

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

RONALDO DE ALMEIDA JÚNIOR

**ESTUDO DA DESPOLARIZAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ATIVAÇÃO
DE CÉLULAS SATÉLITES GLIAIS EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO
DA RAIZ DORSAL DE RATOS**

UBERLÂNDIA – MG

2020

Ronaldo de Almeida Júnior

**ESTUDO DA DESPOLARIZAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ATIVAÇÃO
DE CÉLULAS SATÉLITES GLIAIS EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO
DA RAIZ DORSAL DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a
Universidade Federal de Uberlândia, como parte das
exigências para o título de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz
Lotufo

UBERLÂNDIA – MG

2020

RONALDO DE ALMEIDA JÚNIOR

ESTUDO DA DESPOLARIZAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ATIVAÇÃO
DE CÉLULAS SATÉLITES GLIAIS EM CULTURAS PRIMÁRIAS DO GÂNGLIO DA
RAIZ DORSAL DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, dezembro de 2020

Banca Examinadora:

Professora Doutora Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU)

Professora Doutora Érika Renata Barbosa Neiro (UFU)

Professor Doutor Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Celina Monteiro da Cruz Lotufo pelo incentivo, paciência, motivação e orientação nesta caminhada acadêmica.

Aos meus queridos amigos que me acompanharam ao longo de todo esse período acadêmico, em especial a Maria Vitória da Silva e a Bruna Moreira Silva Lemos que sem a ajuda não seria possível realizar este trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Federal de Uberlândia pelas bolsas concedidas durante os anos do curso.

“Tú no puedes comprar las nubes
Tú no puedes comprar los colores
Tú no puedes comprar mi alegría
Tú no puedes comprar mis dolores”

Calle 13 – Latinoamérica

RESUMO

O glutamato é liberado no gânglio da raiz dorsal onde ativa os receptores NMDA em células gliais de satélite (CSGs) que recobrem os corpos celulares de neurônios sensoriais primários. Tal comunicação entre neurônios e CSGs é importante para manter a dor inflamatória (Ferrari et al., 2014). Portanto, as CSGs podem influenciar os sinais dolorosos ao interagir com os neurônios nociceptivos. Um dos papéis mais conhecidos das células satélites é a regulação das concentrações de íons K^+ no meio extracelular. Os canais de potássio do tipo Kir4.1 são importantes na regulação das concentrações deste íon e são expressos em CSGs. Este estudo objetivou avaliar o efeito da ativação do receptor NMDA sobre o potencial de repouso dos neurônios aferentes primários e testar se a regulação extracelular do potássio pode influenciar o potencial da membrana de repouso neuronal através da modulação dos canais Kir 4.1, presentes nas CSGs. O potencial de membrana de neurônios e CSGs foi avaliado utilizando o indicador fluorescente DiBAC4(3) em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos utilizando microscopia confocal. A administração de fluoxetina foi utilizada para o bloqueio dos canais de potássio Kir 4.1 (FURUTANI et al., 2009). A administração de glicina e NMDA induziu a despolarização dos neurônios nociceptivos. A despolarização induzida pela glicina foi bloqueada na presença do antagonista seletivo NMDA D-AP-5, sugerindo que o glutamato pode ser liberado pelas células em cultura. A administração de fluoxetina induziu a despolarização da membrana de CSGs, mas não afetou os neurônios. Os resultados obtidos indicam que há uma comunicação cruzada entre neurônios nociceptivos e CSGs de forma que a ativação das células gliais pode induzir despolarização dos neurônios próximos, aumentando a excitabilidade destes. Esta comunicação pode amplificar a sinalização nociceptiva no gânglio da raiz dorsal, contribuindo para a dor e hiperalgesia. A despolarização neuronal induzida pelas CSGs não parece depender da regulação extracelular do K^+ pelo canal Kir 4.1.

Palavras-chave: Células satélites gliais. Glutamato. NMDA. Kir 4.1. Dor. Gânglio da raiz dorsal.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
CSG	Célula satélite glial
FNDC	Fator Neurotrófico derivado Cérebro
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazinaetanesulfônico
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
K ⁺	Íon potássio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PRM	Potencial de repouso de membrana
RAMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
RNMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina, subtipo 1
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	4
1.1 A dor.....	4
1.2 O gânglio da raiz dorsal e nociceptores.....	6
1.3 O neurotransmissor glutamato e o receptor NMDA	7
1.4 Receptores NMDA em células satélites do gânglio da raiz dorsal.....	8
1.5 Canais de potássio Kir 4.1 em células satélites glias e seu papel no controle da excitabilidade neural.....	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específico.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Aspectos éticos.....	14
3.2 Animais	14
3.3 Coleta de gânglios da raiz dorsal.....	14
3.4 Cultura primária	14
3.5 Diluições e divisão de grupos.....	15
3.6 Microscopia Confocal	16
3.6 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS	18
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO.....	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 A dor

A dor era compreendida canonicamente como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com dano real ou potencial do tecido, ou descrita em termos de tal dano, segundo a terminologia estabelecida pela *International Association for the Study of Pain* (1994).

Nos últimos dois anos a definição de dor esteve em reavaliação histórica por uma força-tarefa presidencial da IASP, com 14 membros, formada por profissionais multinacionais com ampla experiência em ciência clínica e/ou básica relacionada à dor para avaliar a definição atual e as notas explicativas e recomendar se tal definição deveria ser mantida ou alterada. Finalmente neste ano, a definição foi atualizada e divulgada pela Associação como: “Uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial.” (RAJA et al., 2020).

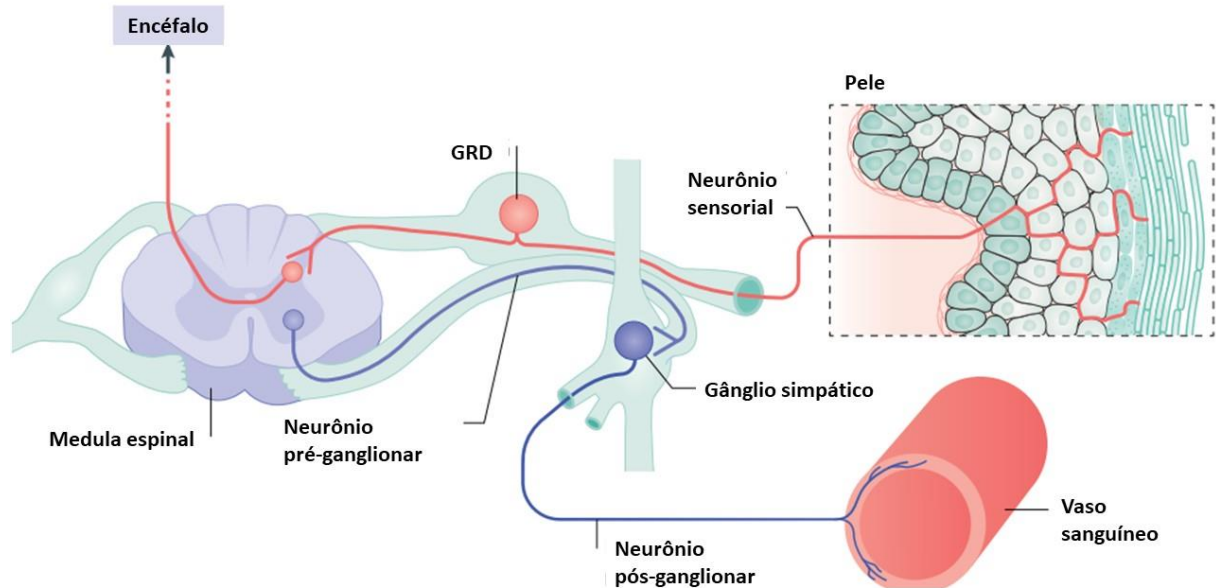
A dor pode ser compreendida como três eventos neurobiológicos distintos, sendo classificada então em: nociceptiva, inflamatória e patológica. A dor fisiológica é o sistema de proteção rápido contra estímulos nocivos, desencadeada no tocar de objetos frios ou quentes, agentes químicos irritantes ou força mecânica intensa. A dor inflamatória, desencadeada por mediadores do sistema imune em um dano tecidual ou em uma infecção, é essencial para o processo de reparação tecidual, pois desencoraja o contato físico e o movimento, por exemplo, no caso de uma ferida cirúrgica. A dor patológica pode ocorrer devido ao dano do sistema nervoso (dor neuropática), mas também na ausência de danos ou inflamação (dor disfuncional), como, na cistite intersticial crônica, na fibromialgia, na síndrome do intestino irritável, na cefaleia de tensão e na disfunção temporomandibular e dor orofacial (WOOLF, 2010).

A via de transmissão da dor é iniciada através da ativação de receptores em terminações nervosas livres, encontradas amplamente em vários tecidos, que transduzem os estímulos nocivos em sinais elétricos neurais que são conduzidos até o sistema nervoso central. Essas fibras nervosas aferentes primárias possuem corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal ou nos gânglios trigêmeos. Os neurônios nociceptivos primários que se encontram no gânglio da raiz dorsal realizam sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal (Figura 1). A informação nociceptiva irá então a centros superiores através dos tratos espinotalâmicos e espinoreticulares contralaterais, que estão localizados na substância branca anterolateral da medula espinal. Os axônios mediais e laterais do trato espinotalâmico

terminam em seus respectivos núcleos, medial e lateral, no tálamo e, a partir daí projetam-se para os córtices somatossensoriais primário e secundário, a ínsula, o córtex cingulado anterior e o córtex pré-frontal. Estas áreas desempenham vários papéis na percepção da dor e também interagem com outras áreas não relacionadas tradicionalmente com dor (STEEDS, 2009). Considerando que, pela definição, a dor depende de uma experiência emocional desagradável e, portanto, é uma percepção, o sinal nociceptivo só irá desencadear a dor propriamente dita quando esta é processada no encéfalo. Deste modo, os processos sensoriais que ocorrem antes do sinal chegar ao nível encefálico compreendem o que é denominado de sensação nociceptiva, ou ainda, nocicepção.

Fundamentalmente o mecanismo básico de dor passa por três eventos quando há um estímulo nocivo: transdução, transmissão e modulação. Os nociceptores permanecem silenciados na homeostasia, entretanto frente a um evento-estímulo na via nociceptiva, a transdução ocorre desta maneira: os estímulos são convertidos em eventos químicos teciduais, (2) estes eventos químicos teciduais e de fenda sináptica são convertidos em eventos elétricos nos neurônios, (3) eventos elétricos neuronais são transduzidos em eventos químicos nas sinapses. Concluída a transdução, os eventos elétricos são transmitidos ao longo dos axônios dos neurônios aferentes primários dos GRD, conduzindo informações do terminal pós-sináptico de uma célula para o terminal pré-sináptico de outra no corno dorsal da medula espinal. Desta estrutura as informações ascendem através do trato espinotalâmico para estruturas encefálicas superiores para a modulação (YAM et al., 2018). A ilustração básica dessa via encontra-se na Figura 1.

Figura 1 - Via ascendente nociceptiva da dor



Fonte: Adaptado de Hanani e Spray (2020).

1.2 O gânglio da raiz dorsal e nociceptores

Os gânglios das raízes dorsais (GRDs), junto com os gânglios dos nervos cranianos, contêm a maior parte dos neurônios aferentes primários do corpo de um vertebrado. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários emitem uma haste inicial do cone axonal a qual é logo ramificada em duas como o formato da letra “T” ou “Y”, sendo que por tal morfologia são denominados de pseudounipolares. Uma ramificação segue para a sinapse com a medula espinal e outra para inervar a pele, um músculo, uma víscera etc. (DEVOR, 1999). Os potenciais de ação que são gerados nos tecidos inervados são conduzidos para a ramificação central do axônio, mas também são transmitidos para os corpos celulares dos neurônios. O artigo de Devor (1999) expõe essas e outras peculiaridades dos gânglios da raiz dorsal e sugere que essa estrutura deve possuir papéis que vão além de uma simples estação de passagem para os sinais somatossensoriais. Os corpos celulares desses neurônios não possuem dendritos e não realizam sinapses típicas nos gânglios sensoriais. No entanto, existem células gliais posicionadas circunjacentes a esses, denominadas de células satélites gliais (CSGs). A superfície dos corpos neuronais é densamente revestida de microvilos, que adentram nas lamelas da CSG para aumentar a área de superfície neuronal. Esta morfologia já sugeria que deveria existir uma interação importante entre neurônios e CSGs. Estudos recentes mostram que o sinal nociceptivo é modulado através desta comunicação entre neurônios e células satélites gliais através da

liberação de diversos mediadores e neurotransmissores como o glutamato (FERRARI et al., 2014), o ATP (NEVES et al., 2020; LEMES et al., 2018) e fractalquina (SOUZA et al., 2013), entre outros (para revisão, (HANANI; SPRAY, 2020).

Os neurônios aferentes primários residentes nos GRDs são divididos em três grupos baseados nos níveis de mielinização e respectivas velocidades de condução. Existem neurônios com axônios não mielinizados, que são as fibras C, com velocidade de condução de 0,8 m/s e neurônios pouco mielinizados; os com velocidade de condução de 1,5-6,5 m/s, denominados de fibra A δ ; e neurônios com maior quantidade de bainha de mielina, que são as fibras A β com velocidade de condução de 6,5 m/s (ZHU; WU; HENRY, 2012). Os neurônios responsáveis por detectar os sinais dolorosos são denominados nociceptores e estão associados às fibras do tipo C ou A δ . As fibras mielinizadas do tipo A β são responsáveis pela condução de sinais táteis e proprioceptivos. Além da diferença nas fibras, os diferentes tipos celulares podem ser diferenciados de acordo com os diâmetros dos seus corpos celulares (HARPER; LAWSON, 1985). Os neurônios nociceptivos associados às fibras do tipo C têm os corpos celulares pequenos (< 30 μ m), enquanto os nociceptores com fibras A δ têm corpos celulares intermediários (entre 30 e 40 μ m) e os neurônios não nociceptivos com fibras A β têm os corpos celulares com mais de 40 μ m.

Outra característica que diferencia os nociceptores dos demais neurônios somestésicos, é que estes possuem terminações nervosas livres presentes em tecidos periféricos ou vísceras, enquanto os neurônios responsáveis pela detecção de informação tátil e proprioceptiva possuem especializações associadas aos seus terminais formando estruturas como os corpúsculos de Pacini, Ruffini ou Merkel. Além disso, os nociceptores são sensíveis a estímulos de diferentes modalidades, que podem ser mecânicas, químicas ou térmicas. Estudos têm mostrado que alguns tipos de canais iônicos são expressos seletivamente por nociceptores, sendo os principais TRPV1, TRPA1, Na_v1.7, Na_v1.8 e Na_v1.9 (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

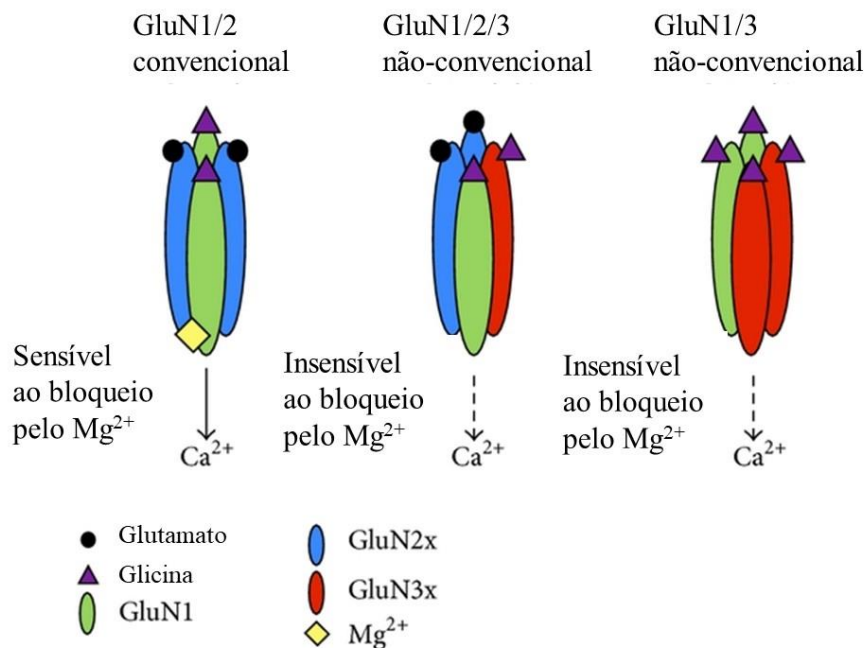
1.3 O neurotransmissor glutamato e o receptor NMDA

O glutamato ou ácido glutâmico, além de ser um aminoácido sintetizado pelo organismo (aminoácido não-essencial), é o neurotransmissor mais abundante no sistema nervoso de vertebrados que se apresenta nos locais de inflamação periférica, contribui para mais de 50% das sinapses cerebrais e desempenha papel crucial na modulação da nocicepção e liberação de neurotransmissor do terminal aferente (ver Figura 2). Os neurônios sensoriais apresentam receptores glutamatérgicos, incluindo os receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolpropionato (RAMPA) e N-metil-D-aspartato (RNMDA) (CASTILLO et al., 2013; YAM et al., 2018).

O RNMDA é um canal iônico transmembrânico heterotetramérico formado pela possível combinação de sete subunidades. Ele contém duas subunidades GluN1, as quais se ligam aos co-agonistas glicina e D-serina, ligadas a duas subunidades GluN2 (A, B, C ou D) ou a uma GluN2 e uma GluN3 (A ou B). A subunidade GluN2 é a que realmente se liga ao agonista glutamato, enquanto GluN3 também se liga à glicina e à D-serina. GluN1 é uma subunidade obrigatória e essencial para a montagem e tráfico de outras subunidades e a formação de um RNMDA funcional. Os RNMDAs são compostos classicamente por duas GluN1s e duas GluN2As ou duas GluN2Bs (SKOWROŃSKA et al., 2019). A Figura 2 a seguir mostra esquematicamente as subunidades desse receptor:

Figura 2 – Receptor NMDA



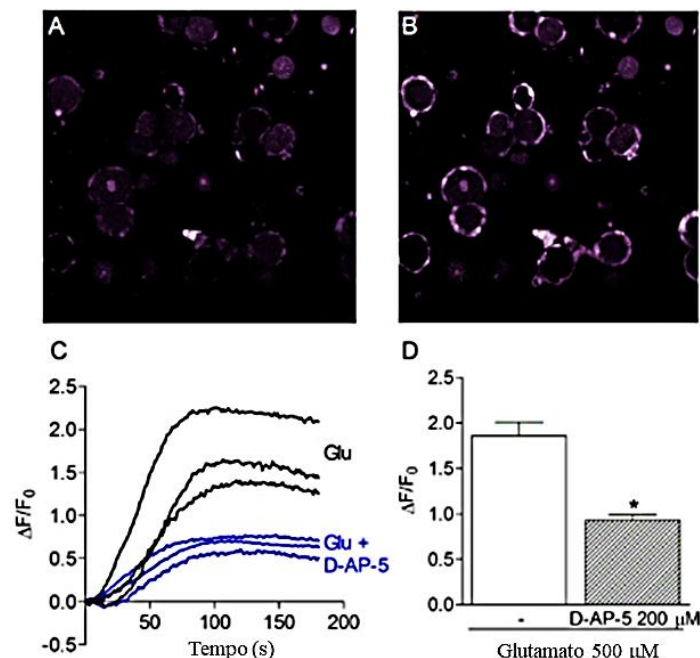
Fonte: Adaptado de Kehoe, Bernardinelli e Muller (2013). Representação esquemática das possibilidades de montagem do RNMDA através das subunidades GluN1, GluN2 e Glu3. O primeiro receptor da esquerda para a direita é a conformação clássica do receptor com maior sensibilidade ao bloqueio pelo íon de magnésio, enquanto as outras duas exemplificam outras possibilidades de montagem não convencionais insensíveis ao bloqueio pelo íon de magnésio.

1.4 Receptores NMDA em células satélites do gânglio da raiz dorsal

Os receptores NMDA são muito importantes na transmissão do sinal doloroso. Antagonistas de receptor NMDA, como a cetamina, são utilizados na clínica médica para induzir analgesia e anestesia (PELTONIEMI et al., 2016). O glutamato é o principal

neurotransmissor liberado na sinapse entre os neurônios nociceptivos primários e os neurônios secundários, no corno dorsal da medula espinhal. Neste local, o glutamato atua, principalmente, em receptores do tipo AMPA (RAMPA) e do tipo NMDA (RNMDA). A ativação de receptores do tipo NMDA tem sido associada ao processo de sensibilização central e à cronificação da dor (NIESTERS; MARTINI; DAHAN, 2014). Além disso, nosso grupo de pesquisa verificou que existem receptores NMDA periféricos, no gânglio da raiz dorsal de ratos (FERRARI, 2014). Neste trabalho, foi observado que a injeção de um antagonista RNMDA, mas não antagonista RAMPA, realizada no gânglio da raiz dorsal de ratos (nível de L5), reduz a hiperalgesia inflamatória induzida por injeção de prostaglandina E₂ (PGE₂) na pata dos animais. Em ensaios utilizando culturas primárias de gânglio da raiz dorsal foi verificado que a administração de NMDA ou glutamato induz um influxo de cálcio apenas em CSGs e não em neurônios (Figura 3). Estes resultados sugerem, portanto, que as CSGs participam da transmissão da dor inflamatória, interagindo com os neurônios nociceptivos primários. No entanto, como a ativação das CSGs pode interferir com a atividade neuronal ainda não está estabelecido. A Figura 3 a seguir mostra o influxo de íons de cálcio frente à administração de glutamato em CSG na presença e ausência do antagonista.

Figura 3 – Influxo de cálcio induzido por glutamato em CSGs



Fonte: Adaptado de FERRARI et al. (2014). Transientes de cálcio induzidos por glutamato em células de satélite gliais. A e B mostram imagens confocais de células de GRD primárias cultivadas durante 24 h, nas quais se encontram células satélites ligadas aos corpos neuronais sensoriais primários. (A) Fluorescência basal das células ganglionares. (B) Mudança de fluorescência imediatamente após a administração do glutamato (500 μM). (C) Curvas representativas da variação da fluorescência ao longo do tempo induzida pela glutamato (500 μM) na presença ou ausência de D-AP-5 (200 μM). Cada curva

representa a resposta de uma célula satélite. (D) Aumento máximo da fluorescência induzido por glutamato (500 μM) sozinho ou na presença de D-AP-5 (200 μM). Os resultados representam as médias \pm EPM de 16-26 células em três experimentos diferentes. As experiências foram realizadas na presença de glicina (10 μM) em tampão livre de Mg^{2+} . * $P < 0,05$ em comparação com o efeito do glutamato sem D-AP-5 (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

1.5 Canais de potássio Kir 4.1 em células satélites gliais e seu papel no controle da excitabilidade neural

No sistema nervoso central, uma das funções mais bem estabelecidas para as células gliais, especialmente astrócitos, é o controle dos níveis extracelulares de potássio. As células satélites gliais nos gânglios periféricos compartilham com várias das funções dos astrócitos encontrados no sistema nervoso central. Astrócitos também expressam receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e estes são estruturalmente semelhantes àqueles encontrados nas CSGs (FERRARI et al., 2014; SKOWROŃSKA et al., 2019). As funções desencadeadas pela ativação dos receptores NMDA em astrócitos ainda não estão completamente elucidadas. No estudo de Obara-Michlewska e colaboradores (2015) foi verificado que a ativação dos receptores NMDA em astrócitos induz uma diminuição na expressão de um subtipo específico de canal de potássio, o canal Kir 4.1. Estes canais são expressos também em células satélites gliais (VIT et al., 2008) e estão envolvidos no processo de tamponamento dos níveis extracelulares dos íons potássios. A ativação de neurônios é caracterizada por um aumento na frequência de potenciais de ação nessas células e durante a fase de repolarização do potencial de ação ocorre um efluxo intenso de íons potássios para o meio extracelular. Esta saída de potássio em neurônios que estão apresentando atividade intensa poderia induzir um aumento nos níveis extracelulares de potássio, rompendo o gradiente de concentração deste íon que é fundamental para a manutenção do potencial de repouso e para a repolarização do potencial de ação. Um aumento nos níveis extracelulares de potássio induz despolarização do potencial de repouso, visto que os canais de vazamento de potássio são os principais responsáveis pela regulação do potencial de repouso. Os canais do tipo Kir, do inglês *inward rectifier* o que significa que são canais retificadores para dentro da célula, são muito importantes para impedir este aumento de potássio extracelular resultante da ativação neural. Esses canais, presentes principalmente em células gliais, tem como característica conduzir os íons K^+ com maior facilidade do lado extra para o intracelular. Os íons de potássio fluem pelos canais retificadores de entrada quando o potencial de repouso de membrana (PRM) está negativo em relação ao potencial de equilíbrio para K^+ (EK), mas em potenciais mais positivos há um bloqueio de

correntes de saída dependentes de tensão por poliaminas intracelulares, mais especificamente por espermina, e Mg^{2+} (BUTT; KALSI, 2006).

Deste modo, o K^+ liberado pelos potenciais de ação é captado pelas células gliais próximas, não permitindo um aumento importante nas concentrações extracelulares de potássio. Depois de captados pelas células gliais os íons K^+ podem ser liberados em regiões que apresentam menor concentração destes, como próximo a vasos sanguíneos, ou podem ser transmitidos para outras células gliais vizinhas através de junções comunicantes onde também serão devolvidos ao meio extracelular em locais de menor concentração. Outra característica considerável dos canais Kir 4.1 é uma importante modulação por fatores extracelulares e intracelulares como o glutamato, o ATP, o AMPc, a PKA., entre outros (HIBINO et al., 2010; RUPPERSBERG, 2000).

Um interessante estudo realizado por Vit e colaboradores (2008) mostrou que a diminuição da expressão de Kir 4.1 através do uso de RNA de interferência (RNAi) no gânglio trigêmeo de ratos levou ao desenvolvimento de comportamentos que indicam dor espontânea. Além disso, nesse estudo foi verificado que a expressão desse canal está diminuída em células satélites gliais em um modelo de neuropatia. O fechamento ou a diminuição na expressão de canais Kir 4.1 causa a despolarização das células gliais, o que pode induzir a liberação de transmissores, como ATP, além de resultar em um deficiente tamponamento de íons K^+ causando depolarização neuronal e conseqüente aumento de excitabilidade nos neurônios nociceptivos.

O estudo do papel de canais de potássio específicos é muitas vezes dificultado pelo fato de existirem muitos subtipos destes canais e poucos fármacos capazes de atuar seletivamente em subtipos específicos. No caso dos canais Kir 4.1, estudos verificaram que estes canais podem ser bloqueados pela fluoxetina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina (FURUTANI et al., 2009). A fluoxetina foi utilizada para bloquear canais Kir 4.1 em astrócitos (KINBOSHI et al., 2017). Em cultura de astrócitos, a administração de fluoxetina aumentou significativamente a expressão de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor - Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo) e um padrão semelhante de aumento de BDNF foi observado quando a expressão dos canais Kir 4.1 foi inibida pelo uso de RNA de interferência.

Em resumo, trabalho anterior do grupo (FERRARI et al., 2014) verificou que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA presentes em células satélites gliais são importantes para a manutenção da dor inflamatória. Contudo, o mecanismo pelo qual estas células interferem na atividade neuronal ainda não foi desvendado. Considerando que em astrócitos, que são células que apresentam muitas semelhanças funcionais com as células satélites gliais,

a ativação de receptores NMDA interfere com a atividade de canais Kir 4.1 e que este canal é fundamental para o controle dos níveis extracelulares de K^+ em situações de ativação neuronal, é possível que processo semelhante ocorra no gânglio da raiz dorsal. Desta forma, a hipótese testada neste estudo é a de que a ativação de receptores NMDA em células satélites gliais leva ao fechamento de canais Kir 4.1 nessas células, o que resulta em acúmulo de potássio extracelular e consequente despolarização neuronal.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da ativação do receptor NMDA sobre o potencial de repouso de neurônios aferentes primários e avaliar o papel dos canais Kir 4.1 presentes em células satélites gliais no potencial de repouso neuronal.

2.2 Específico

- a) avaliar o efeito da administração de NMDA sobre o potencial de repouso em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos;
- b) avaliar o efeito do bloqueio de canais Kir 4.1 pelo uso de fluoxetina sobre o potencial de repouso de neurônios e células satélites gliais em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo teve aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número de protocolo 095/18. A utilização de animais seguiu as orientações da IASP (ZIMMERMANN, 1983), as quais se esforçam para a minimização do sofrimento e da utilização de animais experimentais.

3.2 Animais

Os animais utilizados foram ratas Wistar possuindo 80-100 gramas de massa corporal inicial e por volta de um mês de idade. Os animais foram acomodados no biotério central da Rede de Biotérios de Roedores – REBIR – da UFU climatizado em 25 °C (temperatura ambiente) e ciclo de luminosidade controlada em 12h claro e 12h escuro com livre acesso à água e à ração.

3.3 Coleta de gânglios da raiz dorsal

Os gânglios da raiz dorsal foram colhidos das regiões torácica e lombar (em torno de 16 a 18 gânglios por animal). Para isso, primeiramente os animais foram anestesiados em ambiente fechado com o anestésico geral Isoflurano 2% por via inalatória através do sistema de anestesia inalatória da Bonther, em seguida foram decapitados e colocados em posição vertical para a exsanguinação.

Com a retirada da pele do dorso do animal, exposição da coluna vertebral e secções das vértebras, os gânglios foram coletados e colocados em placas de cultura com aproximadamente 3 mL de solução balanceada Hanks (Merck KGaA) 10 mM e HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico (solução Hanks/HEPES).

3.4 Cultura primária

As culturas de GRD seguiram protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003), entretanto com algumas alterações.

As células foram dissociadas enzimaticamente por incubação a 37°C durante 60 minutos em solução Hanks/Hepes contendo 0,28 U/ml de colagenase (tipo 2, Sigma-Aldrich Corporation) e depois por 20 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich Corporation). Os gânglios foram lavados em meio DMEM (DMEM – *Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich Corporation). As células foram dissociadas mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur de vidro, e então cultivadas em placas de cultura cobertas com Matrigel (Becton, Dickinson and Company) e mantidas em estufa de cultura com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C por 24h-72h.

3.5 Diluições e divisão de grupos

As diluições dos reagentes utilizados neste trabalho foram respectivamente: capsaicina a 10⁻⁶ µM, D-AP-5 a 200 µM, fluoxetina 30 µM, glicina a 10 µM, NMDA a 250 µM e a solução Hanks/HEPES utilizada para o acondicionamento das culturas celulares durante a performance dos experimentos como controle.

A disposição dos grupos segundo os tipos de tratamento, as quantidades de placas para cada tratamento e as quantidades de células utilizadas para a análise estatística, encontram-se nos quadros a seguir:

Quadro 1 - Efeito da administração de glicina e NMDA sobre o potencial de repouso de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Tratamento	Controle	NMDA	Glicina	Glicina + D-AP-5	Total
Quantidade de placas	1	1	2	2	6
Quantidade de células	10	7	18	19	54

Fonte: DE ALMEIDA JÚNIOR (2020). Os tratamentos foram adicionados com o volume 10 µl cada através de uma pipeta mecânica seguindo respectivamente a ordem: D-AP-5 (apenas nos grupos Glicina + D-AP-5, 200 µM) ou Hanks/HEPES → glicina (10 µM) → NMDA (250 µM) → capsaicina (controle positivo para a diferenciação de neurônios da células satélites gliais, 10⁻⁶ µM).

Quadro 2 – Efeito da fluoxetina sobre o potencial de repouso

Tratamento	Controle-glia	Fluoxetina-glia	Controle-neurônio	Fluoxetina-neurônio	Total
Quantidade de placas	2	2	2	2	8
Quantidade de células	10	6	11	6	33

Fonte: DE ALMEIDA JÚNIOR (2020). Os tratamentos foram adicionados com o volume 10 μ l cada através de uma pipeta mecânica seguindo respectivamente a ordem: fluoxetina (apenas nos grupos fluoxetina, 30 μ M) ou Hanks/HEPES \rightarrow glicina (10 μ M) \rightarrow NMDA (250 μ M) \rightarrow capsaicina (controle positivo para a diferenciação de neurônios da células satélites gliais, 10-6 μ M).

3.6 Microscopia Confocal

Nos experimentos para avaliação do potencial de repouso da membrana celular, as placas foram lavadas com a solução Hanks/HEPES e depois incubadas por 20 minutos com 5 μ M do indicador fluorescente DiBAC4(3) (Invitrogen). Este indicador permanece na solução de trabalho durante todo o experimento, pois o movimento da molécula através da membrana, devido ao seu gradiente eletroquímico, indica as variações do potencial de membrana (YAMADA et al., 2001). A molécula de DiBAC4(3) é carregada negativamente e emite fluorescência somente quando está ligada à membrana ou à proteína. Deste modo, esta substância tende a entrar na célula e apresentar um aumento de fluorescência quando o meio intracelular fica menos negativo em relação ao meio extracelular, ou seja, em situação de despolarização. A difusão desta substância através da membrana é lenta, de tal forma que este indicador pode ser utilizado apenas para alterações sustentadas no potencial de membrana, como no caso de alterações do potencial de repouso neuronal. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). As imagens registradas foram analisadas utilizando o *software* de imagens livre e gratuito ImageJ (NIH). 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.

3.6 Análise estatística

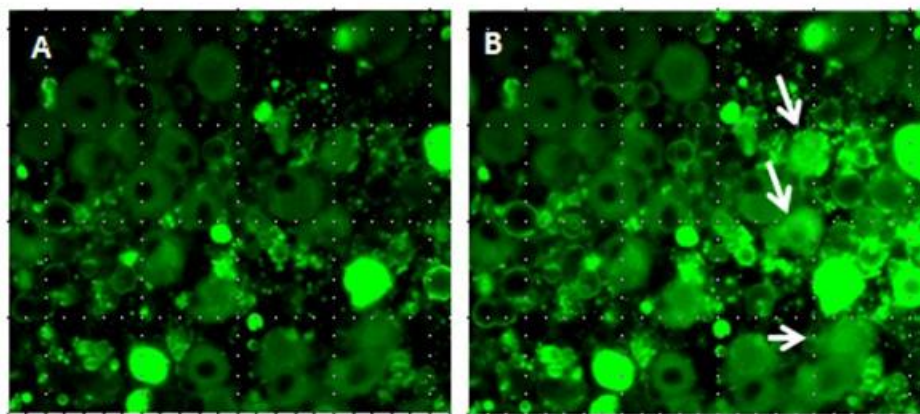
Foram avaliadas as variações máximas de fluorescência em cada neurônio ou célula glial testada. Foram comparadas as médias dos valores obtidos através dos testes t, quando duas

médias forem comparadas, ou por ANOVA, quando mais de duas médias forem comparadas. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados publicados anteriormente por Ferrari e colaboradores (2014), os quais avaliaram o influxo de cálcio em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal, mostraram que a administração de NMDA nas culturas, utilizando o mesmo protocolo que este trabalho proposto por Linhart, Obreja e Kress (2003), ativa receptores NMDA presentes em células satélites gliais e não ativa neurônios nociceptivos. Neste presente estudo, utilizamos o mesmo protocolo de estimulação nas culturas, mas observamos o potencial de repouso celular usando o indicador fluorescente DiBAC4(3), ao invés de variações de cálcio intracelular.

Figura 4 - Imagens de cultura primária de gânglio da raiz dorsal na presença do indicador de potencial de repouso, DiBAC4(3) em solução de Hanks/HEPES contendo Mg^{2+}

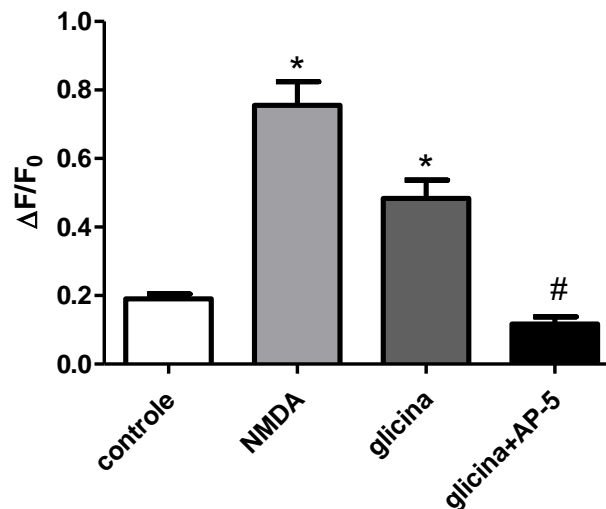


Fonte: DE ALMEIDA JÚNIOR (2020). (A) imagem foi adquirida antes da administração de glicina e NMDA, ou seja, em condições basais. (B) imagem obtida após 5 minutos da administração de NMDA (250 μM) na presença de glicina (10 μM). Estas imagens, obtidas através de microscopia confocal, ilustram o resultado descrito a seguir. As setas brancas indicam alguns dos neurônios que apresentam despolarização após a administração de NMDA.

A análise das imagens obtidas mostra que a administração de NMDA, na presença de glicina, causa uma significativa despolarização no potencial de membrana de neurônios nociceptivos (Figuras 4 e 5). Os resultados mostraram também que a administração de glicina sozinha foi capaz de induzir despolarização neuronal, sendo que esta despolarização é bloqueada na presença do antagonista de receptores NMDA D-AP-5.

Figura 5 - Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC4(3) induzida por NMDA (250 μM) em culturas primárias de GRD de 24 h na presença ou ausência de Mg^{2+}

Efeito da administração de glicina e NMDA sobre o potencial de repouso de neurônios do gânglio da raiz dorsal

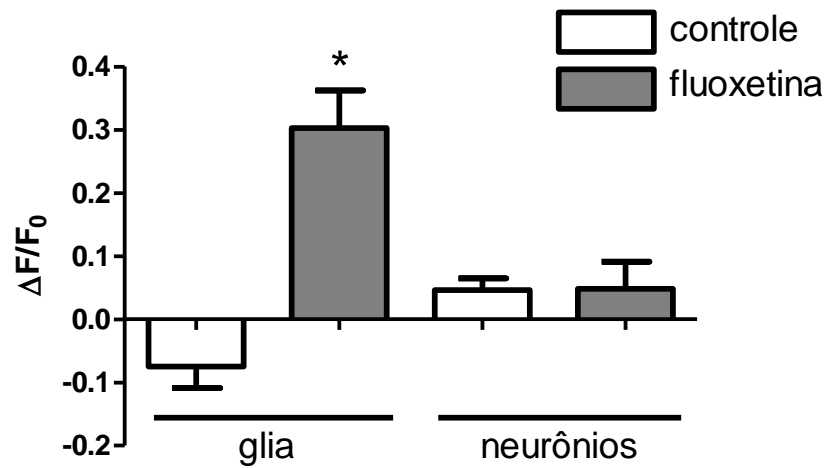


Fonte: DE ALMEIDA JÚNIOR (2020). (A) Aumento máximo de fluorescência induzida por NMDA (250 μM) na presença do co-agonista glicina (10 μM), aumento máximo de fluorescência induzida por glicina sozinha ou na presença de D-AP-5 (200 μM). Dados mostrados como média \pm EPM de 7 a 19 neurônios. * significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$). # significativamente diferente do grupo glicina (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

A possível participação de canais de potássio Kir4.1 na regulação do potencial de repouso neuronal foi avaliada através da administração de fluoxetina (30 μM). A administração de fluoxetina resultou em uma significativa despolarização das células satélites gliais enquanto não foi observada qualquer alteração no potencial de repouso dos neurônios do gânglio da raiz dorsal (Figura 2).

Figura 6 - Efeito da fluoxetina sobre o potencial de repouso de células satélites gliais e neurônios da raiz dorsal

Efeito da fluoxetina sobre o potencial de repouso



Fonte: DE ALMEIDA JÚNIOR (2020). Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC4(3) em culturas primárias de GRD de 24h na presença de Mg^{2+} . Aumento máximo de fluorescência observada após 5 minutos da administração de fluoxetina (30 μM). * significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$, teste t).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo conseguimos avançar no entendimento de como a comunicação glutamatérgica entre neurônios nociceptivos primários e CSGs participa da modulação do sinal doloroso nos gânglios sensoriais. No estudo anterior de Ferrari e colaboradores (2014), havia-se verificado que o bloqueio dos receptores NMDA nos gânglios da raiz dorsal causa uma diminuição na hiperalgesia inflamatória. Para nossa surpresa, os experimentos *in vitro* mostraram que o receptor NMDA está presente nas células satélites gliais e não nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (ver figura 3). As CSGs se encontram recobrando os corpos celulares dos neurônios sensoriais e já se foi demonstrado que existem junções comunicantes que interconectam as CSGs que recobrem neurônios vizinhos (HANANI, 2012). Deste modo, quando um receptor NMDA é ativado pela liberação de glutamato por um neurônio, o cálcio que entra pelo receptor pode se difundir para células satélites próximas. Nos estudos anteriores, entretanto, não foi possível determinar como as CSGs poderiam influenciar na resposta neuronal para modular o sinal doloroso. No presente estudo, verificamos que ao ativar as células satélites gliais pela administração de NMDA nas culturas, ocorre uma despolarização nos neurônios nociceptivos. (Figura 5). Este resultado é muito interessante visto que indica o mecanismo pelo qual as células satélites conseguem atuar nos neurônios e assim amplificar o sinal nociceptivo quando há passagem deste no gânglio da raiz dorsal. Em um estudo anterior de (Amir e Devor (1996), havia sido observada uma despolarização de neurônios do gânglio da raiz dorsal quando um neurônio vizinho a esses era estimulado eletricamente. Os pesquisadores denominaram este processo de estimulação cruzada, mas não conseguiram determinar o mecanismo responsável por este processo. Para esses pesquisadores, o diálogo parecia ser mediado, pelo menos em parte, por uma substância ou substâncias difusíveis dependentes de atividade liberadas de corpos neuronais e/ou axônios adjacentes, e detectadas por corpos neuronais e/ou axônios de células vizinhas. Nossos resultados sugerem que a comunicação glutamatérgica envolvendo a ativação de receptores NMDA em CSGs é responsável pelo processo de despolarização cruzada, que irá amplificar o sinal nociceptivo nos gânglios sensoriais. Esta interação entre neurônios e CSGs na modulação da dor também pode explicar o motivo pelo qual os potenciais de ação adentram os gânglios sensoriais se propagando pelos corpos neuronais, o que não é comum em neurônios do sistema nervoso central (DEVOR, 1999).

A avaliação do efeito de administração de NMDA e glicina mostrou que ambas as moléculas promovem despolarização dos neurônios (Figura 5). Sabe-se que a glicina é um

neurotransmissor inibitório atuando principalmente no controle da dor na medula espinal. (ZEILHOFER, 2005). A glicina foi utilizada neste trabalho, sendo um co-agonista necessário para a ativação do receptor NMDA, atuando nas subunidades GluN1 e GluN3 (HERNANDES; TRONCONE, 2009; SKOWROŃSKA et al., 2019). Por outro lado, sabe-se através da literatura da existência de um receptor dimérico formado pela subunidade GluN1 e GluN3 (PIÑA-CRESPO et al., 2010) que é responsivo à glicina e sua presença nas células satélites gliais ou neurônios poderia ser responsável pelo efeito observado. No entanto, o efeito induzido pela administração de glicina sobre a despolarização neuronal foi inibido pela administração prévia do antagonista de receptores NMDA, o D-AP-5. Este resultado mostra que o efeito excitatório da glicina observado neste estudo se deve à ativação de receptores do tipo NMDA, visto que este antagonista não é capaz de bloquear o receptor dimérico. Considerando que a solução de Hanks/HEPES utilizada para os experimentos não possui adição de glutamato, é provável que este neurotransmissor seja liberado pelas células em cultura, talvez por neurônios que estejam em sofrimento ou morrendo devido às condições experimentais.

O receptor NMDA também se mostrou resistente ao bloqueio pelo Mg^{2+} presente na composição do meio Hanks/HEPES o que lhe confere uma característica de um receptor não composto exclusivamente pelas subunidades clássicas GluN1, GluN2A e GluN2B (SKOWROŃSKA et al., 2019). Essa observação foi comprovada pela ativação dos RNMDAs em ambos os experimentos, o que suporta a composição não-clássica do RNMDA com a presença da subunidade NR3A na glia como observado estudo de Ferrari e colaboradores (2014). Esta subunidade do receptor é típica de células gliais (HENSON et al., 2010) justamente porque estas células possuem o potencial de membrana bastante negativo e não possuem outros receptores glutamatérgicos que seriam responsáveis por despolarizar a membrana e promover o deslocamento dos íons Mg^{2+} , como ocorre em neurônios.

Tendo então observado que a ativação das CSGs induz despolarização dos neurônios, procuramos avançar no entendimento do mecanismo responsável por tal processo. Conforme descrito da introdução, Obara-Michlewska e colaboradores (2015) verificaram que a ativação dos receptores NMDA em astrócitos induz uma diminuição na expressão de um subtipo específico de canal de potássio, o canal Kir 4.1. Este canal de potássio possui um papel muito importante no controle dos níveis extracelulares de potássio, pois são responsáveis por absorver o excesso de potássio extracelular liberado durante os potenciais de ação neurais. Os íons de potássio se difundem pelos canais Kir após a atividade neuronal fazendo com que esse excesso seja compartilhado através de junções comunicantes para outras células até locais com concentrações menores desse íon. Assim, uma diminuição na atividade deste canal resultaria

em acúmulo de K^+ extracelular e consequente despolarização neuronal. A importância desse canal na nocicepção foi também demonstrada em outros estudos, ver revisão de Hanani e Spray (2020).

Os canais Kir4.1 podem ser bloqueados pela fluoxetina como demonstrada em estudo anterior (KINBOSHI et al., 2017), que verifica o efeito deste antidepressivo em astrócitos. Essa atividade farmacológica não convencional da fluoxetina vem sendo verificada a pouco tempo e mostra-se importante de ser corroborada tendo em vista esse ser o antidepressivo da classe dos inibidores da recaptação de serotonina mais prescrito no mundo (ROSSI; BARRACO; DONDA, 2004).

Para avaliar se a despolarização neuronal induzida por NMDA poderia ocorrer pelo fechamento de canais Kir4.1 em CSGs, administramos a fluoxetina e verificamos as alterações no potencial de repouso das células gliais de dos neurônios. Observamos na Figura 6 que a fluoxetina causou uma despolarização nas CSGs, porém não afetou o potencial de membrana dos neurônios. A despolarização das CSGs era esperada e comprova o efeito da fluoxetina em bloquear os canais Kir4.1 e a presença destes canais das CSGs (HANANI; SPRAY, 2020). No entanto, o fato de este bloqueio não afetar o potencial de repouso neuronal indica que o bloqueio destes canais não deve ser responsável pela despolarização neuronal observada quando da administração de NMDA às culturas. Este resultado não significa que estes canais não são importantes para a regulação do K^+ extracelular, já que na cultura o ambiente é muito distinto daquele fisiológico no gânglio da raiz dorsal.

Em resumo, com este trabalho podemos mostrar que as células satélites gliais são importantes na amplificação do sinal doloroso quando estes passam pelos gânglios sensoriais. Esta amplificação ocorre quando as células satélites são ativadas pelo glutamato, que atua em receptores NMDA produzindo influxo de íons cálcio. Estes íons podem se propagar para CSGs vizinhas através de junções comunicantes e ativar estas células próximas. As CSGs ativadas promovem a despolarização do potencial de repouso dos neurônios próximos, aumentando a excitabilidade destes neurônios. O mecanismo envolvido nesta despolarização ainda precisa ser definido, mas parece não depender dos canais Kir4.1 presentes nas células gliais.

6 CONCLUSÃO

A ativação de receptores NMDA em CSGs do GRD causou despolarização neuronal. Portanto, a intercomunicação entre neurônios nociceptivos e células satélites gliais pode amplificar a sinalização nociceptiva no DRG e pode explicar a excitação cruzada descrita anteriormente por Amir e Devor (1996). A despolarização neuronal induzida por CSGs não parece ser dependente da regulação extracelular do potássio pelo canal Kir 4.1.

REFERÊNCIAS

- AMIR, R.; DEVOR, M. Chemically Mediated Cross-Excitation in Rat Dorsal Root Ganglia. **The Journal of Neuroscience**, Jerusalém, v. 16, n. 15, p.4733-4741, ago. 1996. DOI: DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-15-04733>. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=8764660>. Acesso em: 6 ago. 2018.
- BUTT, A. M.; KALSI, A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 33-44, fev. 2006. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00289.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933100/>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- CASTILLO, C. et al. Satellite glia cells in dorsal root ganglia express functional NMDA receptors. **Neuroscience**, Nova Iorque, v. 240, p.135-146, jun. 2013. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.031>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452213001656>. Acesso em: 6 ago. 2018.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, Jerusalém, v. 82, p. 27–35, 1999. DOI: 10.1016/S0304-3959(99)00135-9. Disponível em: https://journals.lww.com/pain/Abstract/1999/08001/Unexplained_peculiarities_of_the_dorsal_root.6.aspx. Acesso em: 14 fev. 2020. Supplement n.1.
- FERRARI, L. F. *et al.* Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 51, p. 18363–18368, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1420601111>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/111/51/18363>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- FURUTANI, K. *et al.* Mutational and in silico analyses for antidepressant block of astroglial inward-rectifier Kir4.1 channel. **Molecular Pharmacology**, Osaca, v. 75, n. 6, p. 1287–1295, 2009. DOI: 10.1124/mol.108.052936. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19264848/>. Acesso em: 28 nov. 2020.
- HANANI, M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: Implications for chronic pain. **Brain Research**, Jerusalém, v. 1487, p. 183–191, 2012. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.03.070. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771859/>. Acesso em: 27 set. 2017.
- HANANI, M.; SPRAY, D. C. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.] 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41583-020-0333-z>. Acesso em: 9 ago. 2020.
- HARPER, A. A.; LAWSON, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. **The Journal of Physiology**, Bristol, v. 359, n. 1, p. 31–46, 1985. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1193363/pdf/jphysiol100580-0041.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2020.

HENSON, M. A. et al. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. **Progress in Neurobiology**, Chapel Hill, v. 91, n. 1, p. 23–37, 2010. DOI:10.1016/j.pneurobio.2010.01.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883719/>. Acesso em: 5 dez. 2020.

HERNANDES, M. S.; TRONCONE, L. R. P. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: A short review. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 116, n. 12, p. 1551–1560, 2009. DOI: 10.1007/s00702-009-0326-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-009-0326-6#:~:text=Glycine%20is%20recognized%20as%20the,channel%20selective%20to%20chloride%20ions.&text=Spinal%20inhibitory%20reflexes%20involve%20recurrent,glycine%20takes%20a%20fundamental%20role..> Acesso em: 26 ago. 2020.

HUANG, T.; BELZER, V.; HANANI, M. Gap junctions in dorsal root ganglia: Possible contribution to visceral pain. **European Journal of Pain**, [s. l.], v. 14, n. 1, p.1-11, jan. 2010. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.02.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090380109000482>. Acesso em: 6 ago. 2018.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (Seattle). **Classification of Chronic Pain: Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage**. 1994. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>. Acesso em: 6 set. 2018.

HIBINO, H. *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. **Physiological Reviews**, Tours, v. 90, n. 1, p. 291–366, jan. 2010. DOI:10.1152/physrev.00021.2009. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00021.2009>. Acesso em: 3 nov. 2020.

KEHOE, L. A.; BERNARDINELLI, Y.; MULLER, D. GluN3A: An NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. **Neural Plasticity**, Pamplona, v. 2013, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/145387>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/np/2013/145387/>. Acesso em: 17 nov. 2020.

KINBOSHI, M. *et al.* Inhibition of inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels facilitates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in astrocytes. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, Osaca, v. 10, p. 1–12, dez. 2017. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00408. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768989/>. Acesso em: 27 fev. 2020.

LEMES, J. B. P. *et al.* Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception. **Neuroscience Letters**, [s.l.]v. 676, p. 8–12, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394018302581?via%3Dihub>. Acesso em: 3 nov. 2020.

LINHART, O; OBREJA, O; KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, [s. l.], v. 118, n. 1, p.69-74, abr. 2003. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00960-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00960-0). Acesso em: 11 fev. 2020.

NEVES, A. F. *et al.* Peripheral Inflammatory Hyperalgesia Depends on P2X7 Receptors in Satellite Glial Cells. **Frontiers in Physiology**, Uberlândia, v. 11, p. 1–13, maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>. Acesso em: 3 nov. 2020.

NIESTERS, M.; MARTINI, C.; DAHAN, A. Ketamine for chronic pain: Risks and benefits. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Leiden, v. 77, n. 2, p. 357–367, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.12094>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014022/>. Acesso em: 28 nov. 2020.

OBARA-MICHELLEWSKA, M. *et al.* Astroglial NMDA receptors inhibit expression of Kir4.1 channels in glutamate-overexposed astrocytes in vitro and in the brain of rats with acute liver failure. **Neurochemistry International**, Manchester, v. 88, p. 20–25, 2015. DOI:10.3390/ijms20020309. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197018614002228?via%3Dihub>. Acesso em: 11 fev. 2020.

PELTONIEMI, M. A. *et al.* Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. **Clinical Pharmacokinetics**, [s.l.] v. 55, n. 9, p. 1059–1077, 2016. DOI: 10.1007/s40262-016-0383-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40262-016-0383-6>. Acesso em: 28 nov. 2020.

PIÑA-CRESPO, J. C. *et al.* Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 “NMDA” receptor subunits. **Journal of Neuroscience**, Calgary, v. 30, n. 34, p. 11501–11505, 2010. DOI: 10.1007/s00018-005-5107-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2941801/>. Acesso em: 5 dez. 2020.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; VERRI, Waldiceu A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 5-19, jan. 2017. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(16\)30143-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490616301430%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(16)30143-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471490616301430%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 11 fev. 2020.

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain. **Pain**, [s. l.], v. Publish Ahead of Print, n. 00, p. 1-8, 13 jul. 2020. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001939. Disponível em: https://sbed.org.br/wp-content/uploads/2020/08/Definição-revisada-de-dor_3.pdf. Acesso em: 19 ago. 2020.

ROSSI, A.; BARRACO, A.; DONDA, P. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. **Annals of General Hospital Psychiatry**, Sesto Fiorentino, v. 3, p. 1–8, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC356924/pdf/1475-2832-3-2.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2020.

RUPPERSBERG, J. P. Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, Tübingen, v. 441, n. 1, p. 1–11, set. 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004240000380>. Acesso em: 3 nov. 2020.

SKOWROŃSKA, K. *et al.* NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, jan. 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijms20020309>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/309>. Acesso em: 3 nov. 2020.

SOUZA, G. R. *et al.* Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11193–11198, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307445110>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/110/27/11193>. Acesso em: 3 nov. 2020.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, [s.l.], v. 27, n. 12, p. 507–511, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.10.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0263931909002531>. Acesso em: 25 ago. 2020.

VIT, J. P. *et al.* Silencing the Kir4.1 potassium channel subunit in satellite glial cells of the rat trigeminal ganglion results in pain-like behavior in the absence of nerve injury. **Journal of Neuroscience**, São Francisco, v. 28, n. 16, p. 4161–4171, abr. 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.1523%2FJNEUROSCI.5053-07.2008>. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/28/16/4161>. Acesso em: 3 nov. 2020.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **Journal Of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 120, n. 11, p. 3742-3744, nov. de 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965006/pdf/JCI45178.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2020.

YAM, M. F. *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 2164-2186, jun. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121522/>. Acesso em: 10 fev. 2020.

YAMADA, A. *et al.* Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in HEK293 cells. **Japanese Journal of Pharmacology**, Nagoya, v. 86, n. 3, p. 342–350, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002151981930352X>. Acesso em: 28 nov. 2020.

ZEILHOFER, H. U. Cellular and Molecular Life Sciences The glycinergic control of spinal pain processing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Erlangen, v. 62, p. 2027–2035, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5107-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-005-5107-2>. Acesso em: 5 dez. 2020.

ZHU, Y. F.; WU, Q.; HENRY, J. L. Changes in functional properties of A-type but not C-type sensory neurons in vivo in a rat model of peripheral neuropathy. **Journal of Pain Research**, v. 5, p. 175–192, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3392709/pdf/jpr-5-175.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2020.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983. Disponível em: https://journals.lww.com/pain/Citation/1983/06000/Ethical_guidelines_for_investigations_of.1.aspx. Acesso em: 25 fev. 2020.