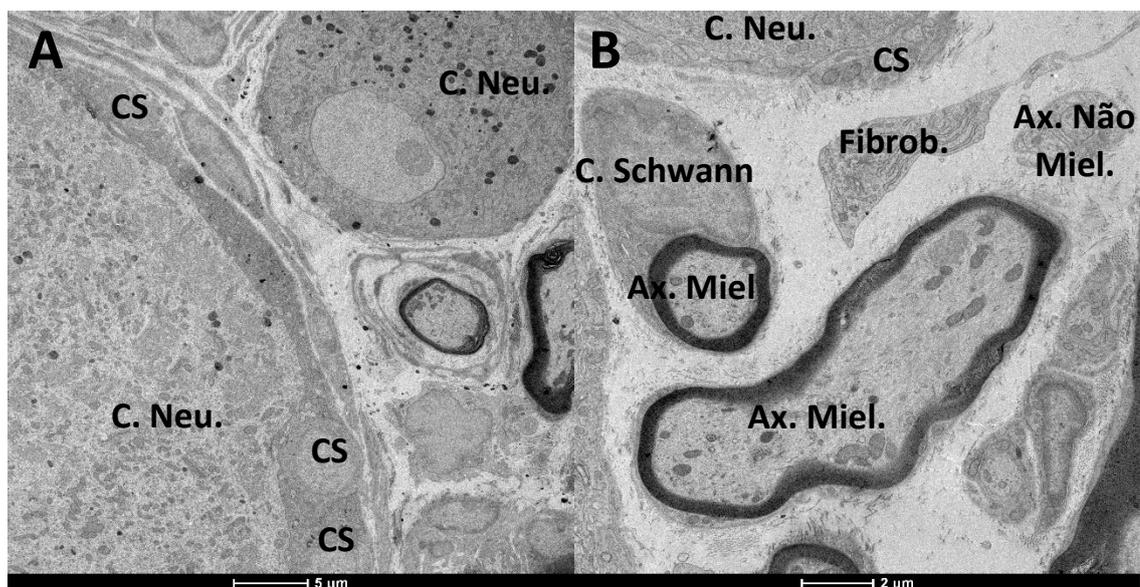


Figura 02 – Cortes histológicos do GRD em resina EPON mostrando diferentes células presentes no GRD através de MET. Corte histológico em resina epon, com contrastação em ósmio e visualização através de microscopia eletrônica de transmissão (A = 1200x, B 2900x). As siglas correspondem a: **C. Neu.** = corpo neuronal; **CS:** Células Satélites; **Fibrob.** = Fibroblasto; **Ax. Miel.** = Axônio mielinizado; **Ax. não Miel.** = Axônio não mielinizado; **C. Schwann** = Célula de Schwann.

6.1.1. Ultraestrutura de células neuronais do GRD

A análise da ultraestrutura do GRD revelou a presença de organelas bem delimitadas como mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, corpúsculos de Nissl (RER + ribossomos), complexo de Golgi e vesículas no citoplasma de neurônios (Figura 03).

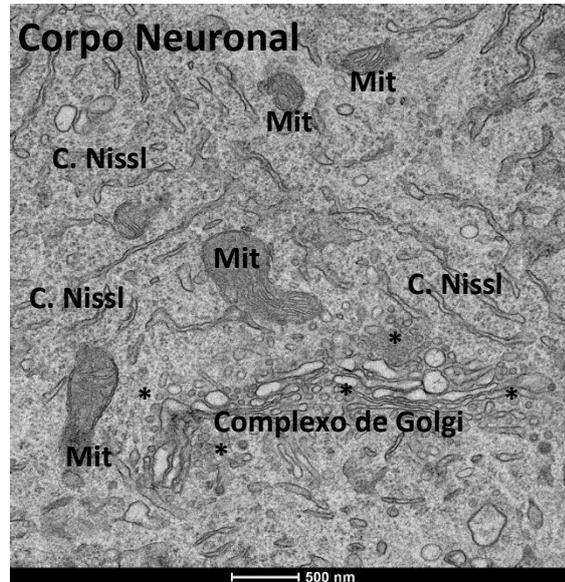


Figura 03 - Cortes histológicos do GRD em resina EPON mostrando diferentes organelas presentes no citoplasma do corpo neuronal. Corte histológico em resina epon, com contrastação em ósmio e visualização através de microscopia eletrônica de transmissão (11.000x). As siglas correspondem a: **Mit.** = Mitocôndria; **C. Nissl** = Corpúsculos de Nissl; *: Vesículas.

6.1.2. Ultraestrutura de células satélites do GRD

Já as células satélites, são bem definidas por estarem muito próximas aos corpos neuronais, não sendo observado tecido conjuntivo entre ambas, além do núcleo ocupar grande parte do seu tamanho; seu citoplasma contém muitas mitocôndrias, corpúsculos de Nissl e complexo de Golgi (Figura 04). Entre os corpos neuronais e as células satélites são observadas interdigitações (Figura 05) e regiões mais eletrodensas indicativas de conexinas.

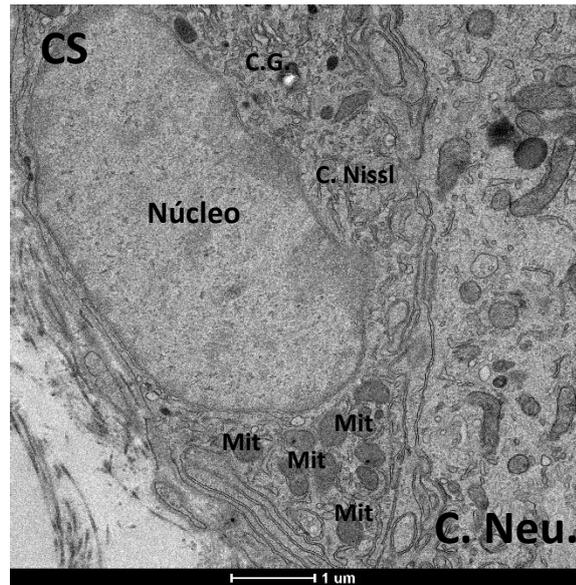


Figura 04 - Cortes histológicos do GRD em resina EPON mostrando diferentes organelas presentes no citoplasma de células satélites. Corte histológico em resina epon, com contrastação em ósmio e visualização através de microscopia eletrônica de transmissão (6.800x). As siglas correspondem a: **C. Neu.** = Corpo neuronal; **Mit.** = Mitocôndria; **C. Nissl** = Corpúsculos de Nissl; **C.G.** = Complexo de Golgi.

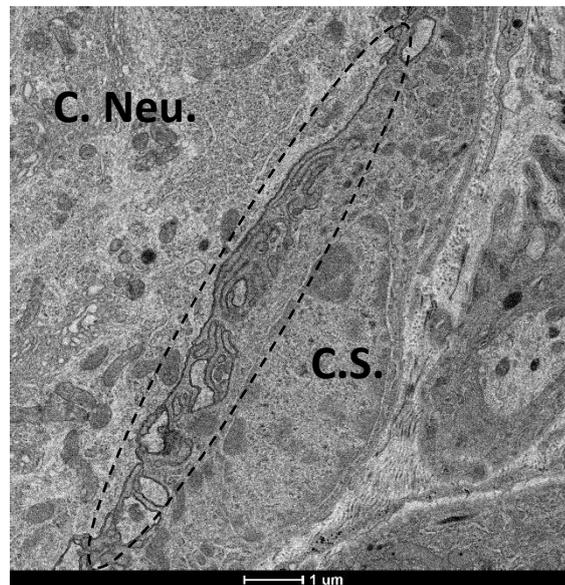


Figura 05 - Cortes histológicos do GRD em resina EPON mostrando as interdigitações (dentro do círculo tracejado) entre o corpo neuronal e células satélites. Corte histológico em resina epon, com contrastação em ósmio e visualização através de microscopia eletrônica de transmissão (4.800x). As siglas correspondem a: **C. Neu.** = Corpo Neuronal; **C.S.** = Células Satélites.

6.2. Localização das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA em células neuronais e células satélites do GRD

As subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA estão presentes em grande quantidade nos corpúsculos de Nissl dos corpos neuronais e células satélites e, em menor número, nas mitocôndrias dessas células (Figura 06D-I). Somado a isso, axônios mielinizados e não mielinizados também apresentaram marcação para ambas as subunidades (imagens não mostradas). Os cortes que foram submetidos apenas ao anticorpo secundário (Controle) não apresentaram marcação (Figura 06A-C).

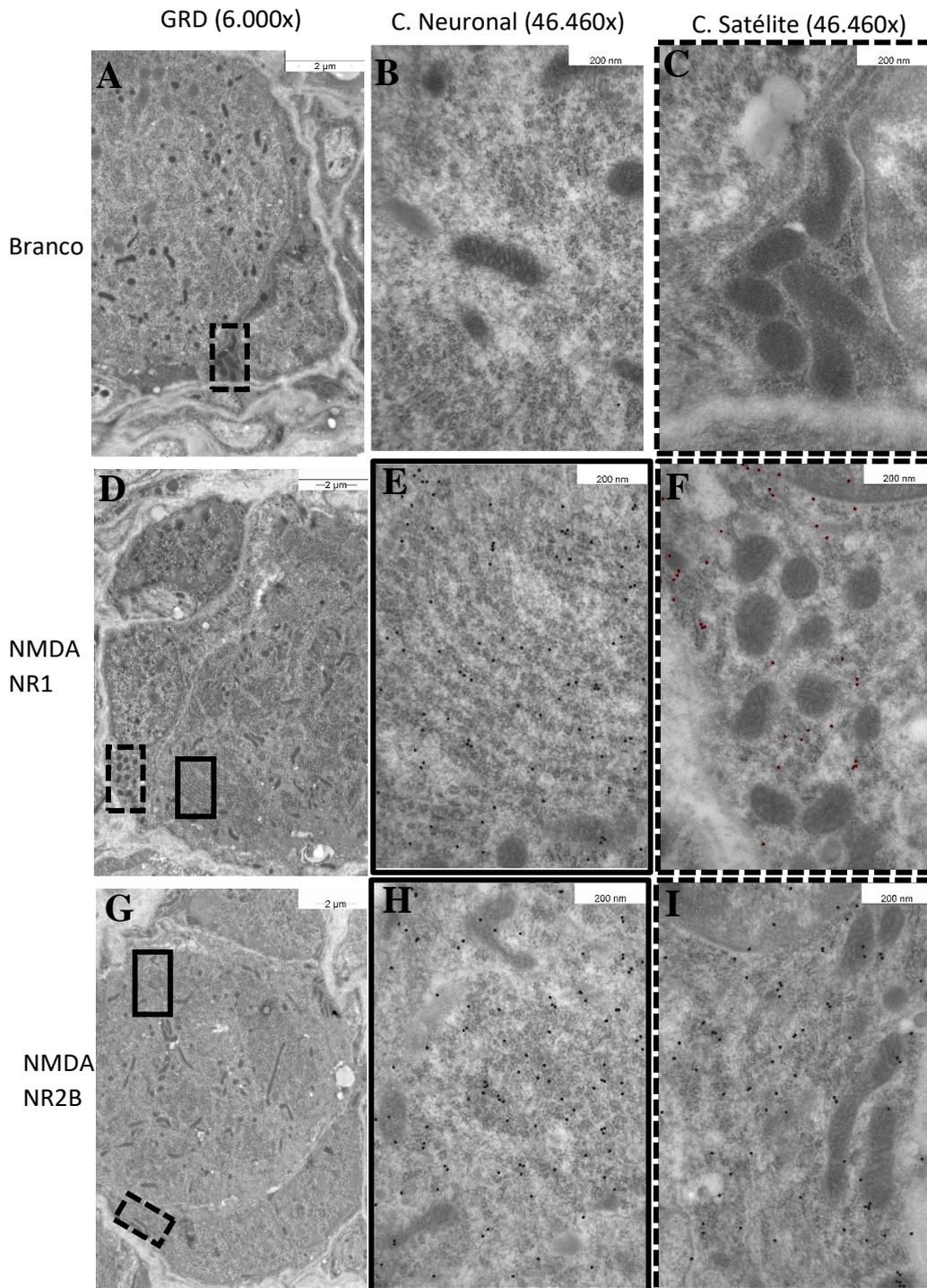


Figura 06 – Marcação das subunidades NR1 e NR2B nos corpos neuronais e células satélites do GRD. As imagens acima referem-se a cortes histológicos do GRD em resina LRWhite e observação através de MET. (A) GRD (6.000x); (B) Organelas do corpo neuronal (46.460x) apenas anticorpo secundário; (C) Organelas das células satélites (46.460x) apenas anticorpo secundário. (D) GRD (6.000x); (E) Organelas do corpo neuronal (46.460x), marcação para subunidade NR1 do receptor NMDA (1:250); (F) Organelas das células satélites (46.460x), marcação para subunidade NR1 do receptor NMDA (1:250). (G) GRD (6.000x); (H) Organelas do corpo neuronal (46.460x), marcação para subunidade NR2B do receptor NMDA (1:250); (I) Organelas das células satélites (46.460x), marcação para subunidade NR2B do receptor NMDA (1:250).

6.3. Localização do receptor P2X₇ em células neuronais e células satélites do GRD

Os receptores P2X₇, também apresentaram marcação nos corpúsculos de Nissl e mitocôndrias, tanto nos corpos neuronais como nas células satélites (Figura 7 A-F).

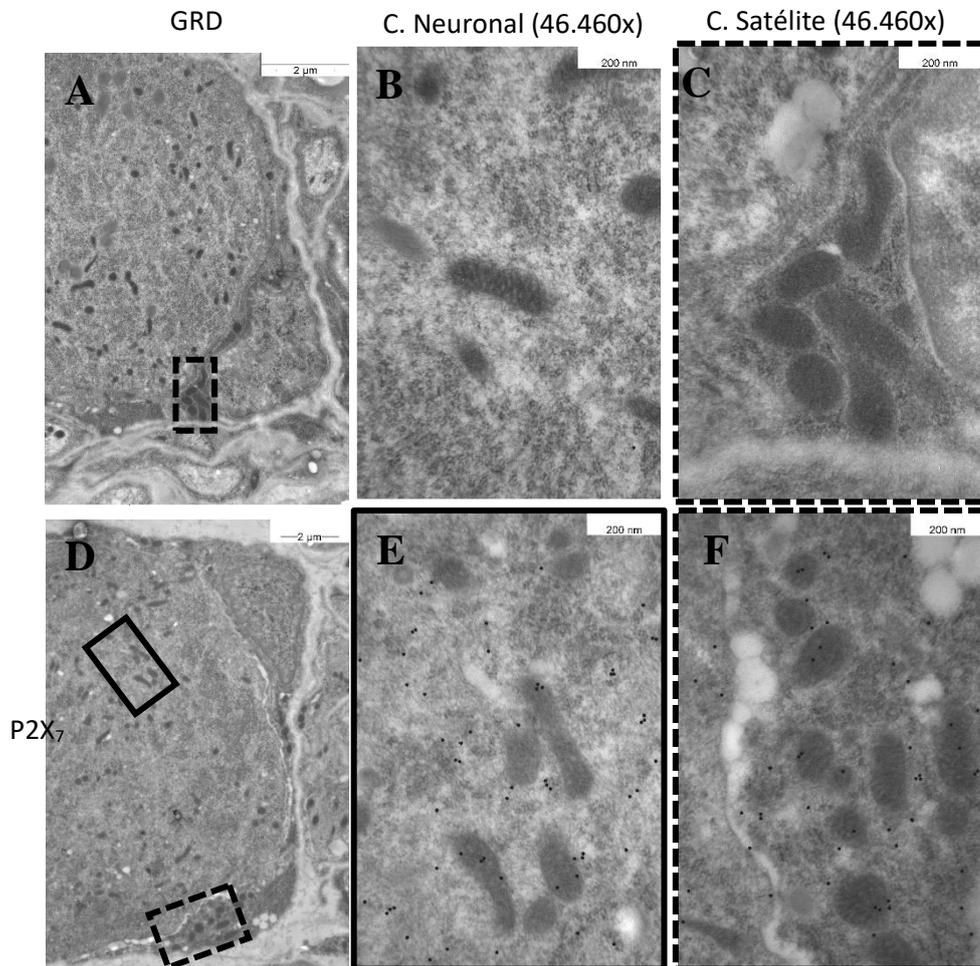


Figura 07 – Marcação dos receptores P2X₇ nos corpos neuronais e células satélites do GRD. As imagens acima referem-se a cortes histológicos do GRD em resina LRWhite e observação através de MET. (A) GRD (6.000x); (B) Organelas do corpo neuronal (46.460x) apenas anticorpo secundário; (C) Organelas das células satélites (46.460x) apenas anticorpo secundário. (D) GRD (7.750x); (E) Organelas do corpo neuronal (46.460x), marcação para receptor P2X₇ (1:250); (F) Organelas das células satélites (46.460x), marcação para receptor P2X₇ (1:250).

6.4. Correlação entre a ativação do receptor NMDA, P2X₇ e liberação de PGE₂ no GRD no desenvolvimento da hiperalgesia

Para correlacionar a ativação dos receptores NMDA e P2X₇ presentes no gânglio da raiz dorsal (GRD) com a liberação de PGE₂ no mesmo tecido, foram realizadas diminuições específicas da expressão da subunidade NR1 do receptor de NMDA, da expressão do receptor P2X₇ e da enzima COX2 através da administração ganglionar de oligodeoxinucleotídeo antisense (ODN-AS) para cada proteína. Após o tratamento com ODN-AS administrou-se pela

mesma via (gl.) os agonistas destes receptores (agonista NMDA, BzATP ou IL-1 β), a fim de se sugerir uma via de liberação destes agonistas no GRD envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia. Foram realizados testes de von Frey eletrônico para verificar as diminuições do limiar mecânico basal das patas de ratos submetidos aos tratamentos no GRD-L5 ipsilateral.

6.4.1. Participação do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração gl. de IL-1 β

O tratamento com ODN-AS contra NMDA NR1, mas não com a sequência ODN-Mismatch (20 μ g em 3 μ L, 1 vez ao dia por 5 dias) diminuiu 47,9 % a expressão da subunidade NR1 nas células do GRD (Figura 08B e C). Como demonstrado na figura 08A, a diminuição da subunidade NR1 do receptor NMDA do GRD não interferiu na hiperalgesia induzida pela IL-1 β .

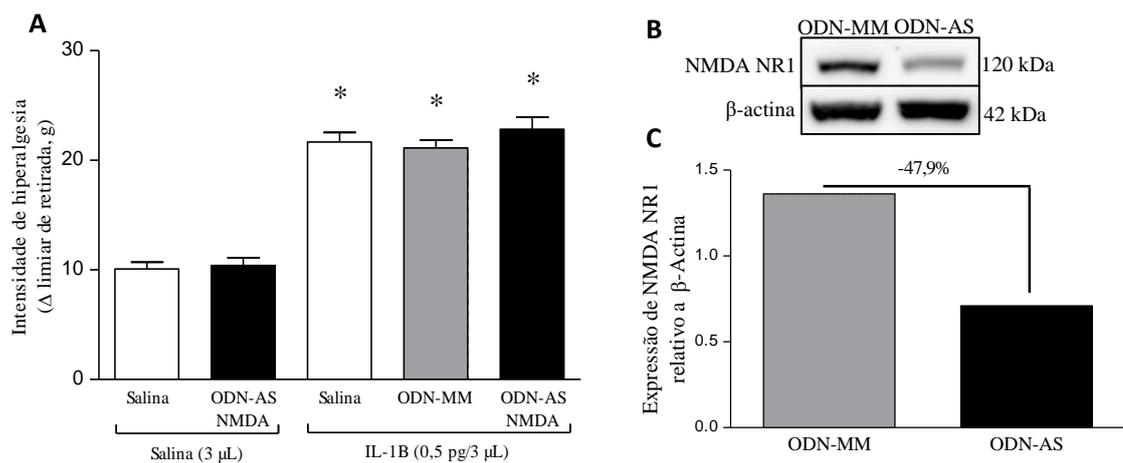


Figura 08 - A diminuição da expressão da subunidade NR1 do receptor NMDA presente no GRD, não interferiu na hiperalgesia induzida pela IL-1 β . (A) Administrou-se, ODN-AS contra subunidade NR1 do receptor NMDA ou ODN-Mismatch no GRD-L5 durante 5 dias consecutivos. Quinze horas após a última administração, os animais foram tratados com IL-1 β pela via gl. e, na terceira hora após o estímulo inflamatório, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado através do von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm. O símbolo "*" indica diferença estatística do grupo Salina e ODN-AS NMDA sem tratamento ($p < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste Tukey, $n = 6$). (B) Imagem da membrana de PVDF na qual foi realizada Western Blot para observação da redução da proteína alvo; (C) representação gráfica da redução da quantidade de proteína.

6.4.2. Participação da enzima COX-2, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de agonista NMDA

A administração de agonista NMDA no GRD induziu hiperalgesia mecânica de maneira dose-dependente (Figura 9). Observou-se hiperalgesia na dose de 240 ng/3 μ L

submáxima e, portanto, utilizada nos demais experimentos envolvendo indução de hiperalgesia pela administração ganglionar de NMDA.

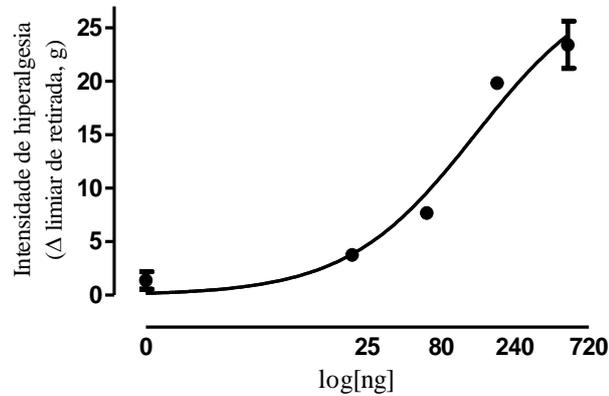


Figura 09 - As doses de 240 e 720 ng/3 μ L do agonista NMDA pela via gl., mostraram-se eficazes na indução da hiperalgesia mecânica inflamatória no GRD. O NMDA foi administrado em doses crescentes pela via gl.. A intensidade da hiperalgesia mecânica inflamatória foi avaliada na terceira hora após a administração, por meio de von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm (n=6) (Degrees of freedom= 17, $R^2=95$, Absolute Sum Square= 113, $p<0,05$).

O tratamento com ODN-AS contra COX-2, mas não com a sequência ODN-Mismatch (30 μ g em 3 μ L, 1 vez ao dia por 4 dias) diminuiu 47,8 % a expressão da enzima COX-2 nas células do GRD (Figura 10B e C). Como demonstrado na figura 10A, a administração gl. de NMDA (240 ng/3 μ L) não foi capaz de induzir hiperalgesia em ratos tratados com ODN-AS contra COX-2, mas sim nos grupos tratados com salina (3 μ L/gl.) ou sequência ODN-Mismatch contra COX-2.

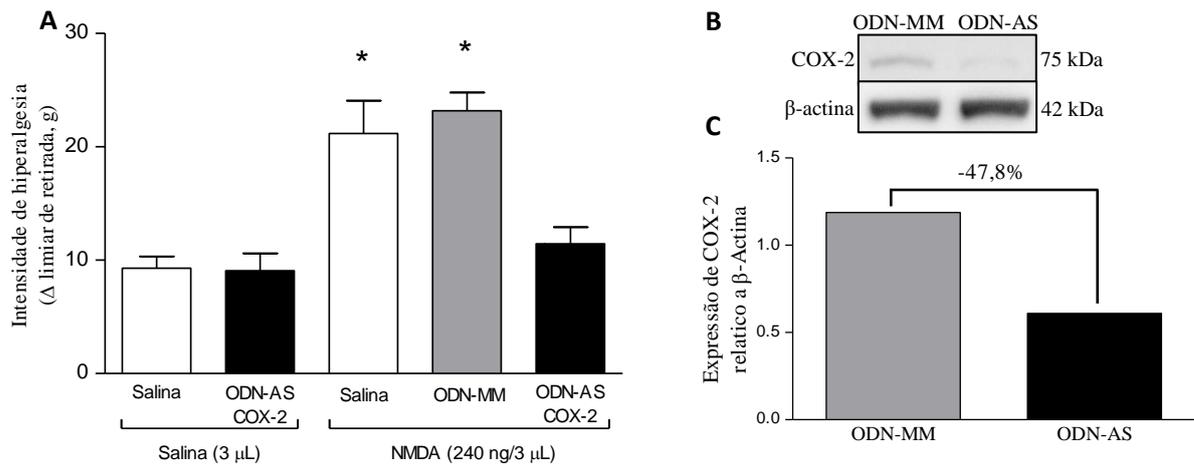


Figura 10 – A administração de ODN-AS contra a enzima COX-2 inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista NMDA no GRD. (A) Administrou-se salina, ODN-AS contra COX-2 ou ODN-Mismatch no GRD-L5 por 4 dias consecutivos. Após 15 horas da última administração de ODN-AS, os animais receberam agonista NMDA pela via gl. e avaliou-se a intensidade de hiperalgesia mecânica, 3 horas após, através do von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm. O símbolo "*" indica diferença estatística dos grupos salina, ODN-AS COX-2 e ODN-AS COX-2 + NMDA ($p < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste Tukey, $n = 6$). (B) Imagem da membrana de PVDF na qual foi realizada Western Blot para observação da redução da proteína alvo; (C) representação gráfica da redução da quantidade de proteína.

6.4.3. Participação do receptor NMDA, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de BzATP

Para obter esta resposta, foi necessário primeiramente obter as curvas dose/resposta e tempo/resposta do agonista P2X₇ (BzATP) (Figura 11). A curva tempo/resposta indicou haver hiperalgesia no tempo 0,5 horas, sendo mesmo utilizado para posteriores experimentos. Os dados obtidos na curva dose/resposta indicaram indução de hiperalgesia com doses de 100, 500 e 1000 nM/3 μL.

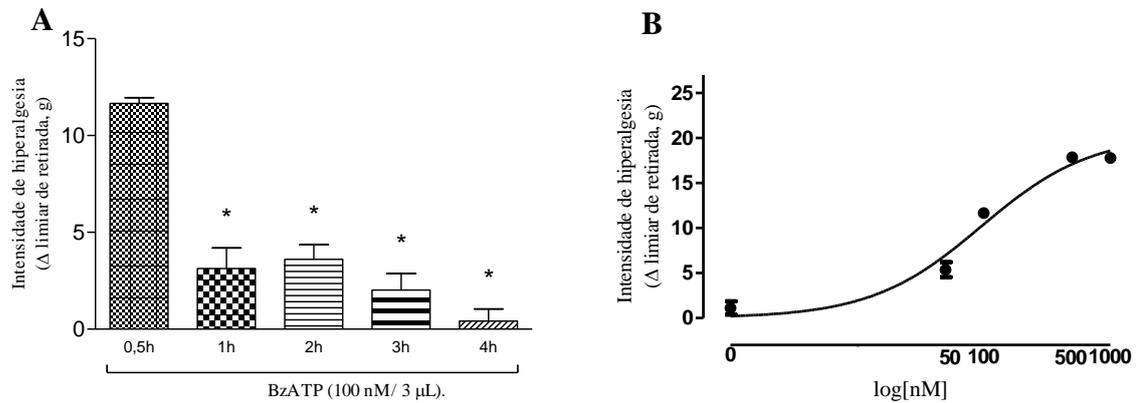


Figura 11 - A hiperalgesia mecânica foi induzida pelo BzATP nas doses de 100, 500 e 1000 nM/3 µL, assim como no tempo de 0,5 horas no GRD. (A) A curva tempo/resposta foi avaliada de maneira crescente (0,5, 1, 2, 3 e 4 horas) após a administração de BzATP. **(B)** O agonista do receptor P2X₇ foi administrado em doses crescentes (0, 50, 100, 500 e 1000 nM/3 µL). Ambas as curvas foram obtidas através de injeções ganglionares e a hiperalgesia mecânica foi avaliada através do método de von Frey eletrônico. Em (A) O símbolo "*" indica diferença estatística do grupo 0,5h. (B) (Degrees of freedom= 22, R²=95, Absolute Sum Square= 62, n = 6).

O tratamento ganglionar com ODN-AS contra a subunidade NR1 do receptor de NMDA (20 µg/3 µL 1 vez ao dia, durante 4 dias) diminuiu 48,9 % a expressão desta proteína no GRD-L5 quando comparado com o tratamento com seu ODN-Mismatch (Figura 12B e C). Contudo, a diminuição da expressão da subunidade NR1 não alterou a resposta hiperalgésica mecânica obtida com a administração ganglionar de BzATP (100 ng/3µL) (Figura 12A).

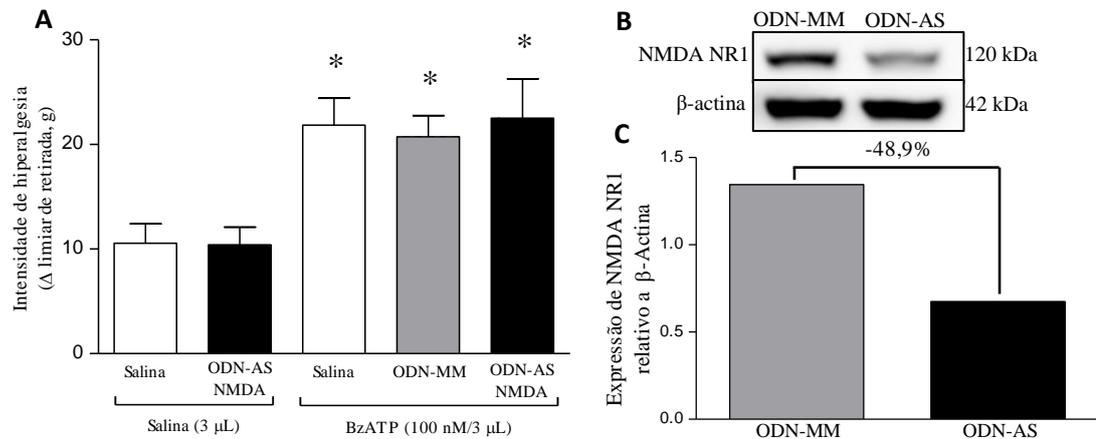


Figura 12 - A diminuição da subunidade NR1 do receptor NMDA não interferiu na hiperalgesia mecânica induzida pelo BzATP no GRD. (A) Administrou-se salina, ODN-AS contra a NMDA NR1 ou seu ODN-Mismatch no GRD-L5 por 5 dias consecutivos. Quinze horas após a última administração, os animais foram tratados com BzATP pela via gl. e a hiperalgesia mecânica foi avaliada trinta minutos após através do von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm. O símbolo "*" indica diferença estatística entre o grupo tratado com salina e ODN-AS NMDA não tratado ($p < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste Tukey, $n = 6$). (B) Imagem da membrana de PVDF na qual foi realizada Western Blot para observação da redução da proteína alvo; (C) representação gráfica da redução da quantidade de proteína.

6.4.4. Participação do receptor $P2X_7$, presente no GRD, na hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de NMDA

O tratamento ganglionar com ODN-AS contra o receptor $P2X_7$ ($35 \mu\text{g}/3\mu\text{L}$ 1 vez ao dia durante 4 dias) diminuiu 52,9 % a expressão desta proteína no GRD-L5 quando comparado com o tratamento com seu ODN-Mismatch (Figura 13B e C). A diminuição da expressão do receptor $P2X_7$ reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela administração ganglionar de NMDA ($240 \text{ ng}/3\mu\text{L}$) (Figura 13A).

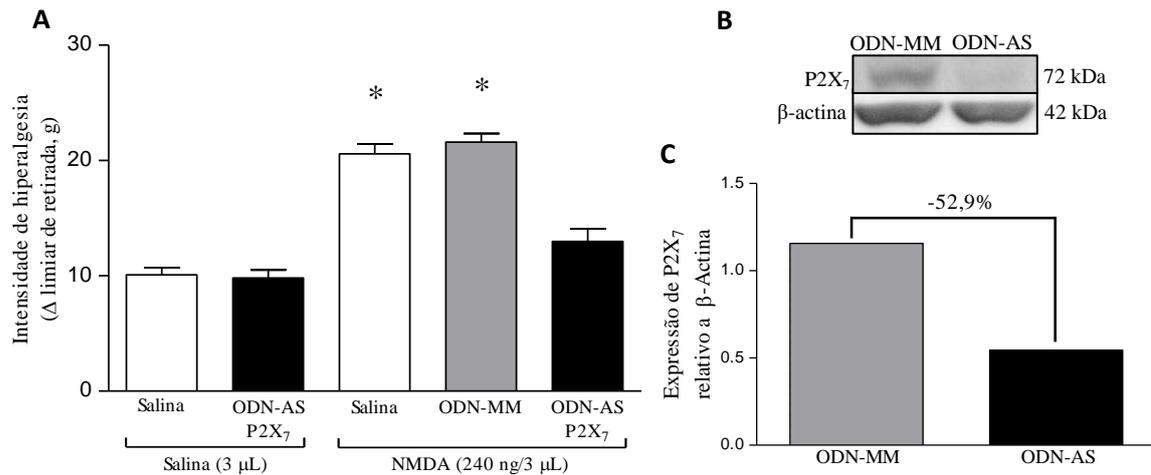


Figura 13 – A administração de ODN-AS contra o receptor P2X₇ inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pelo agonista NMDA no GRD. (A) Administrou-se salina, ODN-AS contra P2X₇ ou ODN-MM no GRD-L5 durante 4 dias consecutivos. Quinze horas após a última administração, os animais foram tratados com agonista NMDA pela via gl. e após três horas, avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm. O símbolo "*" indica diferença estatística entre o grupo tratado com salina e ODN-AS P2X₇ e ODN-AS P2X₇+NMDA ($p < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $n = 6$). (B) Imagem da membrana de PVDF na qual foi realizada Western Blot para observação da redução da proteína alvo; (C) representação gráfica da redução da quantidade de proteína.

6.4.5. Envolvimento da fibra C na hiperalgesia mecânica induzida pela ativação do receptor NMDA no GRD

Para verificar o envolvimento das fibras nociceptivas tipo C no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela ativação do receptor de NMDA no GRD, ratos anestesiados foram tratados com uma única administração intratecal de capsaicina (10 μ g/10 μ L) a fim de destruir as fibras C. Os animais tratados com dose alta de capsaicina intratecal 48 horas antes da administração ganglionar de NMDA (240 ng/3 μ L), não apresentaram hiperalgesia após a administração do agonista quando comparados com ratos tratados com salina (10 μ L) intratecal. Não houve diferença na resposta nociceptiva basal entre ratos tratados com capsaicina (10 μ g/10 μ L) e salina (10 μ L) intratecal (Figura 14).

O tratamento com capsaicina intratecal (10 μ g/10 μ L) degenerou grande parte das fibras tipo C, reduzindo aproximadamente 50 % do número de *flinchs* após administração de capsaicina (0,5 μ g/pata) no tecido subcutâneo da pata (Figura 15).

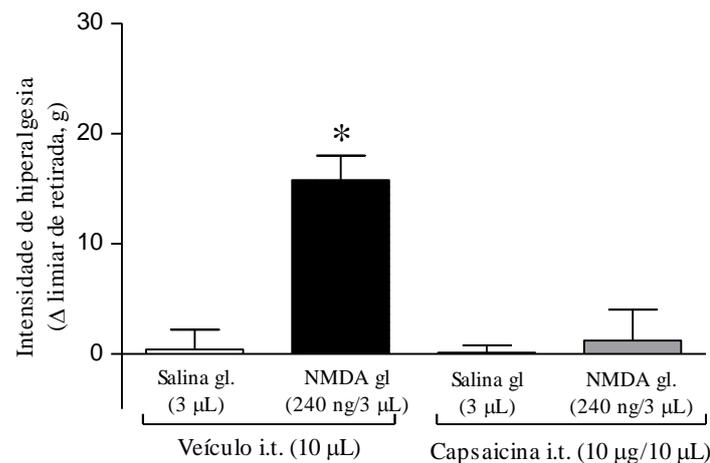


Figura 14 – Redução da hiperalgesia mecânica proveniente da administração gl. de agonista NMDA após destruição das fibras C. Administrou-se capsaicina ou veículo pela via intratecal, destruindo assim as fibras C. Passados 48 horas, administrou-se agonista NMDA ou veículo pela via ganglionar e, após 3 horas, avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico. As barras representam a média \pm epm. O símbolo "*" indica diferença significativa entre o grupo Veículo + Salina ($P < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $n = 6$).

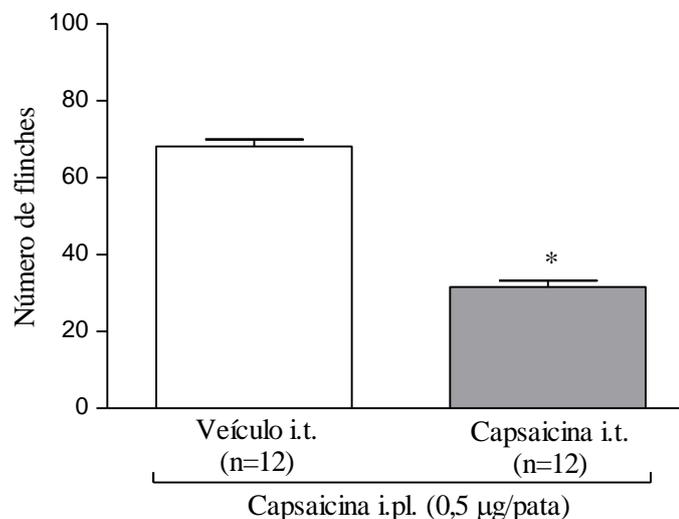


Figura 15 - Os grupos que receberam capsaicina i.t. tiveram suas fibras C destruídas e reduziram sua resposta frente a capsaicina intraplantar. Administrou-se capsaicina (10 μg/10 μL) ou salina (10 μL) intratecal para avaliação do efeito do agonista NMDA. Após 6 horas do mesmo, administrou-se capsaicina (0,5 μg/0,05 ml/pata) para confirmação da destruição das fibras C. Dados estão expressos como média \pm epm. "*" indica diferença significativa do grupo controle (veículo) calculada pelo Teste t ($P < 0,05$, $n = 12$).

6.4.6. Participação do receptor NMDA do GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina

Para verificar a participação dos receptores NMDA presentes no GRD na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de carragenina periférica,

administrou-se o agente hiperalgésico ou seu veículo pela via i.pl., e após 2h administrou-se MK801 (antagonista NMDA) ou seu veículo pela via ganglionar. Passados 1h da última administração, avaliou-se a hiperalgesia por meio do teste de von Frey eletrônico. A inibição do receptor NMDA no GRD impediu a instalação da hiperalgesia inflamatória periférica quando comparados com seus grupos controles (Figura 16).

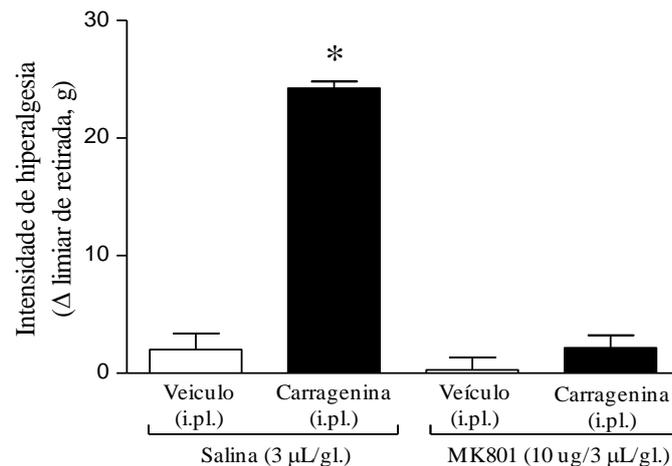


Figura 16 – A administração do antagonista dos receptores NMDA gl. inibiu a hiperalgesia inflamatória periférica induzida pela carragenina i.pl. Administrou-se carragenina ou seu veículo pela via intraplantar, e após 2 horas, administrou-se o antagonista dos receptores NMDA (MK801) ou seu veículo. Após 1 hora, da última administração, avaliou-se a hiperalgesia mecânica através do von Frey eletrônico. As barras representam a média ± epm. O símbolo "*" indica diferença significativa do grupo Veículo + Salina ($P < 0,05$, One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $n = 6$).

6.5. Estudo da correlação entre os receptores de NMDA e P2X₇ vista a partir do influxo de Ca²⁺ observado em células do GRD mantidas em cultura

Neste conjunto de experimentos a interação entre os receptores NMDA e P2X₇ foi estudada em cultura de células do GRD quanto ao influxo de Ca²⁺ gerado pelos corpos neuronais e células satélites.

6.5.1. Efeito do antagonista do receptor P2X₇ (A-740003) no influxo de Ca²⁺ gerado pelo agonista NMDA em células neuronais e células satélites do GRD

O agonista NMDA (500 μM) foi administrado na cultura antes (primeiro estímulo) e depois (segundo estímulo) do tratamento com o antagonista seletivo de P2X₇ (A-740003 por 10 minutos). Os neurônios considerados foram aqueles responsivos a capsaicina, diferindo das células satélites em intensidade de resposta, frente à capsaicina, e maior tamanho. As células

satélites consideradas foram aquelas que estavam junto aos neurônios possuindo um formato arredondado. O intervalo de 3 segundos foi considerado o tempo basal para ambas as células. A administração de agonista NMDA induziu influxo de Ca^{2+} tanto em neurônios quanto em células satélites. Contudo, como demonstrado na figura 17A e 17B, agonista NMDA induziu influxo de Ca^{2+} primeiro em neurônios (imediatamente após sua administração) e posteriormente nas células satélites (aproximadamente 5 segundo após sua administração). Como demonstrado na figura 17, a administração na cultura de A-740003 não alterou o influxo de cálcio induzido pelo agonista NMDA (segundo estímulo) em neurônio (Figura 17B, linha azul pontilhada) e células satélites (Figura 17A, linha azul pontilhada), quando comparado com o primeiro estímulo (Figura 17 A e B, linha azul contínua). Não foram observadas diferenças entre os estímulos de NMDA em culturas de GRD tratadas A740003 (Figura 17A e B, linhas em azul) frente as culturas tratadas com solução Hanks (controle; Figura 17A e 17B, linhas em vermelho).

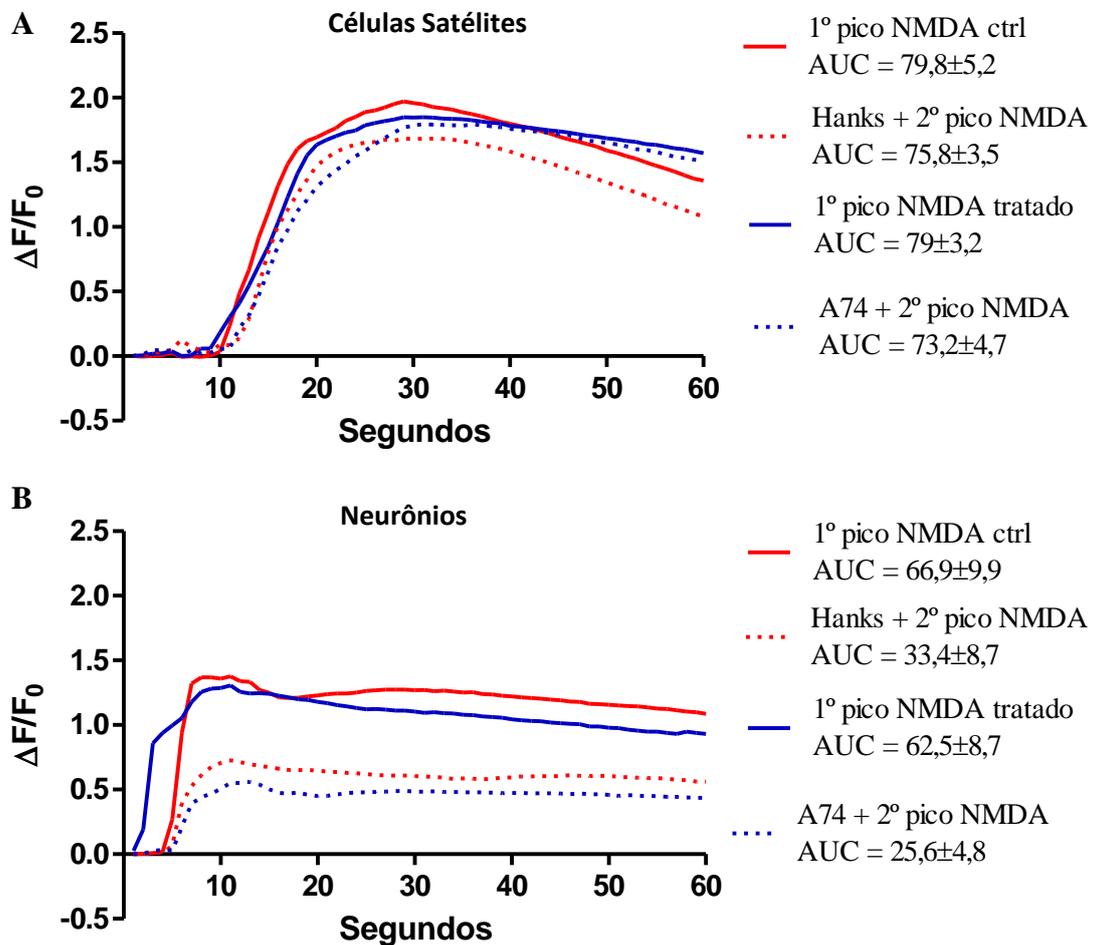


Figura 17 – O antagonista dos receptores P2X₇ não apresentou influência sobre o influxo de cálcio intracelular gerado pelo agonista dos receptores NMDA nas células satélites e nos corpos neuronais. Gráficos representativos do efeito do antagonista A740003 (100 μM) (curvas em azul) ou seu controle (curvas em vermelho) sobre o influxo de cálcio intracelular observado no segundo estímulo com agonista NMDA (500 μM) em uma cultura, através da variação de fluorescência em células satélites (A, 20-40 células por placa, n=6) e neurônios (B, 5-10 células por placa, n = 8). Foram considerados apenas os neurônios responsivos ao estímulo final de capsaicina (5 μM). AUC = área sob a curva (teste t, P<0.05).

6.5.2. Efeito do antagonista do receptor NMDA (MK-801) no influxo de Ca²⁺ gerado pelo BzATP em neuronais e células satélites do GRD

O agonista dos receptores P2X₇ (BzATP, 8 μM) foi administrado na cultura antes (primeiro estímulo) e depois (segundo estímulo) do tratamento com o antagonista de receptor NMDA (MK801 por 10 minutos). Foram realizadas as mesmas padronizações para células neuronais e satélites, assim como, para o tempo basal citados no item anterior. A administração de BzATP induziu influxo de Ca²⁺ tanto em neurônios quanto em células satélites. Contudo, o

BzATP induziu influxo de Ca^{2+} primeiro em neurônios (imediatamente após sua administração) e posteriormente nas células satélites (aproximadamente 5 segundo após sua administração) (Figura 18A e 18B). Além disso, a magnitude da resposta ao BzATP em células satélites foi visivelmente maior quando comparada à resposta em neurônios. Como demonstrado na figura 18 e 19, a administração na cultura de MK-801 não alterou o influxo de cálcio induzido pelo BzATP (segundo estímulo) em neurônio (Figura 18B, linha azul pontilhada), porém reduziu acentuadamente o influxo de Ca^{2+} nas células satélites (Figura 18A, linha azul pontilhada), quando comparado com o primeiro estímulo (Figura 18A e B, linha azul contínua). Com exceção das células satélites tratadas com MK801, não foram observadas diferenças entre os estímulos de BzATP em culturas de GRD tratadas com MK801 (Figura 18A e B, linhas em azul) frente as culturas tratadas com solução Hanks (controle; Figura 18A, 18B, linhas em vermelho).

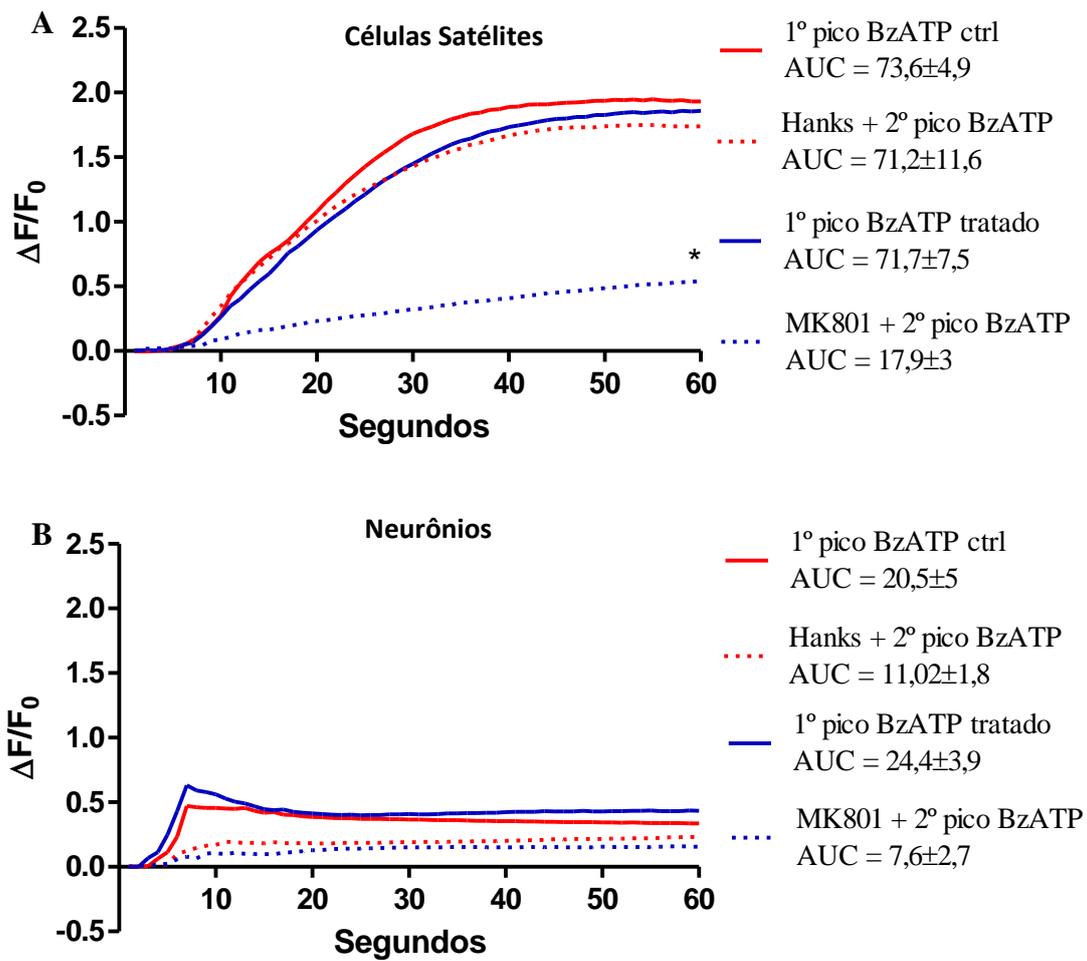


Figura 18 – O antagonista dos receptores NMDA (MK801) diminuiu o influxo de cálcio intracelular gerado pelo agonista dos receptores P2X₇ nas células satélites e não apresentou influência sobre o mesmo nos corpos neuronais. Gráficos representativos do efeito do antagonista MK801 (400 μ M) (curvas em azul) ou seu controle (curvas em vermelho) sobre o influxo de cálcio intracelular observado no segundo estímulo com agonista BzATP (8 μ M) em uma cultura, através da variação de fluorescência em células satélites (A, 20-40 células por placa, n=6) e neurônios (B, 5-10 células por placa, n = 8). Foram considerados apenas os neurônios responsivos ao estímulo final de capsaicina (5 μ M). “*” indica diferença significativa entre o primeiro e segundo estímulo. AUC = área sob a curva (teste t, P<0.05).

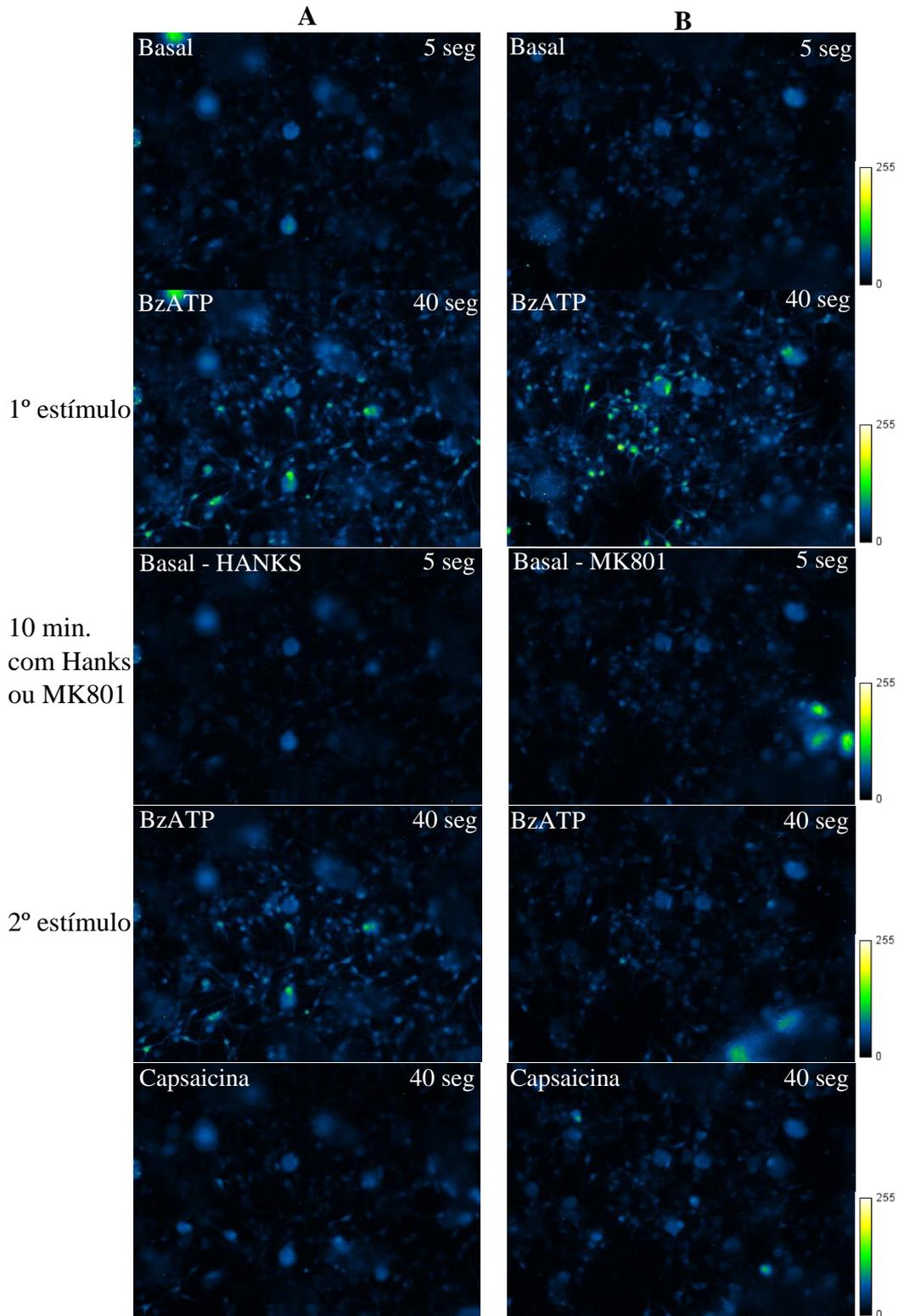


Figura 19 – Diminuição do influxo de cálcio, gerado pelo BzATP, das células satélites presentes no GRD após incubação com MK801. As duas colunas representam imagens em série temporal mostrando a variação de fluorescência nas células satélites da mesma cultura. **A:** cultura que recebeu 2 estímulos com BzATP ($8 \mu\text{M}/\mu\text{L}$) e entre esses foi incubada com Hanks (10 min.), após o 2° estímulo recebeu capsaicina ($5 \mu\text{M}/\mu\text{L}$). **B:** cultura que recebeu 2 estímulos com BzATP ($8 \mu\text{M}/\mu\text{L}$) e entre esses foi incubada com MK801 ($400 \mu\text{M}/\mu\text{L}$, 10 min.), após o 2° estímulo recebeu capsaicina ($5 \mu\text{M}/\mu\text{L}$).

7. DISCUSSÃO

Nossos achados sugerem um crosstalk, nas células do gânglio da raiz dorsal (GRD), entre receptores NMDA, P2X₇ e enzima COX-2, no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico. Além disso, nossos resultados sugerem que, no GRD, o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória é desencadeado pela ativação de receptores NMDA que, por sua vez, orquestra um crosstalk entre os neurônios, em especial as fibras C não mielinizadas, e as células satélites. É importante ressaltar que trabalhos previamente realizados mostram a importância dos receptores NMDA NR1, NR2B, NR2D e NR3A no desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória periférica (Castillo et al. 2013; Ferrari et al. 2014), contudo em nosso estudo, correlacionamos o papel do receptor NMDA com a enzima COX-2 e receptor P2X₇ no desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória periférica.

Poucos estudos foram realizados buscando a interação entre os receptores no GRD (Pannese et al. 2003; Gu et al. 2010; Li-Yen M. Huang et al. 2013; Costa z& Moreira Neto 2015), principalmente devido à complexidade e grandes lacunas existentes em relação ao papel específico de cada receptor na fisiopatologia da hiperalgesia inflamatória. No entanto, nossos dados *in vivo* indicam que o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico ocorre após a ativação dos receptores NMDA no GRD, com consequente liberação de ATP, que através da ativação dos receptores P2X₇, estimula a liberação de IL-1 β (Ferrari et al. 2006; Stoffels et al. 2015). Essa citocina, após liberada, ativa a enzima COX-2, aumentando a produção de PGE₂ no GRD, sensibilizando os neurônios sensoriais periféricos via receptores EP4 e EP2 (Araldi et al., 2013). Esses eventos ocorrem nas células do GRD e parecem ser importantes para o desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória periférica. No entanto, a via de sinalização após a ativação de receptores NMDA, nas células do GRD, continua por ser estabelecida.

Anteriormente, Araldi et al. (2013) mostraram que a liberação de IL-1 β , ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) e, consequente liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) no GRD, são importantes eventos para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico. Dados de nosso estudo demonstraram que a diminuição da expressão dos receptores de NMDA nas células do GRD pelo tratamento com oligodeoxinucleotídeo-antisense (ODN-AS) não alteraram a hiperalgesia induzida pela administração de IL-1 β no GRD (L5). Ao contrário, a diminuição da expressão de COX-2 no GRD pelo tratamento com ODN-AS bloqueou o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela administração de agonista NMDA gl., efeito não observado no grupo ODN-Mismatch (ODN-MM). Estes dados indicam que a

liberação de glutamato pela estimulação neuronal precede a liberação de IL-1 β e a subsequente liberação de PGE₂ no GRD, eventos importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico (Araldi et al. 2013). Gardoni et al. (Gardoni et al. 2011) demonstraram uma interação dinâmica e funcional entre os receptores NMDA e IL-1 β (IL-1RI), em neurônios hipocampais primários, que poderiam fornecer uma base molecular para a IL-1 β como um neuromodulador em eventos patológicos e fisiológicos depende da ativação do NMDAR. Nossos dados estão de acordo com o estudo de Gardoni et al. (Gardoni et al. 2011), uma vez que observamos um crosstalk entre os receptores NMDA e COX-2, enzima essa ativada através da interação com a IL-1 β , para o desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória no tecido periférico.

Estudos mostram que a ativação de receptores P2X₇ em células do GRD induz a maturação e liberação de IL-1 β (Ferrari et al. 2006; Stoffels et al. 2015). Nossos resultados demonstraram que a diminuição na expressão de receptores NMDA, em células do GRD, não afetou na hiperalgesia inflamatória induzida pelo BzATP. No entanto, a diminuição da expressão do receptor P2X₇ através do tratamento com ODN-AS atenuou acentuadamente o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela administração de agonista NMDA gl., fato não observado em seu grupo controle (ODN-MM). Da mesma forma, na microglia hipocampal e em células gliais de Muller da retina, foi demonstrado que a ativação de receptores NMDA induz a liberação de ATP (Dissing-Olesen et al. 2014; Loiola & Ventura 2011), indicando desta maneira, que a liberação de ATP ocorre após ativação de receptores NMDA. Enquanto no sistema nervoso central a liberação de glutamato pela sinapse neuronal é um mecanismo excitatório comum (Bliss & Collingridge 1993), no GRD este fenômeno não é tão evidente uma vez que não há sinapse elétrica neuronal no sistema nervoso periférico. Entretanto, transportadores de glutamato vesicular foram detectados no gânglio da raiz dorsal, indicando sua liberação neste tecido neuronal por neurônios aferentes primários e células satélites (Oliveira et al. 2003; Brumovsky et al. 2007; Malet et al. 2013; Wang et al. 2016).

É notório, contudo, que o tratamento com ODN-AS diminuiu a expressão de NMDA, COX-2 e P2X₇ nas células do GRD em aproximadamente 50% quando comparado com o tratamento com ODN-MM. Ao mesmo tempo, o tratamento com ODN-AS contra a enzima COX-2 e os receptores P2X₇ mantiveram o limiar nociceptivo mecânico nos níveis basais, isto é, inibiu completamente a hiperalgesia induzida pela administração gl. dos agonistas. Esta resposta pode ser explicada pela diminuição do recrutamento de neurônios sensoriais aferentes, que culminam em um menor estímulo nos neurônios secundários tipo WDR (wide dynamic range), os quais respondem a partir da somação de neurônios periféricos

individuais (Hanai & Yokota 1993; Le Bars & Cadden 2010; Yi et al. 2015). Desta maneira é plausível hipotetizar que uma diminuição de 50% das respostas dos neurônios periféricos, originaria um estímulo insuficiente para que os neurônios secundários respondessem (Guan & Raja 2010).

Interessantemente, nosso estudo também sugere que essa interação entre neurônios e células gliais satélite envolvendo os receptores NMDA, P2X₇, IL-1 β e a via de sinalização da enzima COX-2 não é um mecanismo comum de células sensoriais no GRD, mas parece estar relacionada apenas ao fibras do tipo C. Nossos achados demonstraram que a administração intratecal de uma alta dose de capsaicina resultou em uma apoptose global dos neurônios TRPV1⁺ e preveniu completamente o desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória induzida pelo agonista do receptor NMDA, sem alterar o limiar nociceptivo mecânico no grupo tratado com veículo. Corroborando com outros estudos, nossos dados sugerem fortemente que a hiperalgesia inflamatória é mediada principalmente por fibras C (Fattori et al., 2016; Nakao et al., 2012). Respostas semelhantes foram demonstradas por Ferreira e Lorenzetti, onde a administração intratecal do antagonista do receptor NMDA inibiu marcadamente a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂ e carragenina no tecido periférico (Ferreira & Lorenzetti 1994).

A técnica de conservação com ósmio e glutaraldeído associada à resina EPON nos permitiu compreender melhor a estrutura histológica do gânglio da raiz dorsal através da microscopia eletrônica de transmissão, padronizando, desta maneira, a técnica de histologia do GRD em nosso laboratório. Nossos resultados histológicos confirmaram os dados obtidos por Pannese (2010), o qual observou corpos de células neuronais isoladas entre si e envoltos por células satélites. O mesmo autor ainda observa que os complexos de Golgi, em sua maioria, estão na região justanuclear e que as mitocôndrias estão dispersas pelo citoplasma. Os dados de análise morfológica obtidos em nosso estudo ressaltam a estreita comunicação física que ocorre entre as células satélites e neurônios. De fato, observamos uma importante especialização entre o corpo neuronal e as células satélites do GRD conhecidas como “slender projections”. Esta especialização está ligada ao aumento da área de contato entre as duas células para que ocorra uma íntima associação entre ambas (Pannese et al. 1990; Pannese et al. 2003; Pannese 2010). Pannese (1969) mostra, além das projeções, também a fusão de vesículas na membrana das células satélites.

Através de imunofluorescência de alta resolução em corpos neuronais do GRD, Marvizón et al. (2002) mostraram a presença, em sua maioria, de subunidades NR1, NR2B e NR2D dos receptores NMDA. Em nosso grupo, Ferrari et al. (2014) mostraram a expressão de RNAm no GRD das subunidades NR1, NR2B, NR2D e NR3A. Além da expressão, foi

observada a participação das subunidades NR1, NR2B, NR2D e NR3A na hiperalgesia gerada pela administração de PGE₂. Neste estudo, cortes do GRD submetidos a técnica de imunogold mostraram alta densidade de receptores NMDA NR1 e NR2B presentes no citoplasma, mais especificamente ligados aos corpúsculos de Nissl e algumas mitocôndrias neuronais. Marvizón et al. (2002) obtiveram resultados diferentes na imunofluorescência de alta resolução, mostrando a presença de receptores NR2 A/B no complexo de Golgi e receptores NR2 C/D nos corpúsculos de Nissl. Este fato pode ter ocorrido devido a limitação da técnica de imunofluorescência apresenta, mesmo em alta resolução.

A presença das subunidades NR1 e NR2B nos corpúsculos de Nissl e algumas mitocôndrias das células satélites no GRD, destaca ainda mais a importância dos receptores NMDA no envolvimento das células satélites na hiperalgesia. Dados estes reforçados por Norcini et al. (2016), os quais mostraram que o aumento da expressão de subunidade NR2B em células satélites, em modelo de neuropatia, pode estar relacionado com o desenvolvimento da hipersensibilidade sustentada.

A presença dos receptores NMDA NR1 e NR2B nos corpúsculos de Nissl neuronais não está relacionada obrigatoriamente com a participação destes na interação neurônio-glia, visto que, os receptores produzidos nos corpos neuronais podem ser direcionados para as extremidades do neurônio primário. Periféricamente, os receptores NMDA são encontrados em vários órgãos como bexiga urinária, intestino (McRoberts et al. 2001) e pele (Carlton et al. 1998; Carlton & Coggeshall 1999). Já no corno dorsal da medula os receptores NMDA são responsáveis pela liberação de substância P (Malcangio et al. 1998) e BDNF (Lever et al. 2001), justificando assim a presença dos receptores nos corpúsculos de Nissl neuronais. A presença dos receptores P2X₇ nos corpúsculos de Nissl e mitocôndrias das células satélites, dado observado em nosso estudo, ainda é muito discutido pela literatura, contudo recentemente Miras-Portugal (Miras-Portugal et al. 2017), confirmaram a presença destes receptores purinérgicos em neurônios, após uma vasta discussão e revisão, onde, segundo os autores, o receptor P2X₇ desempenha um importante papel na liberação de neurotransmissores e alongamento axonal, corroborando com nosso achado em neurônios do GRD.

É importante ressaltar que a presença de receptores NMDA e P2X₇ nas mitocôndrias das células neuronais e satélites, pode ser um importante indicador de uma participação desses receptores no desenvolvimento de hiperalgesia através do estresse oxidativo mitocondrial. Demirbas et al. (2017) mostrou um papel importante da cetamina (antagonista NMDA), um anestésico frequentemente utilizado na rotina clínica como sedativo e adjuvante na analgesia, na redução do estresse oxidativo em células hipocâmpais e GRD. Além disso,

outros estudos mostraram um papel importante dos receptores P2X₇ na hiperalgesia induzida por espécies reativas de oxigênio (Munoz et al. 2017) e neuropatia diabética (Vieira et al. 2016; Wu et al. 2016). Desta forma, enfatizamos a importância dos dados obtidos em nosso estudo.

A presença dos receptores P2X₇ nos corpúsculos de Nissl e nas mitocôndrias de células satélites já havia sido demonstrada através da técnica de imunofluorescência em outros trabalhos (Zhang et al. 2005; Xie et al. 2017), achado já esperado em nossa pesquisa, pois este receptor é responsável pelo influxo de cálcio e liberação de IL-1 β em células satélites.

Com o objetivo de avaliar o que ocorre individualmente nas células neuronais e nas células satélites do GRD, uma série de experimentos foram realizados analisando o influxo de cálcio destas células mantidas em culturas (*in vitro*). Nossos dados sugerem não haver dependência entre os receptores NMDA e P2X₇, presente tanto nos corpos neuronais responsivos a capsaicina como em células satélites, no influxo de cálcio gerado após adição do agonista NMDA. Ainda nos corpos neuronais, o influxo de cálcio gerado pelo agonista dos receptores P2X₇, também se mostrou independente da ativação do receptor NMDA. Contudo, nas células satélites a inibição dos receptores NMDA diminuiu drasticamente o influxo de cálcio gerado pelo agonista dos receptores P2X₇, mostrando assim uma influência dos receptores NMDA sobre o influxo de cálcio dos receptores P2X₇ presentes nas células satélites do GRD. Como demonstrado recentemente por Spray & Hanani (2017) o aumento da atividade das células satélites está ligado a propagação de sinal via *gap junctions* entre células satélites, influenciando diretamente no aumento do recrutamento de fibras C que passam a responder. Juntos, os dados comportamentais e *in vitro* (influxo de cálcio na cultura) deste trabalho, sugerem que o mecanismo pelo qual a ativação dos receptores NMDA neuronal do GRD induz a hiperalgesia difere do mecanismo pelo qual a ativação dos receptores NMDA ativam as células satélites e recrutam mais células, embora, a hiperalgesia inflamatória dependa do envolvimento das células satélites e propagação da informação via *gap junctions*.

8. CONCLUSÃO

Nossos dados *in vivo* descrevem pela primeira vez um crosstalk entre receptores NMDA, P2X₇ e enzima COX-2, em células do GRD, contribuindo para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico. Sugerindo ainda que esta via é desencadeada pela ativação de receptores NMDA nas fibras C, liberando ATP, que ativa os receptores P2X₇, o qual estimula a liberação de IL-1 β . Esta citocina ativa a enzima COX-2 que, por sua vez, produz e libera PGE₂ no GRD, levando à sensibilização dos neurônios sensoriais de primeira ordem (Figura 20).

A interação entre as células satélites e células neuronais mostrou-se muito próxima, reforçando as hipóteses que indicam uma correlação muito importante destas células para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória periférica, reforçando seu papel modulatório e possível foco farmacológico para futuros tratamentos das hiperalgesias inflamatórias com menores efeitos colaterais sistêmicos.

Os dados *in vitro*, obtidos em culturas do GRD, nos mostram haver ainda muitas lacunas para compreensão da interação entre neurônios e células satélites, mostrando assim, a grande complexidade e importância desta relação para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória periférica no GRD.

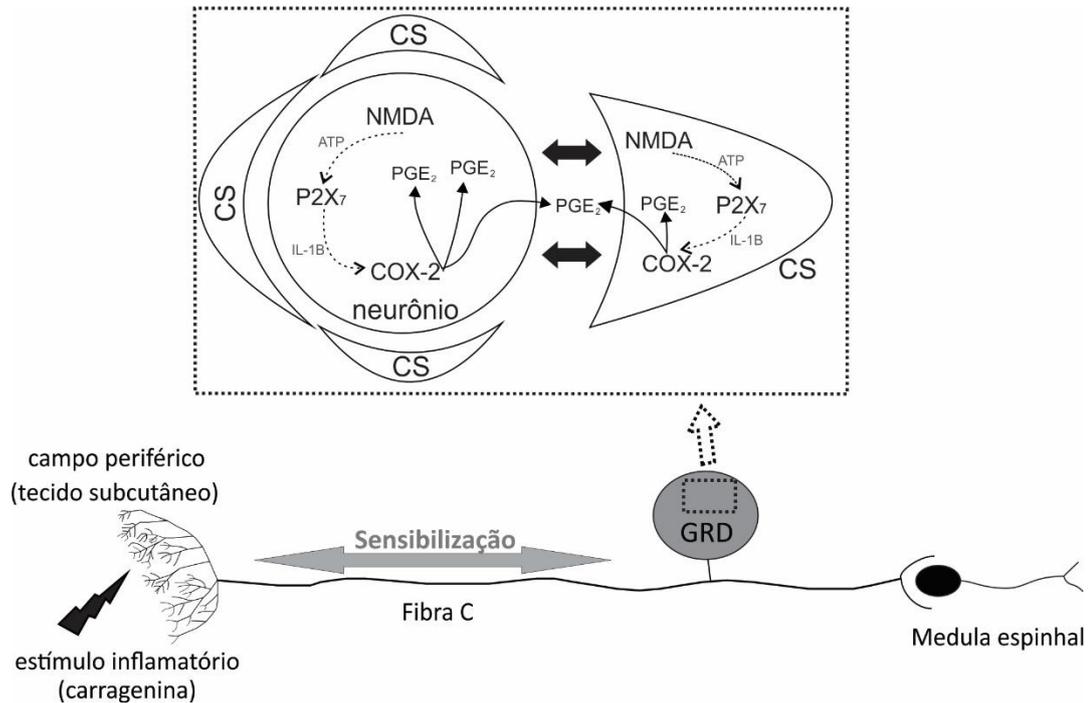


Figura 20 - Esquema resumindo o crosstalk entre o receptor NMDAR, P2X₇ e enzima COX-2 no desenvolvimento de hiperalgesia inflamatória no tecido periférico. Um estímulo inflamatório (por exemplo, carragenina) injetado no tecido periférico, ou a administração ganglionar de NMDA, ativa o receptor NMDA em neurônios e células satélites (CS), presentes no GRD. A ativação do receptor NMDA resulta na liberação o ATP, que ativa os receptores P2X₇, estimulando a liberação de IL-1β, que ativa a enzima COX-2. A enzima COX-2 produz e libera a PGE₂ nas células do GRD, levando à sensibilização do neurônio nociceptivo primário do tipo C. Abreviaturas: ATP, adenosina trifosfato; COX-2, enzima ciclooxygenase-2; DRG, gânglio da raiz dorsal; IL-1β, interleucina-1β; NMDA, receptor N-metil-D-aspartato; P2X₇, receptor purinérgico P2X do tipo 7; PGE₂, prostaglandina-E₂; CS, células satélite.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio, M.P. et al., 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), pp.19–29.
- Aguggia, M., 2003. Neurophysiology of pain. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 24 Suppl 2, pp.S57–S60.
- Amaya, F. et al., 2000. Diversity of Expression of the Sensory Neuron-Specific TTX-Resistant Voltage-Gated Sodium Ion Channels SNS and SNS2. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 15(4), pp.331–342. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104474319990828X>.
- Andó, R.D. et al., 2010. A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *British Journal of Pharmacology*, 159(5), pp.1106–1117.
- Araldi, D. et al., 2013. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), pp.3603–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3587281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Araldi, D. et al., 2013. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(9), pp.3603–3608.
- von Banchet, G.S. et al., 2011. Molecular effects of interleukin-1 β on dorsal root ganglion neurons: Prevention of ligand-induced internalization of the bradykinin 2 receptor and downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), pp.262–271. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2010.09.009>.
- Le Bars, D. & Cadden, S.W., 2010. What is a Wide-Dynamic-Range Cell? *The Senses: A Comprehensive Reference*, 5, pp.331–338.
- Basso, A.M. et al., 2009. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*, 198(1), pp.83–90.
- Beamer, E. et al., 2016. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*, 104, pp.94–104.
- Bianchi, M., Dib, B. & Panerai, A.E., 1998. Interleukin-1 and nociception in the rat. *Journal*

- of Neuroscience Research*, 53(6), pp.645–650.
- Bliss, T. V & Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), pp.31–39.
- Bogen, O. et al., 2012. Generation of a Pain Memory in the Primary Afferent Nociceptor Triggered by PKC Activation of CPEB. *Journal of Neuroscience*, 32(6), pp.2018–2026. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5138-11.2012>.
- Bonica, J.J., 1990. *The management of pain* 2nded.,
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp.248–254.
- Bravo, D. et al., 2015. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. *Pharmacological Research*, 101, pp.86–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.016>.
- Brumovsky, P., Watanabe, M. & Hökfelt, T., 2007. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience*, 147(2), pp.469–490.
- Brumovsky, P.R. et al., 2013. Expression of vesicular glutamate transporters in sensory and autonomic neurons innervating the mouse bladder. *Journal of Urology*, 189(6), pp.2342–2349. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.11.046>.
- Burnstock, G., 2016. *Purinergic Mechanisms and Pain* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2015.09.001>.
- Carlton, S.M. & Coggeshall, R.E., 1999. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Research*, 820(1–2), pp.63–70.
- Carlton, S.M., Zhou, S. & Coggeshall, R.E., 1998. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Research*, 790(1–2), pp.160–169.
- Castillo, C. et al., 2013. Satellite glia cells in dorsal root ganglia express functional NMDA receptors. *Neuroscience*, 240, pp.135–146. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.031>.
- Chang, M. et al., 2016. Effective gene expression in the rat dorsal root ganglia with a non-viral vector delivered via spinal nerve injection. *Nature Publishing Group*, (May), pp.1–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35612>.
- Chen, J. et al., 2016. Spatial Distribution of the Cannabinoid Type 1 and Capsaicin Receptors May Contribute to the Complexity of Their Crosstalk. *Nature Publishing Group*, (May 2015), pp.1–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep33307>.

- Chen, S.P. et al., 2017. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain*, 140(6), pp.1643–1656.
- Chen, Y. et al., 2008. Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), pp.16773–16778. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0801793105>.
- Costa, F.A.L. & Moreira Neto, F.L., 2015. Células gliais satélite de gânglios sensitivos: o seu papel na dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 65(1), pp.73–81.
- Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Science Signaling*, 2004(255), pp.re16-re16. Available at: <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.2552004re16>.
- Demirdas, A., Nazıroglu, M. & Övey, I.S., 2017. Short-Term Ketamine Treatment Decreases Oxidative Stress Without Influencing TRPM2 and TRPV1 Channel Gating in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(1), pp.133–144.
- Diaz-Hernandez, J.I. et al., 2012. In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3 β and secretases. *Neurobiology of Aging*, 33(8), pp.1816–1828. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040>.
- Dinarello, C.A., 1996. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *The Journal of The American Society of Hematology*, 86(10), pp.3619–3639.
- Ding, Y. et al., 2000. ATP, P2X receptors and pain pathways. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1–3), pp.289–294.
- Dissing-Olesen, L. et al., 2014. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(32), pp.10511–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100586>.
- Emery, E.C. et al., 2016. In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Science Advances*, 2(11), pp.1–8.
- Engel, T. et al., 2012. P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 4(4), pp.174–187.
- Fattori, V. et al., 2016. Capsaicin: Current Understanding of Its Mechanisms and Therapy of Pain and Other Pre-Clinical and Clinical Uses. *Molecules*, 21(7), p.844. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/7/844>.

- Ferrari et al., 2014. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), pp.18363–18368. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1420601111>.
- Ferrari, D. et al., 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *Journal of immunology*, 159(3), pp.1451–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233643>.
- Ferrari, D. et al., 2006. The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology*, 176(7), pp.3877–3883. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.7.3877>.
- Ferrari, L.F. et al., 2007. A novel technique to perform direct intraganglionar injections in rats. *J Neurosci Methods*, 159(2), pp.236–243.
- Ferrari, L.F. et al., 2014. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), pp.18363–8. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84919941462&partnerID=tZOtx3y1>.
- Ferrari, L.F., Araldi, D. & Levine, J.D., 2015. Distinct Terminal and Cell Body Mechanisms in the Nociceptor Mediate Hyperalgesic Priming. *Journal of Neuroscience*, 35(15), pp.6107–6116. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5085-14.2015>.
- Ferreira, S.H., 1973. Inflammation, prostaglandins and aspirin-like drugs. *Trans Med Soc Lond*, 89, pp.20–31.
- Ferreira, S.H. & Lorenzetti, B.B., 1994. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology*, 33(11), pp.1479–1485.
- Ferreira, S.H. & Vane, J.R., 1967. Prostaglandins: Their Disappearance from and Release into the Circulation. *Nature*, 216, pp.868–873. Available at: <file:///C:/Users/tzhou3/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/DeYoung, Axford - 1967 - © 1967 Nature Publishing Group.pdf>.
- Gardoni, F. et al., 2011. Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1 β and NMDA stimulation. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), p.14. Available at: <http://www.jneuroinflammation.com/content/8/1/14>.

- Gasser, H., 1941. The classification of nerve fibers. *Ohio Journal of Science*, 41(3), pp.145–159. Available at: <http://psycnet.apa.org/psycinfo/1942-00877-001>.
- Gosselin, R. et al., 2011. Glial Cells and Chronic Pain. *Neuroscientist*, 16(5), pp.519–531.
- Gu, J.G. & MacDermott, A.B., 1997. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*, 389(6652), pp.749–753.
- Gu, Y. et al., 2010. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron Glia Biology*, 6(1), pp.53–62.
- Guan, Y. & Raja, S.N., 2010. Wide-dynamic-range neurons are heterogeneous in windup responsiveness to changes in stimulus intensity and isoflurane anesthesia level in mice. *Journal of Neuroscience Research*, 88(10), pp.2272–2283.
- Hanai, F. & Yokota, T., 1993. C-Fiber responses of wide dynamic range neurons in the spinal dorsal horn of the cat. *Pain Research*, 8, pp.61–69.
- Hardman, J.G. et al., 2011. *Goldman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 12^{ed.},
- Illes, P., Khan, T.M. & Rubini, P., 2017. Neuronal P2X7 Receptors Revisited: Do They Really Exist? *The Journal of Neuroscience*, 37(30), pp.7049–7062. Available at: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3103-16.2017>.
- Inoue, a et al., 1999. Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *Journal of neurochemistry*, 73(5), pp.2206–2213.
- Jia, M. et al., 2017. Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain. *Molecular Pain*, 13, pp.1–11.
- Johnson, J.W. & Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), pp.529–531. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/325529a0>.
- Julius, D. & Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, pp.203–210.
- Krimon, S. et al., 2013. P2X3 receptors induced inflammatory nociception modulated by TRPA1, 5-HT3 and 5-HT1A receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 112, pp.49–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.09.017>.
- Kuan, Y.H. et al., 2015. Targeting P₂X₇ receptor for the treatment of central post-stroke pain in a rodent model. *Neurobiology of Disease*, 78, pp.134–145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.028>.
- Lever, I.J. et al., 2001. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by

- distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), pp.4469–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404434>.
- Li-Yen M. Huang, Gu, Y. & Chen, Y., 2013. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia*, 4061(10), pp.1571–1581.
- Linhart, O., Obreja, O. & Kress, M., 2003. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin e2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 118(1), pp.69–74.
- Lister, M.F. et al., 2007. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *Journal of Inflammation*, 4(1), p.5. Available at: <http://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-4-5>.
- Liu, F.Y. et al., 2012. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Research*, 1427, pp.65–77.
- Liu, H., Mantyh, P.W. & Basbaum, A.I., 1997. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature*, 386(6626), pp.721–724. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/386721a0>.
- Loeser, J.D. & Treede, R.D., 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137(3), pp.473–477.
- Loiola, E.C. & Ventura, A.L.M., 2011. Release of ATP from avian Müller glia cells in culture. *Neurochemistry International*, 58(3), pp.414–422.
- Ma, W. & St-Jacques, B., 2018. Signalling transduction events involved in agonist-induced PGE2/EP4 receptor externalization in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Pain (United Kingdom)*, pp.1–17.
- MacDermott, A.B. et al., 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), pp.519–522. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/321519a0>.
- Malcangio, M., Fernandes, K. & Tomlinson, D.R., 1998. NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. *British journal of pharmacology*, 125(8), pp.1625–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1565764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Malet, M. et al., 2013. Transcript expression of vesicular glutamate transporters in lumbar dorsal root ganglia and the spinal cord of mice - Effects of peripheral axotomy or

- hindpaw inflammation. *Neuroscience*, 248, pp.95–111.
- Mannelli, L. et al., 2015. Oxaliplatin evokes P2X7-dependent glutamate release in the cerebral cortex: A pain mechanism mediated by Pannexin 1. *Neuropharmacology*, 97, pp.133–141. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.037>.
- Marcellino, D. et al., 2010. On the role of P2X7 receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X7 receptor antagonist A-438079. *Journal of Neural Transmission*, 117(6), pp.681–687. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00702-010-0400-0>.
- Marvizón, J.C.G. et al., 2002. Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *The Journal of comparative neurology*, 446(4), pp.325–341.
- Mayer, M.L. & Westbrook, G.L., 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of physiology*, 394, pp.501–27.
- McRoberts, J.A. et al., 2001. Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology*, 120(7), pp.1737–1748.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), pp.1–164.
- Miras-Portugal, M.T. et al., 2017. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. *The Journal of Neuroscience*, 37(30), pp.7063–7072. Available at: <http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3104-16.2017>.
- Möller, K.A., Johansson, B. & Berge, O.-G., 1998. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods*, 84(1–2), pp.41–47.
- Munoz, F.M. et al., 2017. Neuronal P2X7 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in mice. *Scientific Reports*, 7(1), p.3539. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-03813-7>.
- Nakao, A. et al., 2012. Role of Capsaicin-Sensitive C-Fiber Afferents in Neuropathic Pain-Induced Synaptic Potentiation in the Nociceptive Amygdala. *Molecular Pain*, 8(1), pp.1744-8069-8–51. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1186/1744-8069-8-51>.
- Norcini, M. et al., 2016. NR2B Expression in Rat DRG Is Differentially Regulated Following Peripheral Nerve Injuries That Lead to Transient or Sustained Stimuli-Evoked Hypersensitivity. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9(October), p.100. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27803647> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5068091>.
- North, R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*, 82(4), p.1013–67. Available at: <http://www.google.com/search?client=safari&rls=en-us&q=Molecular+physiology+of+P2X+receptors&ie=UTF-8&oe=UTF-8%5Cnpapers2://publication/uuid/ECEB72C8-E566-4DEC-8229-186B97F833BE>.
- Obreja, O. et al., 2002. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(12), pp.1497–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374772>.
- Oliveira, A.L.R. et al., 2003. Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse*, 50(2), pp.117–129.
- Oliveira, M.C.G. et al., 2009. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 141(1–2), pp.127–134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2008.10.024>.
- Pannese, E. et al., 1990. Anatomy and Embryology Original articles The perikaryal projections of rabbit spinal ganglion neurons A comparison of thin section reconstructions and scanning microscopy views. , pp.427–432.
- Pannese, E., 1969. Electron Microscopical Study on the Development of the Satellite Cell Sheath in Spinal Ganglia '. *J. Comp. Neur.*, (135), pp.381–422.
- Pannese, E. et al., 1972. Quantitative Relationships Between Nerve And Satellite Cells In Spinal Ganglia. An Electron Microscopical Study. *Brain Research*, 46, pp.215–234.
- Pannese, E. et al., 2003. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: Increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anatomy and Embryology*, 206(5), pp.337–347.
- Pannese, E., 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biology*, 6(1), pp.3–10.
- Papir-Kricheli, D. et al., 1987. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain*, 31(2), pp.263–276.
- Poole, S., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H., 1999. Hyperalgesia from subcutaneous cytokine. In *Cytokines and Pain*. p. 225.
- Prado, F.C. et al., 2013. Neuronal P2X₃ receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation.

- Neuropharmacology*, 67, pp.252–258. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.11.011>.
- Sasaki, Y.F. et al., 2002. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of neurophysiology*, 87(4), pp.2052–63. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929923>.
- Sharp, A.J. et al., 2008. P2x7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, 5, pp.1–13.
- Shinder, V. & Devor, M., 1994. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. *Journal of Neurocytology*, 23(9), pp.515–531.
- Solle, M. et al., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), pp.125–132.
- Song, M.J., Wang, Y.Q. & Wu, G.C., 2009. Additive anti-hyperalgesia of electroacupuncture and intrathecal antisense oligodeoxynucleotide to interleukin-1 receptor type I on carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Brain Research Bulletin*, 78(6), pp.335–341.
- Sorge, R.E. et al., 2013. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. , 18(4), pp.595–599.
- Sperlágh, B. et al., 2006. P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 78(6), pp.327–346.
- Spray, D.C. & Hanani, M., 2017. Gap junctions, pannexins and pain. *Neuroscience Letters*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.035>.
- Stoffels, M. et al., 2015. ATP-induced IL-1B specific secretion: True under stringent conditions. *Frontiers in Immunology*, 6(FEB), pp.1–6.
- Su, L. et al., 2011. Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain. *BMC Neuroscience*, 12(1), p.120. Available at:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/120>.
- Surprenant, A. et al., 1996. The Cytolytic P2z receptor for extracellular ATP indentified as a P2x receptor (P2X7). *Science*, 272(May), pp.735–738.
- Trifan, O.C. & Hla, T., 2003. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 7(3), pp.207–222.
- Vanegas, H. & Schaible, H.G., 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in neurobiology*, 64(4), pp.327–63.
- Vieira, F.S. et al., 2016. P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1

- diabetes in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 419, pp.148–157.
- Vivancos, G.G. et al., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), pp.391–399.
- Wang, H.S. et al., 2016. Changes in VGLUT1 and VGLUT2 expression in rat dorsal root ganglia and spinal cord following spared nerve injury. *Neurochemistry International*, 99, pp.9–15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.008>.
- Wang, J. et al., 2017. Upregulation of CX3CL1 mediated by NF- κ B activation in dorsal root ganglion contributes to peripheral sensitization and chronic pain induced by oxaliplatin administration. *Molecular Pain*, 13(266), p.174480691772625. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1744806917726256>.
- Wesche, H. et al., 1997. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), pp.837–847.
- Wu, B. et al., 2016. LncRNA uc.48+ siRNA improved diabetic sympathetic neuropathy in type 2 diabetic rats mediated by P2X7receptor in SCG. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 197, pp.14–18. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2016.04.001>.
- Xie, J. et al., 2017. The protective effect of resveratrol in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X7receptor in the dorsal root ganglia. *Neurochemistry International*, 103, pp.24–35. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.006>.
- Yi, G.-S. et al., 2015. Action potential threshold of wide dynamic range neurons in rat spinal dorsal horn evoked by manual acupuncture at ST36. *Neurocomputing*, 166, pp.201–209. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925231215004464>.
- Zhang, X.-F. et al., 2005. Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Research*, 1052(1), pp.63–70. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899305008589>.
- Zhang, Y. et al., 2015. Pannexin-1 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to neuropathic pain development. *Journal of Biological Chemistry*, 290(23), pp.14647–14655.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v.16, pp.109-110.

ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA e COX no gânglio da raiz dorsal", protocolo nº 3871-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Felipe Hertzling Farias, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 15 de junho de 2015.

Vigência do projeto: 06/2015-06/2017

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar

No. de animais: 63

Peso/Idade: 02 meses / 200gr

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, **15 de junho de 2015**.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2 – DECLARAÇÃO DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Participação do receptores NMDA, P2X7 e enzima COX-2 do gânglio da raiz dorsal na hiperalgesia inflamatória periférica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23/08/2018

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Felipe Hertzling Farias**
RG n.º 4.511.813

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Carlos Amílcar Parada**
RG n.º 7.962.382