

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Júlia Borges Paes Lemes

**Participação dos receptores P2X7 presentes em células da glia
do gânglio da raiz dorsal na nocicepção**

Uberlândia

2017

Júlia Borges Paes Lemes

**Participação dos receptores P2X7 presentes em células da glia
do gânglio da raiz dorsal na nocicepção**

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do título de Mestre do
Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Dr^a Celina Monteiro da
Cruz Lotufo

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L552p Lemes, Júlia Borges Paes, 1992
2017 Participação dos receptores P2X7 presentes em células da glia do
gânglio da raiz dorsal na nocicepção / Júlia Borges Paes Lemes. - 2017.
60 f. : il.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Gânglios Sensitivos - Teses. 3. Neurônios -
Teses. 4. Receptores Purinérgicos - Teses. I. Lotufo, Celina Monteiro da
Cruz. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Lemes, Júlia B.P.

Participação dos receptores P2X7 presentes em células da glia do gânglio da raiz dorsal na nocicepção

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Ciências Biomédicas. Área de Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Descritores: dor, gânglio da raiz dorsal, receptores P2X7, junções comunicantes.

Júlia Borges Paes Lemes

Participação dos receptores P2X7 presentes em células da glia do gânglio da raiz dorsal na nocicepção

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Dr^a Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Aprovada em 13 de Fevereiro de 2017

Banca examinadora:

Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Dr. Cássia Regina Silva

Dr^a Simone Ramos Deconte

Uberlândia

2017

Dedico esse trabalho a todos que me apoiaram na realização desse projeto, em especial minha mãe. Dedico também a todos, que de alguma forma terão proveito no futuro dos resultados aqui mostrados.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Kátia e José Maurício, por sempre me apoiar e incentivar meus estudos. Vocês me ensinaram que a conquista de um sonho requer muito esforço, trabalho e dedicação.

Às minhas irmãs Carolina e Marina pela compreensão, amizade e companheirismo. Agradeço também minhas tias, tios, avós e primas por me darem forças nas horas mais difíceis e por acreditarem no meu potencial.

À minha orientadora e amiga, Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos desse trabalho, me ajudando nos experimentos, me orientando, me mostrando o caminho e me dando todo suporte para não desistir do meu sonho. Você foi e é minha inspiração como pesquisadora e professora.

À todos os meus colegas da Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural Aplicadas que foram meus companheiros nessa batalha, me deram conselhos e me ajudaram a seguir em frente.

Aos meus colegas de laboratório, Danielle, Paulla, Ruth, Maria Vitória, Bruno, Felipe, Taís e Débora que me ajudaram nos experimentos e me apoiaram nas minhas decisões. De colegas de trabalho se tornaram meus amigos que vou levar para vida toda.

Aos professores do ARFIS, em especial a Profa. Ana Paula, pelo apoio, incentivo e conselhos. O trabalho ficava mais alegre e divertido com as nossas conversas.

A Capes pelo financiamento que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

A Universidade Federal de Uberlândia, incluindo todos os colaboradores pela credibilidade, financiamento e contribuições feitas a esse projeto.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte da realização desse trabalho.

RESUMO

Nos gânglios sensitivos, os corpos celulares dos neurônios encontram-se circundados por células gliais denominadas células satélites. Estudos recentes apontam para uma possível comunicação entre neurônios e células satélites através da liberação de ATP e ativação de receptores P2X7 presentes nas células gliais. Além disto, células satélites adjacentes podem estar conectadas através de junções comunicantes (“gap junctions”). Até o presente, a comunicação entre células satélites e neurônios tem sido implicada na cronificação da dor e em processos inflamatórios. Nesse estudo buscamos avaliar o papel da comunicação entre neurônios e células satélites através da ativação dos receptores P2X7 assim como das junções comunicantes em modelos de dor aguda. Em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal, verificamos que a administração de capsaicina leva a um aumento de cálcio em neurônios e em seguida em células satélites sendo que a resposta das células satélites foi bloqueada por A740003, um antagonista seletivo para receptores P2X7, indicando que os nociceptores quando ativados liberam ATP que, por sua vez, ativa receptores P2X7 nas células gliais. Para avaliar o papel desta comunicação celular *in vivo*, o antagonista P2X7 ou o bloqueador de junções comunicantes, carbenoxolona, foram administrados por via intraganglionar (L5) e foram avaliados os efeitos das injeções intraplantares de capsaicina, mentol e formalina em ratos. Tanto o A740003 quanto a carbenoxolona reduziram a nocicepção induzida por capsaicina e mentol. No teste da formalina, ambas as substâncias afetaram apenas a segunda fase do teste, considerada a fase inflamatória. Capsaicina ativa seletivamente receptores TRPV1 e mentol ativa receptores TRPM8, e possivelmente receptores TRPA1, que são expressos majoritariamente em neurônios nociceptivos associados a fibras C. Além disto, estudos de outros autores indicam a primeira fase do teste da formalina envolve principalmente a ativação de fibras do tipo A δ enquanto que a segunda fase envolve a ativação de fibras A δ e C. Considerando estes dados juntamente como os presentes resultados, podemos sugerir que a comunicação entre células satélites e neurônios ocorre também na dor aguda, mas apenas quando esta depende da ativação de fibras C. Deste modo, a comunicação entre neurônios e células satélites, via liberação de ATP e ativação de receptores P2X7, assim como uma comunicação entre células satélites adjacentes através de junções comunicantes parecem estar envolvidos em um processamento rápido do sinal doloroso no gânglio da raiz dorsal.

Palavras-chaves: gânglio da raiz dorsal, células satélites, receptores P2X7, junções comunicantes.

ABSTRACT

In sensory ganglia, the cellular bodies of neurons are surrounded by glial cells called satellite cells. Recent studies point to a possible communication between neurons and satellite cells through the release of ATP and activation of P2X7 receptors present in glial cells. In addition, adjacent satellite cells may be connected through gap junctions. Still today, the communication between satellite cells and neurons has been implicated in chronic pain and in inflammatory processes. In this study we sought to evaluate the role of communication between neurons and satellite cells through the activation of the P2X7 receptors as well as of the communicating junctions in acute pain models. In primary cultures of dorsal root ganglia, we found that the administration of capsaicin leads to an increase of calcium in neurons and then in satellite cells. The response of satellite cells was blocked by A740003, a selective antagonist for P2X7 receptors, indicating that nociceptors when activated release ATP, which in turn activates P2X7 receptors in the glial cells. To assess the role of this *in vivo* cellular communication, the P2X7 antagonist or the gap junction blocker, carbenoxolone, were administered by intraganglionic injection (L5) and the effects of intraplantar injections of capsaicin, menthol or formalin in rats were evaluated. Both A740003 and carbenoxolone reduced nociception induced by capsaicin and menthol. In the formalin test, both substances affected only the second phase of the test, considered the inflammatory phase. Capsaicin selectively activates TRPV1 receptors while menthol activates TRPM8 receptors, and possibly TRPA1 receptors, which are expressed mainly in nociceptive neurons associated with C fibers. In addition, studies by other authors indicate that the first phase of the formalin test involves primarily the activation of A δ fibers whereas the second phase involves the activation of A δ and C fibers. Considering these data together with the present results, we can suggest that the communication between satellite cells and neurons also occurs in acute pain, but only, when it depends on the activation of C fibers. Thus, communication between neurons and satellite cells, via release of ATP and activation of P2X7 receptors, as well as communication between adjacent satellite cells through gap junctions seems to be involved in a rapid processing of the pain signal in the dorsal root ganglion.

Keywords: dorsal root ganglion, satellites cells, P2X7 receptors, gap junctions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral dos experimentos <i>in vivo</i>	25
Figura 2: Injeção intraganglionar (i.g.)	27
Figura 3: Método von Frey eletrônico	29
Figura 4: Avaliação do papel dos receptores P2X7 e liberação de ATP por neurônios nociceptivos ativados por capsaicina <i>in vitro</i>	31
Figura 5: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nocicepção e na hiperalgesia mecânica, induzida por capsaicina	32
Figura 6: Avaliação da participação das junções comunicantes na nocicepção e na hiperalgesia mecânica, induzida por capsaicina	33
Figura 7: Avaliação do efeito conjunto de A740003 + carbenoxolona na nocicepção induzida por capsaicina.....	34
Figura 8: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por mentol.....	35
Figura 9: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por formalina.....	36
Figura 10: Avaliação da participações das junções comunicantes na nocicepção induzida por formalina	36
Figura 11: Avaliação do efeito do BzATP sobre a resposta dos neurônios e células satélites estimulados com capsaicina.....	37
Figura 12: Comunicação neu-glia.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP - Adenosina trifosfato
- CFA - Adjuvante Completo de Freund
- CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CSGs - Células Satélites Gliais
- Da - Dalton
- DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecc
- DMSO – dimetilsulfóxido
- GRD - Gânglio da Raiz Dorsal
- GT - Gânglio trigeminal
- GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
- HEPES - ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfônico
- I.g. - Injeção Intraganglionar
- I.pl. - Injeção Intraplantar
- IASP- Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IB4- isolectina B4
- IL-1 β - interleucina 1 β
- L5 - vértebra lombar 5
- LPS - lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*
- NGF - fator de crescimento neuronal
- P2X7 – Receptor purinérgico inotrópicos subtipo sete
- P2X3 - Receptor purinérgico inotrópicos subtipo três
- P2X1 - Receptor purinérgico inotrópicos subtipo um
- SNC – sistema nervoso central
- SNP – sistema nervoso periférico
- TNF α – fator de necrose tumoral α
- TrkA - receptor com alta afinidade para neurotrofina
- TRPA1 - receptor de potencial transitório, da subfamília anquirina, membro um
- TRPM8 - receptor de potencial transitório, da subfamília melastatina, membro oito
- TRPV1 - receptor vanilóide de potencial transitório 1
- VNUT – transportador nucleotídico vesicular

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1. Dor: Visão geral.....	12
1.2. Nociceptores.....	13
1.3. Gânglio da raiz dorsal.....	14
1.4. Receptores TRPs.....	16
1.5. Células satélites gliais (CSGs) e seu papel na dor.....	18
1.6. Junções comunicantes (“gap junctions”)	20
1.7. ATP e receptores purinérgicos.....	21
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivo específico.....	24
3. Material e Métodos.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Drogas.....	25
3.3. Delineamento experimental.....	25
3.4. Técnicas.....	26
3.4.1. Injeção intraganglionar.....	26
3.4.2. Injeção intraplantar de capsaicina.....	27
3.4.3. Injeção intraplantar de mentol.....	27
3.4.4. Teste da formalina.....	28
3.4.5. Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico.....	28
3.4.6. Cultura primária do gânglio da raiz dorsal	29
3.5. Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Papel dos receptores P2X7 gliais e liberação de ATP por neurônios nociceptivos ativados por capsaicina.....	31
4.2. Participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por capsaicina.....	32
4.3. Participação das junções comunicantes na nocicepção induzida por capsaicina.....	33
4.4. Avaliação do efeito conjunto do bloqueio de junções comunicantes e receptores P2X7 na nocicepção induzida por capsaicina.....	33
4.5. Participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por mentol.....	34

4.6. Participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por formalina.....	35
4.7. Participação das junções comunicantes na nocicepção induzida por formalina.....	36
4.8. Cultura do GRD: avaliação do efeito do BzATP sobre a resposta dos neurônios e células satélites estimulados com capsaicina.....	37
5. Discussão.....	38
5.1. Esquema: Comunicação neurônio-glia no GRD envolvendo liberação de ATP...45	
6. Conclusão.....	46
Referências bibliográficas.....	47
Anexo 1- Certificado: Comissão de Ética na Utilização de Animais – UFU.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor: visão geral

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos de tal dano”. Essa definição foi a primeira a reconhecer o fenômeno da dor como uma experiência envolvendo tanto dimensões sensorial-discriminativa como afetivo-motivacional. O componente sensorial-discriminativa da dor se refere à percepção e detecção do estímulo nocivo quanto a sua intensidade, localização, duração, padrão temporal e qualidade. Já o componente afetivo-motivacional diz respeito ao componente emocional da dor, percebido como sofrimento (OLIVEIRA IN LENT, 2008). Assim, a dor é uma experiência sensorial complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nocivo, mas também processos cognitivos e emocionais (JULIUS e BASBAUM, 2001).

A dor constitui um dos componentes essenciais na defesa corporal, pois fornece um rápido aviso ao Sistema Nervoso Central (SNC) que resulta em uma resposta motora buscando a preservação física do indivíduo. Em casos raros, como em condição de insensibilidade congênita, o indivíduo não tem a percepção da dor, causando sérios problemas para a saúde, tais como: automutilações, autoamputações e perda da visão (AXELROD e HILZ, 2003). Por outro lado, em algumas patologias, principalmente em inflamações crônicas e neuropatias, a dor deixa de ter caráter protetor e se torna um sintoma indesejável prejudicando, significativamente, o bem estar do indivíduo e podendo tornar-se debilitante. Nesses casos, utilizam-se fármacos com ação analgésica e anti-inflamatória buscando o alívio da dor.

De maneira geral, a dor pode ser classificada em nociceptiva (fisiológica) ou patológica. A primeira requer um estímulo nocivo, e geralmente é transitória, pois tende a desaparecer quando o estímulo nocivo é cessado (dor aguda). Esse tipo de dor fornece o alerta ao organismo, ocasionando respostas comportamentais e reação de retirada ou afastamento do estímulo nocivo. Já o segundo tipo de dor, também referida como dor crônica, possui como característica a persistência, mesmo na ausência do estímulo, e geralmente é de difícil localização. As dores patológicas estão associadas a inflamação do tecido advindo de uma lesão (dor inflamatória) ou a lesões do sistema nervoso periférico ou central, dor neuropática (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Clinicamente, a inflamação é caracterizada pelos cinco sinais cardinais: rubor, calor, tumor, dor e perda de função. A função da inflamação é eliminar a causa inicial da lesão da

célula e iniciar o reparo tecidual. A inflamação aguda é uma resposta protetora envolvendo células do sistema imune, vasos sanguíneos e mediadores moleculares. Vários dos mediadores inflamatórios conhecidos causam dor ao se ligar a seus receptores em neurônios sensoriais primários no sistema nervoso periférico (SNP) que inervam pele lesada, músculos e tecidos articulares (BASBAUM et al., 2009; GOLD et al., 2010). A dor inflamatória apresenta a função de proteger a região lesada de forma a favorecer a recuperação. Em contraste com a inflamação aguda, a inflamação crônica é muitas vezes prejudicial, estando envolvida em uma série de doenças como a periodontite, aterosclerose, artrite reumatóide e até mesmo câncer (JI et al., 2014).

Portanto, diferentes formas de dor são produzidas por diversos mecanismos moleculares e celulares que podem atuar isoladamente ou em combinação com o sistema nervoso periférico e central. Assim, compreender os mecanismos envolvidos na geração, manutenção, modulação da dor e identificar as células e/ou moléculas envolvidas é substancial para descoberta de novos alvos terapêuticos (MCMAHON et al., 2006; SCHOLZ, 2002).

1.2. Nociceptores

Os nociceptores são células nervosas especializadas na detecção do estímulo doloroso. Cerca de um século atrás, Sherrington propôs a existência do nociceptor como sendo neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de provocar danos nos tecidos. Posteriormente, estudos com eletrofisiologia demonstraram, de fato, a existência de neurônios sensoriais primários que são excitados pelo calor nocivo, a pressão intensa ou produtos químicos irritantes. Os neurônios aferentes primários se diferem dos demais por apresentarem limiares altos característicos ou sensibilidade baixa (JULIUS e BASBAUM, 2001). Os nociceptores possuem terminações nervosas livres que estão presentes em diferentes tecidos como pele, músculos, articulações, vasos, osso e vísceras, e são capazes de transduzir e codificar diferentes estímulos nociceptivos externos e internos ao organismo (LOESER e TREEDE, 2008).

1.3. Gânglio da raiz dorsal

O corpo ou soma dos neurônios sensoriais primários estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) ou no gânglio trigeminal (GT). Os GRDs estão localizados perto da entrada de raízes dorsais na medula espinhal, mas não fazem parte do SNC. Os neurônios sensoriais são do tipo pseudounipolares apresentando um único axônio o qual apresenta uma bifurcação

em forma de T. Um ramo da bifurcação estende-se para a periferia formando as terminações sensoriais na pele, músculo, vísceras e outros órgãos, e outro ramo para medula espinhal (LIEBERMAN, 1976). Esses neurônios não apresentam dendritos e, portanto, parece não existir sinapses entre eles no GRD, entretanto, no corpo celular destes neurônios são encontrados receptores para neurotransmissores e para diversos mediadores, inclusive para mediadores inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α e prostaglandinas (DEVOR, 1999).

Neurônios do GRD consistem em múltiplos tipos de neurônios sensoriais primários com anatomia e morfologia diferentes. Suas subpopulações de fibras são divididas em mielinizadas (Fibras A) e não mielinizadas (Fibras C). Fibras A mielinizadas apresentam maior velocidade de condução e são classificadas em A β e A δ . As fibras A β participam de respostas táteis inócuas, enquanto que as A δ a repostas nocivas, tal como as fibras C (BASBAUM e JESSELL, 2000; LIU et al., 2001).

As fibras A δ são finamente mielinizadas, de médio diâmetro (2,0 a 6,0 μ m), com velocidade de condução média entre 12 e 30 m/s e correspondem aproximadamente 13% das fibras de dor na pele (BRENNEIS et al, 2013). As fibras C, não mielinizadas, são de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μ m), com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) e correspondem a 87% das fibras condutoras da informação dolorosa presentes na pele. São responsáveis pela dor lenta e difusa (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os nociceptores propriamente ditos estão associados a fibras C e a sua ativação pode resultar na liberação de glutamato, substância P e proteína associada ao gene da calcitonina (CGRP) pelos terminais centrais (MILLAN, 1999) que se conectam com os neurônios sensoriais de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal. A maioria dos nociceptores associados a fibra C são polimodais, respondendo a estímulos térmicos e mecânicos nocivos (RAJA, 1999). As fibras C também respondem a estímulos químicos nocivos, tais como a capsaicina, o ingrediente pungente das pimentas ardentes. Além desses, outros nociceptores são chamados silenciosos pois respondem somente quando sensibilizados por lesão tecidual (SCHUMIDT, 1995).

Estudos histoquímicos do GRD em animais adultos revelaram duas grandes classes de fibras C. A primeira refere-se a população peptidérgica que contém a substância P como neurotransmissor peptídico e expressa TrkA, o receptor tirosina-quinase com elevada afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF) (SINIDER e MCMAHON, 1998). A segunda população não expressa a substância P ou TrkA, mas pode ser marcado seletivamente com o α -

D-Galactosil-isolectina (IB4) (BASBAUM et al., 2009). Esta classificação funciona como um marcador molecular adicional para a identificação das células neuronais.

As vias responsáveis pela nocicepção originam-se junto a outros neurônios sensoriais no gânglio da raiz dorsal e, os axônios centrais das células nociceptivas entram na medula espinhal através das raízes dorsais. Os nociceptores chegam de forma ordenada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras A δ terminando principalmente nas lâminas I e V, as fibras C não peptidérgica na lâmina II, as fibras C peptidérgicas na lâmina I e as fibras A β na lâmina III, IV e V. Nessas regiões encontram-se neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem sendo alguns deles ativados apenas por estímulos nocivos. Os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam a linha média e ascendem ao tronco encefálico e ao tálamo no quadrante anterolateral (PURVES et al, 2010; MILLAN, 1999). O tálamo é responsável pela recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo. As diferentes projeções para seus núcleos e deles para o córtex definem a circuitaria funcional de processamento da dor. Os aspectos sensoriais e discriminativos são interpretados no córtex somatossensorial e os aspectos afetivos e motivacionais são direcionados a amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, colículo superior, formação reticular e núcleos talâmicos da linha média (WENG et al., 2000).

Os nociceptores quando excitados continuamente podem alterar sua função e responderem diferentemente a determinados estímulos. Quando se tem uma lesão tecidual são liberados vários mediadores inflamatórios que podem atuar sobre os neurônios sensoriais primários, como citocinas, eicosanóides, bradicinina, serotonina e histamina (FERREIRA et al., 1988, CUNHA et al., 1991, SACHS et al., 2002). A ação destes mediadores provocam a sensibilização neuronal, isto é, a diminuição do limiar de excitabilidade neuronal. Portanto, fibras sensibilizadas apresentam maior facilidade em serem ativadas frente a uma estimulação (RIEDEL; NEECK, 2001). Esse aumento da sensação provocada por um estímulo doloroso decorrente de um processo inflamatório, por exemplo, é denominado de hiperalgesia. Estudos mostram que a ação destes mediadores resultam em alterações fenotípicas nos neurônios sensoriais que contribuem para esse estado sensibilizado, como o aumento na expressão de alguns tipos de canais de sódio em fibras nociceptivas (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998). Outro evento associado ao processo inflamatório é a alodinia. Nesse caso, um estímulo inócua se torna doloroso.

A hiperalgesia/alodinia em animais é referida como hipernocicepção, que resulta principalmente da sensibilização dos neurônios sensoriais primários, ocorrendo principalmente em fibras C, embora também possa ocorrer sensibilização dos neurônios de segunda ordem. (MILLAN et al., 1999; FEIN, 2011). Portanto, a sensibilização é um processo distinto da nocicepção

propriamente dita. Enquanto que a nocicepção é a ativação das vias nociceptivas, isto é, o disparo de potenciais de ação, que será percebida como dor, a hiperalgesia ou sensibilização neuronal é um processo que não depende da excitação dos neurônios, mas que facilita o disparo dos potenciais de ação frente a um estímulo.

1.4. Receptores TRPs

Na membrana plasmática dos nociceptores estão presentes famílias de proteínas transmembranas que constituem em receptores e canais, os quais participam da transdução do sinal nervoso em várias modalidades de estímulos nocivos (OLIVEIRA IN LENT, 2008). Um exemplo importante são os canais TRP (receptor de potencial transitório). Esses canais representam uma extensa família de proteínas contendo mais de 30 tipos (RAMSEY et al., 2006) e possuem papel em vários processos biológicos como: absorção de cálcio, crescimento do cone neuronal, desenvolvimento de queratinócito e transdução sensorial (NILIUS, 2007). A família de canais TRP incluem seis membros: TRPC (canônico), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina). Todos esses canais são tetrâmeros e respondem a estímulos mecânicos, térmicos, químicos e vários outros advindos do ambiente extracelular e intracelular (PALAZZO et al., 2012).

O TRPV1 (receptor de potencial transitório, subfamília vaniloide, membro 1) é o fundador da subfamília de canais termosensíveis sendo o primeiro a ser descrito. Eles são expressos nos neurônios não mielinizados (fibras C) no GRD e GT e constituem aproximadamente 30-50% de todos os neurônios somatossensíveis dentro dos gânglios sensoriais de roedores (JULIUS 2005, PATAPOUTIAN et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2005b; TOMINAGA et al., 1998). Esse receptor forma um canal catiônico permeável a cátions monovalentes, como o sódio e potássio, e divalentes, com preferência para Ca^{2+} (BINSHTOK et al., 2007). A sua ativação leva ao aumento do Ca^{2+} citosólico e subsequente liberação de neuropeptídeos, como a substância P e o CGRP, por exocitose (DEVESA et al., 2014, SRINIVASAN, 2015).

O receptor TRPV1 é constituído por seis domínios transmembrana com a região de poro localizada entre o quinto e sexto domínios e longas caudas intracelulares N- e C- terminais (BEVAN et al, 2014). Dentro da cauda N-terminal, seis domínios de repetição de anquirina permitem a ligação de calmodulina e ATP (LISHKO et al, 2007). A cauda C-terminal contém o domínio TRP bem como sítios de ligação para o fosfoinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) e calmodulina. TRPV1 é ativado pela capsaicina (princípio ativo das pimentas ardentes), por calor nocivo ($\sim 43^{\circ}C$) e prótons em $pH < 6,0$ (CATARINA et al. 1997; KOBAYASHI et al. 2005b). A capsaicina liga-se à região do domínio três a quatro do receptor TRPV1 e quando ligada, orienta em uma configuração “tail-

up, head-down”, isto é cauda acima, cabeça abaixo. Nessa configuração grupos vanilil e amino formam interações específicas ancorando o ligante ao receptor (SMUTZER et al., 2016).

Camundongos “knockout” para TRPV1 apresentam déficits parciais na nocicepção térmica aguda, o que comprova o papel deste canal na dor provocada pelo calor. Vale ressaltar também que, os produtos resultantes de danos nos tecidos e inflamação podem diminuir drasticamente o limiar de temperatura desse receptor, podendo resultar em hiperalgesia térmica e hipersensibilidade à dor (BASBAUM et al. 2000; DAVIS et al., 2000).

Assim como o TRPV1, o TRPM8 forma um canal de cátion não seletivo homotetramérico com permeabilidade substancial aos íons cálcio (MCCOY et al., 2011; PEIER et al., 2002; YUDIN e ROHACS, 2012). O canal TRPM8 (receptor de potencial transitório, da subfamília melastatina, membro oito) é ativado por componentes naturais ou sintéticos que causam frio, como o mentol, bem como por estímulo térmico a frio ($< 26^{\circ}\text{C}$). TRPM8 é expresso em 15% de todos os neurônios somatossensorial, a maior parte em fibras C, e pouca quantidade em fibras A δ e um subconjunto destas células TRPM8 positivas podem coexpressar TRPV1. Em contraste com o TRPV1 que em condições normais confere sensibilidade a estímulos térmicos apenas dentro da gama nociva, o TRPM8 desempenha um papel tanto na sensação de frio inócua como nocivo *in vivo* (BAUTISTA et al., 2007; DHAKA et al., 2008; KNOWLTON et al., 2010, YUDIN e ROHACS, 2012). Outro canal TRP associado a resposta nociceptiva é o TRPA1. Esse canal é expresso em cerca de metade dos neurônios que expressam TRPV1. Alguns estudos tem associado TRPA1 com capacidade de detectar a dor ao frio (MC KEMY, 2005; KAWAN et al., 2009). O TRPA1 é seletivamente ativado por óleo de mostarda, mas também parece ser ativado por mentol (KARASHIMA, 2007; XIAO, 2008). No contexto da nocicepção, TRPA1 em mamíferos foi relacionado com a função de detectar o frio nocivo e contribuir para a sensibilização não mediada por TRPM8 (STORY et al., 2003). Entretanto, alguns autores apontam o contrário (CASPANI e HEPPENSTALL, 2009). Evidências recentes sugerem que TRPA1 exerce, em parte, papel na sensação aguda de dor, porém, contribui mais fortemente na lesão provocada pela hipersensibilidade.

1.5. Células satélites gliais (CSGs) e seu papel na dor

Os neurônios do GRD estão envolvidos por células gliais especializadas, chamadas Células Satélites Gliais (CSGs). Essas células formam uma bainha ao redor de cada neurônio sensorial formando uma unidade separada dos neurônios vizinhos (HANANI, 2005). Estas unidades estão separadas por regiões que contêm tecido conjuntivo. Em alguns casos (5,6% em GRD de ratos) os neurônios formam pequenos grupos contendo de duas a três células que são

colocados em um espaço de tecido conjuntivo comum. Esses grupos são mais prevalentes em animais jovens (PANNENESE et al, 1991; PANNENESE et al., 1996). Alguns estudos mostraram que as CSGs compartilham características com astrócitos, como a expressão de glutamina sintase e vários neurotransmissores (HANANI, 2005; TAKEDA et al., 2009; JASMIN et al., 2010). Entretanto, exames ultraestruturais levaram a conclusão de que as células satélites gliais são um tipo distinto de célula da glia (PANNENESE, 1981). As funções das células satélites ainda são pouco compreendidas, mas está claro que elas possuem receptores para vários neurotransmissores e portanto, participam da comunicação intercelular (WEICK et al., 2003; CERUTI et al., 2008; GU et al., 2010).

Na maior parte do SNC as células endoteliais formam uma barreira para a difusão de moléculas grandes dos vasos sanguíneos para o espaço extracelular ao redor do neurônio, formando a barreira hematoencefálica. Entretanto, no gânglio sensorial essa barreira não existe (ARVIDSON, 1979; AZZI 1990; TEN TUSSCHER, 1989; JACOBS, 1976). Shinder e Devor (1994) observaram que La^{3+} penetrou pelo espaço entre CSGs e neurônio, e sugerem que o arranjo dessas células permite a comunicação entre neurônios no GRD por meio da difusão de neurotransmissores. Trabalhos demonstraram também que não apenas íons e neurotransmissores pequenos podem atravessar a bainha de CSGs, mas também macromoléculas (HU, 2002). Outros estudos mostraram resultados semelhantes que concluíram que CSGs em gânglios sensitivos não formam uma barreira absoluta. Esse arranjo estrutural entre o corpo neuronal e células satélites gliais sugere que existe uma comunicação e que esta é um fator determinante para atividade somática (HUANG et al, 2013).

Estudos recentes que avaliam as funções neuronais sugerem que o neurônio não é o único tipo de célula que contribui para sinalização neuronal, as células não neuronais, incluindo os astrócitos, oligodendrócitos e células satélites também desempenham papéis importantes na atividade neuronal por meio da interação neurônio-glia. Pesquisas em gânglios sensoriais vêm buscando entender o papel das células gliais em diversos modelos de dor em animais. (CHIANG et al., 2011; HANANAI, 2005; TSUDA et al, 2005; WATKING et al, 2007).

No SNC já foi visto que as células gliais desempenham papel crucial na dor crônica (JI et al., 2006; CHIANG et al., 2011). Embora exista menor número de trabalhos dedicados a células gliais em gânglios sensoriais, recentemente as pesquisas sobre essas células vem aumentando e ganharam destaque no estudo da dor. Os primeiros indícios da participação da células gliais do GRD foram mostrados em modelo de dor crônica. O estudo observou aumento de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), marcador de atividade da glia, após uma lesão do nervo (WOODHAM et al., 1989). Em um estudo de Hanani et al. 2002, axotomia do nervo ciático

causou aumento de acoplamento entre as CSGs ao redor de diferentes neurônios no GRD. Essa mudança parece estar correlacionada com o aumento de junções comunicantes entre as células satélites gliais. Em análise de microscopia eletrônica do GRD de animais que sofreram lesão no nervo, observaram o crescimento de processos entre os neurônios vizinhos e neles estavam presentes as junções comunicantes (HANANAI, 2012). No gânglio trigeminal, utilizando um modelo de dor orofacial que envolve axotomia do nervo infraorbital, foi observado também o aumento do acoplamento entre as células satélites (CHERKAS et al., 2004). Em um modelo de dor inflamatória induzido por injeção de CFA na pata de camundongos, verificou o aumento no acoplamento das células satélites gliais visualizados em microscopia eletrônica e hipersensibilidade mecânica. Utilizando um inibidor de junções comunicantes foi verificada redução da hipersensibilidade, indicando a participação das células satélites gliais e junções comunicantes no processamento da dor (DUBLIN e HANANI, 2007). Ainda, em outro trabalho em que utilizou o modelo de dor sistêmica por LPS também foi mostrado maior acoplamento entre as CSGs no GRD, que por sua vez, contribuiu para a hipersensibilidade do neurônio (BLUM et al., 2014). Assim, tendo visto o que foi exposto acima, as células satélites gliais e as junções comunicantes se mostram importantes em processos envolvidos com sensibilização neuronal, ou seja, dores inflamatórias, neuropáticas e crônicas. Mas ainda não há estudos que relatam a participação dessas células e junções na reposta da dor rápida e fisiológica. Por isso, o trabalho aqui apresentado tem a intenção de compreender a influência das células satélites na nocicepção, assunto que merece destaque devido à grande relevância dessa células no processamento e modulação da dor.

1.6. Junções comunicantes (“gap junctions”)

As junções comunicantes (“gap junctions”) são agregados de canais intercelulares que facilitam a continuidade citoplasmática. Esse canal permite o contato entre duas células promovendo a troca seletiva de moléculas como: íons, ATP, glutamato e AMP cíclico (SOHL et al., 2005; GOODENOUGH e PAUL 2009). Os canais compreende-se no acoplamento em série de dois hemicanais, cada um proveniente de uma célula. Cada hemicanal consiste em um anel formado por seis monômeros de conexina (ORELLANA, 2015). As conexinas (Cx) são membros de uma família de proteínas altamente conservadas codificados por 21 genes em seres humanos e 20 genes em ratos (ABASCAL e ZARDOYA, 2012). Diversas pesquisas, utilizando microscopia eletrônica, imunohistoquímica, eletrofisiologia e marcadores intracelulares mostraram a expressão de junções comunicantes em diversas regiões do sistema SNC. Essas regiões incluem o hipotálamo, hipocampo, bulbo olfatório, retina, córtex cerebral e cerebelo

(ROZENTAL et al., 2000). No SNC, as células da glia são a maior população de células acopladas através dessas junções, sendo o nível de expressão de Cx maior em células gliais comparada com neurônios e sua expressão persiste na fase adulta. Entretanto, existem diferenças qualitativas e quantitativas entre as classes de células gliais, cada tipo irá expressar um conjunto específicos de conexinas e a força de acoplamento assim como o nível de expressão também será diferente dependendo do tipo de célula glial (ROUACH, 2002). Até os dias de hoje oito Cxs diferentes foram detectadas nas populações de células neuronais, estudada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Um estudo recente confirmou que a expressão de Cx36 está restrita aos neurônios, enquanto que Cx32 e Cx43 foram encontradas em oligodendrócitos e astrócitos, respectivamente (RASH et al., 2000). No sistema nervo periférico foi mostrada a expressão de Cx32 nas membranas da bainha de mielina (SATAKE, 1997) e, no gânglio da raiz dorsal identificaram a Cx43 em células satélites gliais de ratos (HANANI, 2005).

As junções comunicantes são um caminho pelo qual as CSGs podem se comunicar umas com as outras. Em microscopia eletrônica, essas junções foram encontradas entre as CSGs adjacentes ao redor de um único corpo neuronal em GRD de animais controle. Não foi observada a existência dessas junções entre as bainhas das CSGs com neurônios e entre o corpo neuronal (HUANG et al., 2006; PANNESE, 2010). Os estudos indicam que o aumento das junções comunicantes contribuem para a dor crônica em uma variedade de modelos de dor. Estudos *in vitro* demonstraram que o bloqueio dessas junções reduzem a atividade elétrica espontânea e a hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais (HUANG et al., 2010). Portanto, essas estruturas são importantes para o processamento da transmissão da dor pois alteram a atividade dos nociceptores.

1.7. ATP e receptores purinérgicos

A molécula de ATP é bem conhecida como uma fonte de energia encontrada em todas as células vivas. Entretanto, essa molécula também desempenha um papel importante nos espaços extracelulares, atuando como uma molécula sinalizadora e, dessa forma, controlam a fisiologia celular, conectividade e dinâmica, por meio da ativação de receptores purinérgicos (KAHKH et al., 2009; BURNSTOCK, 2007). Recentemente, o ATP extracelular emergiu como um elemento chave para uma variedade de doenças, incluindo doenças inflamatórias crônicas (IDZKO et al., 2014), neurológicas (SPERLAGH, 2014; TSUDA et al., 2013) e transtornos psiquiátricos (ABRACCHIO et al., 2009; CAO et al., 2013). Dessa forma, a caracterização da natureza dos fenômenos fisiológicos mediados pelo ATP são importantes para melhor compreensão das doenças assim como a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

O papel dessa molécula como um neurotransmissor na sinalização purinérgica já encontra-se bastante elucidada. Nos terminais pré-sinápticos ele é transportado para dentro das vesículas sinápticas, as quais posteriormente são liberadas por exocitose (PANKRATOV, 2006; BODIN, 2001; ZHANG et al., 2007). Contudo, o mecanismo envolvido na liberação de ATP em outros locais, como no GRD, ainda não foi estabelecido. Alguns estudos relatam que o ATP pode ser liberado por exocitose pelo corpo neuronal ou através de hemicanais como as junções comunicantes (ZHANG et al., 2007; BAO et al., 2004).

No SNP a molécula de ATP parece ser importante na transmissão da dor. Foi visto que a injeção intraplantar de ATP promove a excitação dos neurônios sensoriais primários, comportamento espontâneo de dor, hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (BURNSTOCK, 2006; HAMILTON et al., 1999; HILLIGES et al., 2002). Em culturas do GRD foram observadas grandes quantidades de ATP nas margens do soma contidas dentro de vesículas lisossomais, as quais foram encontradas, principalmente, em neurônios de pequeno e médio tamanho, ou seja, aqueles neurônios responsáveis pela transmissão dos estímulos nocivos (JUNG et al., 2013; NISHIDA et al., 2014). Trabalhos recentes sugerem que o principal mediador da comunicação entre neurônio e glia nos gânglios sensoriais é o ATP, que atua sobre os receptores purinérgicos tanto no neurônio quanto na glia (CHEN et al., 2008; CHERKAS et al., 2004; TAKEDA et al., 2009).

Os receptores purinérgicos são classificados em ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y) com base no seu mecanismo de ação e farmacologia (LUSTIG et al., 1993; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998). Esses receptores são abundantes nos tecidos de mamíferos podendo ser encontrados em todos os tipos de células incluindo as de origem neuronal. Receptores P2X são canais operados por ligantes catiônicos clássicos que após a ligação de ATP forma um poro permeável a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Os receptores P2X são trímeros formado por subunidades individuais codificadas por sete distintos genes, designados por P2X1 a P2X7 de acordo com a ordem histórica de clonagem (ROBERTS et al., 2006; NORTH et al., 2002). Os receptores metabotrópicos possuem 8 subtipos P2Y1,2,4,6,11,12,13 e 14 e encontram-se acoplados a proteínas Gi/G0 ou Gq/G11 (ABBRACCHIO et al., 2006).

Ambos os tipos de receptores purinérgicos são encontrados nos gânglios sensoriais, no soma, axônios, terminais dos neurônios do GRD, CSGs vizinhas e células de Schwann (GRUBB e EVANS, 1999; HANANI, 2005; KOBAYASHI et al., 2005a). O subtipo P2X7 parece ser importante na dor e hiperalgesia e é encontrado em células do sistema imune e células da glia (SPERLAGH et al., 2014). Ele apresenta características peculiares, que o diferem dos

demais receptores P2X. Este receptor é ativado por concentrações altas de ATP e após um estímulo sustentado induz a formação de um poro na membrana celular que é permeável a solutos hidrofílicos de peso molecular até 900 Da (SUPRENANT et al., 1996). Se esta estimulação é prolongada, entre 15 e 30 minutos, a maioria das células entra em apoptose (DI VIRGILIO et al., 1998). A ativação de receptores do tipo P2X7 por ATP em células da glia pode induzir a liberação de citocinas. Em especial, estudos recentes indicam que a ativação de receptores P2X7 por ATP é um passo essencial para a maturação e liberação de IL-1 β (SOLLE et al., 2001; FERRARI et al., 1997, revisado por FERRARI et al., 2006). O bloqueio do receptor P2X7 com um antagonista ou a redução da sua expressão utilizando RNA de interferência em roedores normais, resulta em uma expressão neuronal aumentada de P2X3, sugerindo que a ativação dos receptores P2X7 exerce uma inibição tônica sobre o P2X3. Por outro lado, o ATP liberado pelos neurônios ativa o receptor P2X7 das células satélites levando à liberação de citocinas como TNF- α , que por sua vez, aumenta a resposta mediada pelo receptor P2X3 do neurônio. (ZHANG et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2005a; CHEN et al., 2008; KUSHNIR et al., 2011). Assim, pode-se dizer que P2X7 exerce influência tanto excitatória quanto inibitória no corpo do neurônio sensorial. Em um estudo utilizando camundongos knockout para P2X7 foi observado que esses animais não apresentaram hiperalgesia mecânica ou térmica após indução de neuropatia por ligação parcial do nervo ciático e também não apresentavam hiperalgesia após indução de inflamação pela administração intraplantar de Adjuvante Completo de Freud (CFA). Os animais deficientes do receptor purinérgico também apresentavam níveis mais baixos de IL-1 β quando comparados aos animais controle (CHESSELL et al., 2005).

Como pode-se notar, o receptor P2X7 exerce papel importante na comunicação neurônio-glia, verificado em vários estudos de dores inflamatórias e crônicas. Logo é de grande relevância compreender os mecanismos subjacentes à ativação do P2X7 nas células satélites gliais, para esclarecer o papel dessas células na transmissão do estímulo doloroso. O trabalho aqui apresentado tem como foco o estudo da comunicação neurônio-glia no GRD na nocicepção, assunto novo nas pesquisas científicas, visto que, a maioria dos estudos mostram o papel dos receptores P2X7 apenas em modelos de sensibilização neuronal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel dos receptores P2X7 presentes nas células satélites gliais e a das junções comunicantes na nocicepção, utilizando modelos de dor aguda. Deste modo, pretende-se avaliar o papel da comunicação neurônio-glia no GRD na transmissão do estímulo doloroso.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o envolvimento do ATP e de receptores P2X7 na comunicação entre neurônios nociceptivos e células satélites gliais em culturas de GRD.
- b) Avaliar o papel dos receptores P2X7 presentes em células satélites do GRD na nocicepção induzida por agentes que ativam diretamente os neurônios nociceptivos (capsaicina, mentol e formalina).
- c) Avaliar o papel do ATP e dos receptores P2X7 presentes em células satélites na hiperalgesia mecânica induzida por capsaicina e mentol.
- d) Avaliar a participação das junções comunicantes na nocicepção induzida por agentes que ativam diretamente os neurônios nociceptivos (capsaicina e formalina).
- e) Avaliar se a ativação dos receptores P2X7 gliais influencia na resposta neuronal à capsaicina *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 200-250 g. Os animais foram mantidos no Depositário de Animais ARFIS-UFU em gabinetes próprios com temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas e acesso à água e comida *ad libitum* até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983). Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Protocolo 098/16 (Anexo 1).

3.2. Drogas

- A740003 (TOCRIS) - antagonistas de receptores P2X7.
- BzATP (TOCRIS) – agonista de receptores P2X7.
- Capsaicina (Sigma).
- Carbenoxolona (Sigma) – inibidor de junções comunicantes.
- Mentol (Sigma).
- Fluo-3AM (Invitrogen).

3.3. Delineamento experimental

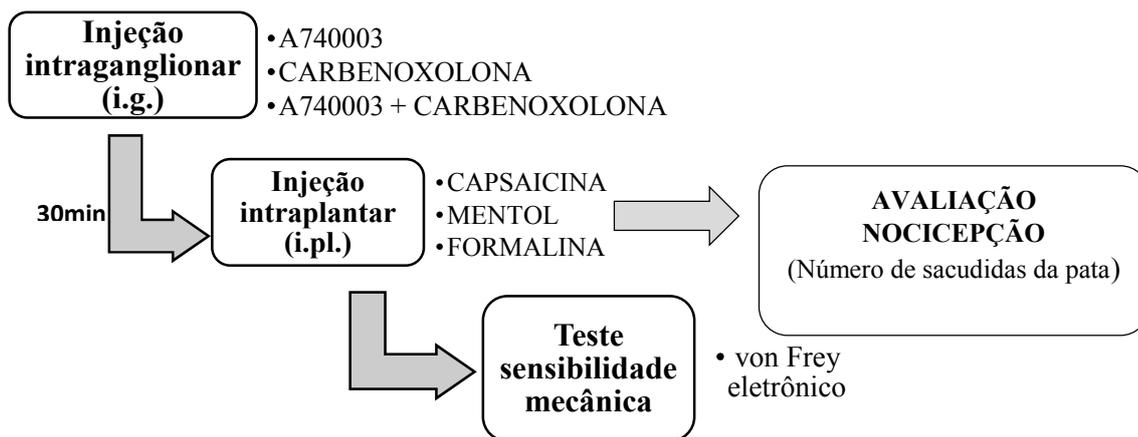


Figura 1: Esquema geral dos experimentos *in vivo*. O experimento iniciou com a administração das drogas por via intraganglionar (i.g.): A740003 (antagonista de receptores P2X7), Carbenoxolona (inibidores de junções comunicantes) ou ambas as drogas. Após 30min foi feita a administração de agentes indutores de dor por via intraplantar (i.pl): capsaicina, mentol ou formalina. Posteriormente foi feita a avaliação da nocicepção em cada teste experimental e avaliação da hipersensibilidade mecânica pelo método de von Frey eletrônico.

3.4. Técnicas

3.4.1. Injeção intraganglionar

Para a inoculação de drogas no gânglio da raiz dorsal (GRD) foi utilizado o método de injeção direta (FERRARI et al., 2007). Esse método permite verificar os efeitos das drogas apenas sobre neurônios nociceptivos primários e células satélites sem a possibilidade de ação das mesmas em neurônios medulares (secundários) ou em outras células do tecido periférico. Como previamente descrito por FERRARI et al., 2007, o GRD-L5 possui a maioria dos corpos celulares dos neurônios nociceptivos primários que inervam a porção central da pata de ratos, local onde foram administrados os agentes dolorosos: capsaicina, mentol e formalina.

Devido ao pequeno tamanho do gânglio, volumes acima de 5 μ L são passíveis de extravasar e permear estruturas adjacentes ao gânglio. Assim, para que volumes pequenos pudessem ser administrados, foi confeccionada uma escala utilizada para controle fino da quantidade de solução injetada. Esta escala foi adaptada a um cateter de 30 cm PE-10 (Intramedic Clay Adams, diâmetro interno de 0.28 mm e externo de 0.61 mm), calibrado de maneira que 25 mm de deslocamento da solução dentro do cateter corresponderiam ao depósito de 1 μ l de solução. O cateter foi conectado a uma agulha gengival (Dentbras, 30G curta), e, em sua outra extremidade, a uma seringa de vidro (Figura 2B).

Os animais foram anestesiados por via inalatória com halotano, tricotomizados na região dorsal na altura das cristas ilíacas e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo que sua região lombar fique hiperfletida. 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 (agulha hipodérmica 25x7) com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. A agulha gengival foi inserida, através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral seja atingido. Com movimentos finos a agulha atinge o GRD e neste momento ocorre um reflexo característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no gânglio da raiz dorsal do quinto nervo espinal lombar, o qual está localizado sob o processo transversal da quinta vértebra lombar (Figura 2A). Após encontrar o local desejado foi injetado no grupo tratado: 1nM A740003 (antagonista do receptor P2X7) ou 1nM Carboxolona (bloqueador das junções comunicantes) ou 1nM A740003+ Carboxolona, e veículos no grupo controle (10% DMSO + salina ou salina). Após a injeção intraganglionar, os animais foram recolocados na caixa para se recuperarem da anestesia. O

procedimento total de administração intraganglionar durou de 10 a 15 min até a recuperação do estado consciente dos ratos.

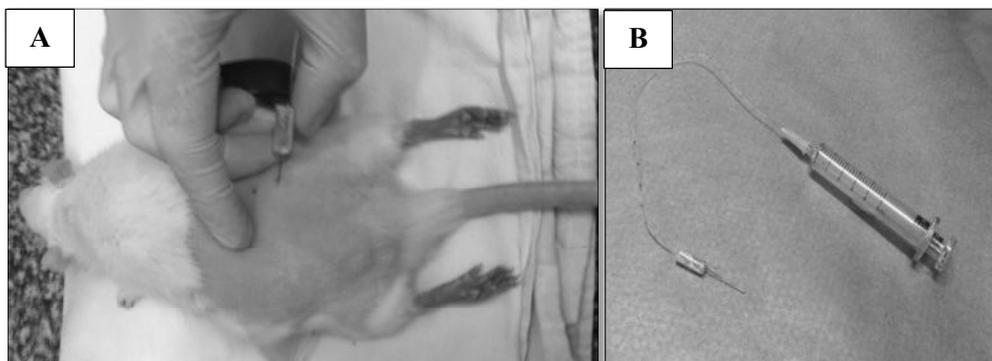


Figura 2: Injeção intraganglionar (i.g.). Em **A**: rato anestesiado recebendo a droga via i.g. Em **B**: material utilizado para a realização da administração da solução no gânglio da raiz dorsal – L5 (agulha gengival-cateter-seringa de vidro). Fotos de autoria própria.

3.4.2. Injeção intraplantar da capsaicina

Esse modelo foi proposto por Sakurada et al. em 1992 para o estudo de compostos que atuam sobre a dor neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos por ativar o canal TRPV1 e causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. Nesse teste foi realizada uma injeção intraplantar subcutânea de 50 μ l contendo 10 μ g de capsaicina na pata traseira direita dos animais tratados e controles. A injeção intraplantar da capsaicina foi feita após 30 minutos da injeção intraganglionar de 1nM A740003, 1nM Carbenoxolona e 1nM A740003 + Carbenoxolona no grupo tratado e veículo no grupo controle. Logo após a administração intraplantar da capsaicina, os animais foram observados por 5 minutos para avaliação da nocicepção. Durante esse tempo foi registrado o número de vezes que o animal sacodiou e lambeu a pata afetada. Para padronização, cada lambida foi considerada como uma sacudida.

3.4.3. Injeção intraplantar do mentol

Após 30 minutos da injeção intraganglionar de 1nM A740003 (grupo tratado) e veículo (10% DMSO + SALIN) no grupo controle, foi injetado por via intraplantar 25 μ l de uma solução contendo 50 mg de mentol na pata traseira direita dos animais (GENTRY et al., 2010). O mentol atua nos neurônios por meio da ativação do TRPM8.

Nessa concentração o mentol atua como estímulo nocivo aos nociceptores (dor provocada pelo frio). Após a injeção intraplantar do mentol, os animais foram observados durante 10 minutos para avaliação da nocicepção. Durante esse período foi registrado o número de sacudidas e lambidas de cada animal, mantendo o mesmo padrão de avaliação.

3.4.4. Teste da formalina

O teste da formalina realizado neste estudo consistiu na injeção intraplantar de uma solução de 50 µl contendo 1% de formalina. Esta injeção foi feita também 30 minutos após injeção intraganglionar de 1nM A740003 ou 1nM carbenoxolona no grupo tratado e no grupo controle (10% DMSO+ salina ou salina).

A formalina desencadeia comportamentos relacionados com a dor ao ativar TRPA1 em nociceptores aferentes primários (MCNAMARA et al., 2007). A dor induzida por formalina possui duas fases distintas. A primeira fase é neurogênica, começando logo após a injeção de formalina, que dura aproximadamente 10 minutos. A segunda fase é inflamatória, normalmente começando após 15 a 20 minutos e com duração de até 60 minutos (DUBUISSON e DENNIS 1977). Os animais tratados e controles foram observados por um tempo total de 60 minutos. O tempo de registro foi separado em blocos de 5 minutos e um escore de dor foi determinado para cada bloco determinando-se o número de vezes que o animal sacodiou ou lambeu a pata, seguindo o mesmo padrão de avaliação do teste da capsaicina e mentol.

3.4.5. Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico

A avaliação da hiperalgesia mecânica na pata de ratos foi realizada pelo método de pressão crescente previamente descrita por MÖLLER e colaboradores (1998). Este método utiliza o anestesiômetro eletrônico (von Frey eletrônico) que é composto por um transdutor de pressão ligado a um cabo e conectado a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (Figura 3A). Ao transdutor é adaptada a uma ponteira Universal Tips 10 µL (T-300, Axygen) que é aplicada em ângulo reto na região central da pata traseira afetada do animal, com pressão gradualmente crescente. O estímulo é interrompido após a observação característica de retirada da pata. Em nossos experimentos foram realizadas medidas nos grupos tratados e grupos controles, nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção da capsaicina e 15, 30, 60 minutos após a injeção de mentol. Para cada animal, em cada tempo, foi feita três medições, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão (D de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação (após a

administração do estímulo). Durante os experimentos os animais são mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 100 por 17 cm de altura, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5 mm² constituída de arame não maleável de 1mm de diâmetro (Figura 3B). Antes do início dos experimentos os animais permanecem nessas caixas por quinze minutos para a adaptação do ambiente.

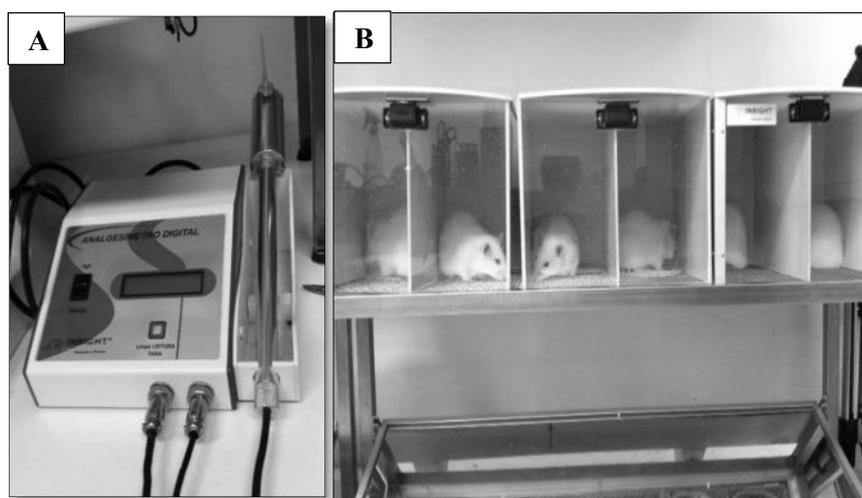


Figura 3: Método von Frey eletrônico. Em **A**: transdutor de pressão que mede a força em gramas. Em **B**: caixas acrílicas onde os ratos são colocados para a estimulação mecânica. Fotos de autoria própria.

3.4.6. Cultura primária do gânglio da raiz dorsal

As culturas foram realizadas conforme o protocolo descrito por Linhart et al., 2003. Os ratos foram anestesiados com Halotano, eutanaziados por decaptação, e em seguida, foram retirados os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica (16 a 20 gânglios por animal). Posteriormente, os gânglios foram colocados em solução de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES e, em seguida, dissociadas por incubação a 37 °C durante 75 minutos em Hank's contendo 0,28 U/ml de colagenase (tipo 2, Sigma) e depois por 12 minutos em Hank's contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Após essas etapas, os gânglios foram lavados e dissociados mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de streptomomicina. As células foram então cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ e 37 °C.

As culturas foram utilizadas após 48 horas e incubados com o indicador fluorescente intracelular de Ca^{2+} Fluo-3AM (5 μM) durante 40 minutos no escuro. Em seguida, foram levadas para microscópio confocal (Zeiss) e separadas em placas controles e tratadas. Nas placas controle administraram-se Hank's e depois capsaicina, e nas placas tratadas administraram A740003 (10 nM) ou BzATP (500 μM) 5 minutos antes da capsaicina (1 μM). Entre as administrações não foi feita a lavagem das placas. Uma sequência de fotos logo após cada administração foi feita e, posteriormente as imagens foram analisadas através do software ImageJ (NIH) onde quantificou-se a fluorescência emitida do neurônio e glia em cada momento. A variação da fluorescência corresponde as alterações no níveis de Ca^{2+} .

3.5. Análise estatística

Nos ensaios comportamentais, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). A análise dos resultados foi feita pelo Teste t, quando duas médias foram comparadas ou por análise de variância (ANOVA uma via ou duas), quando mais de duas médias foram comparadas. Quando o nível de significância indicou diferença estatística entre as médias testadas utilizou-se o Teste Bonferroni para comparar os grupos. O nível de significância foi de $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram feitas pelo software GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Papel dos receptores P2X7 glias e liberação de ATP por neurônios nociceptivos ativados por capsaicina.

O efeito da capsaicina sobre os níveis intracelulares de cálcio foi avaliado em culturas primárias de GRD através do uso da sonda fluorescente Fluo3-AM, conforme descrito nos métodos. A administração da capsaicina (1 μM) nas placas controle gerou aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular nos neurônios, como já era esperado, visto que, essas células apresentam o receptor da capsaicina (TRPV1). Porém, após alguns segundos também foi observada uma resposta nas células satélites, as quais, não possuem receptor para capsaicina (Figura 4A). Administração prévia do antagonista seletivo para receptores P2X7, A740003 (1 nM), resultou na diminuição da resposta das células satélites à capsaicina enquanto a resposta dos neurônios à capsaicina permaneceu inalterada (Figura 4B).

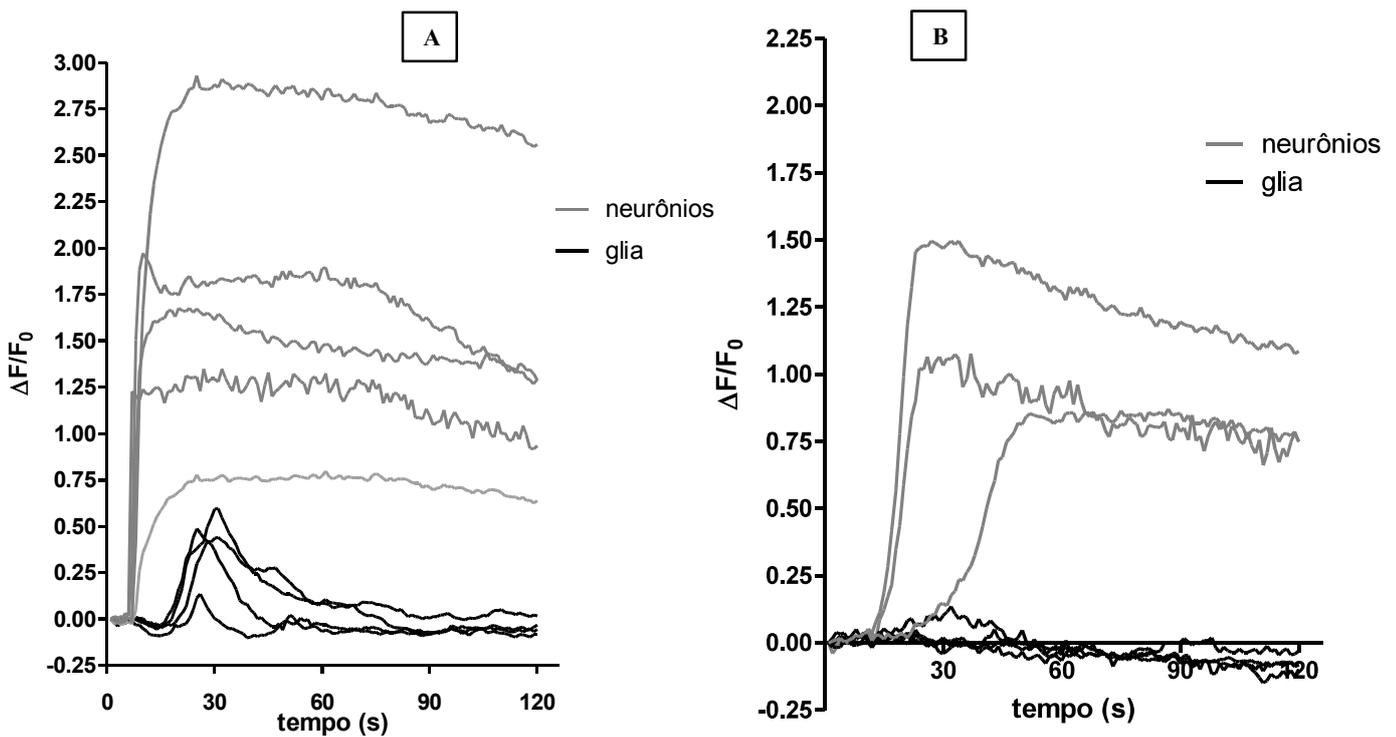


Figura 4: Avaliação do papel dos receptores P2X7 e liberação de ATP por neurônios nociceptivos ativados por capsaicina *in vitro*. Em A: Efeito da capsaicina (1 μM) sobre o cálcio intracelular observado através de fluorescência em neurônios (curvas cinzas) e células satélites (curvas pretas). Em B: Efeito do tratamento com o A740003 (10 nM) administrado 5 minutos antes da administração de capsaicina (1 μM) sobre o aumento de cálcio observado em neurônios e em células satélites. Resultados representativos de 3 diferentes experimentos realizados através de microscopia confocal em culturas de GRD de ratos carregadas com o indicador fluorescente Fluo3-AM (5 μM).

4.2. Participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por capsaicina.

No experimento *in vivo* para a avaliação do papel dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por capsaicina (10 µg), os animais previamente tratados o antagonista desse receptor (1 nM A740003 i.g.), apresentaram uma diminuição da nocicepção quando comparado ao grupo controle. Os animais controles apresentaram maior número de sacudidas do que os animais tratados (Figura 5A). Para a avaliação da hiperalgesia mecânica desses animais foi realizado o teste de von Frey, nos tempos de 15, 30, 60, 90 minutos após a injeção intraplantar de capsaicina. O resultado mostrou diferença significativa na sensibilidade mecânica no tempo 15 minutos (Figura 5B). Isto é, o grupo previamente tratado com o antagonista de receptores P2X7 resistiu a um estímulo mecânico de maior pressão quando comparado com o grupo controle. Nos tempos 30, 60 e 90 minutos não foi observada diferença estatística entre os grupos.

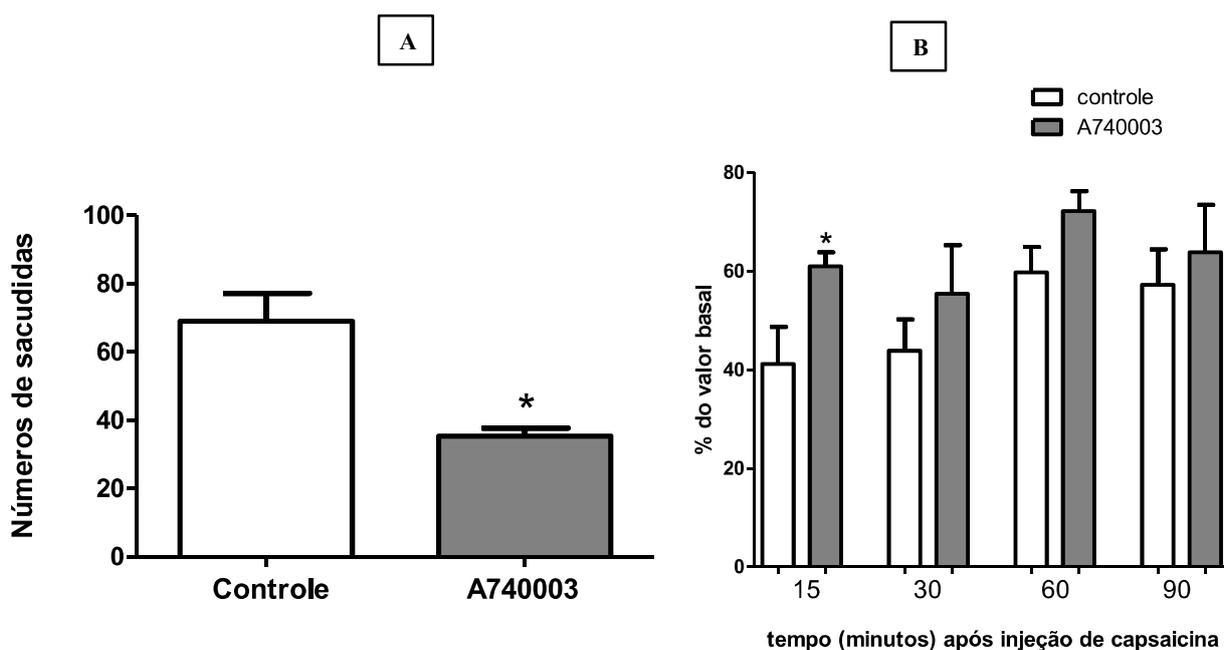


Figura 5: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nocicepção e na hiperalgesia mecânica, induzida por capsaicina. A- Número de sacudidas após a injeção intraplantar da capsaicina (10 µg) de animais controles (salina i.g.) e animais tratados (A740003 1nM i.g.). B- Teste von Frey eletrônico 15, 30, 60, 90 minutos após a injeção da capsaicina. Dados mostrados como média e EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,005$ diferente do grupo controle (teste t).

4.3. Participação das junções comunicantes na nocicepção induzida por capsaicina.

A participação das junções comunicantes na dor aguda foi avaliada injetando-se o inibidor carbenoxolona (1 nM, 5 μ l) por via intraganglionar (L5) 30 minutos antes da injeção intraplantar de 10 μ g de capsaicina. (Figura 6A). O bloqueio das junções comunicantes no gânglio da raiz dorsal reduziu significativamente a nocicepção induzida por capsaicina. Após a avaliação da nocicepção, a sensibilidade mecânica foi avaliada através do teste do von Frey eletrônico (Figura 6B). Neste experimento, a injeção de capsaicina não induziu hipernocicepção mecânica não sendo, portanto, possível observar diferença com o tratamento com carbenoxolona.

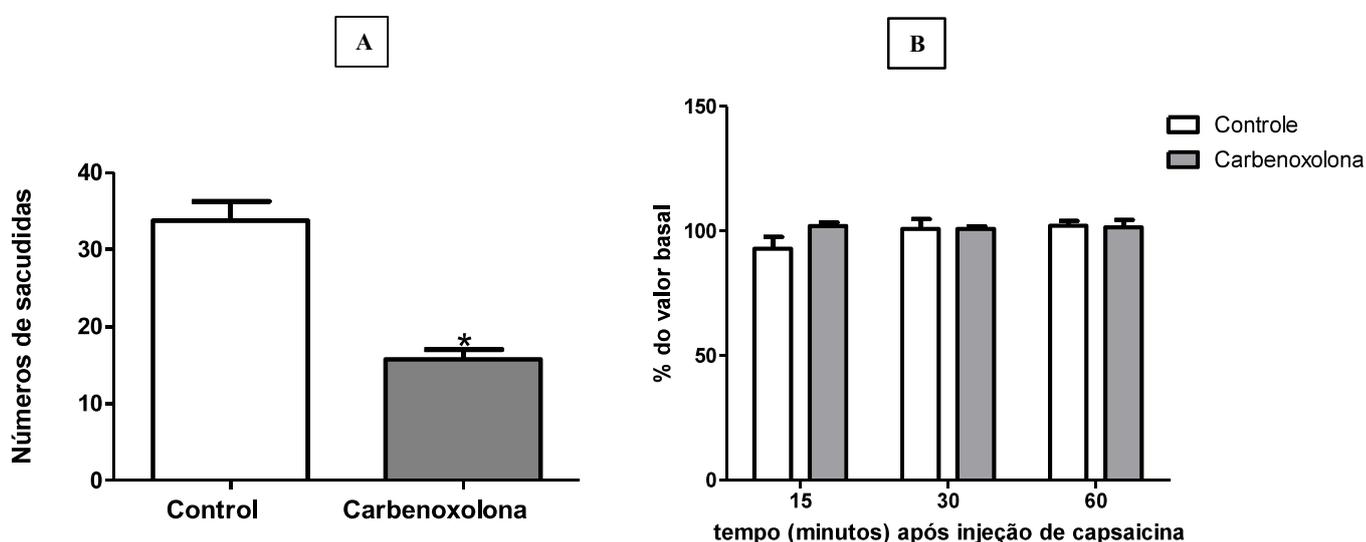


Figura 6: Avaliação da participação das junções comunicantes na nocicepção e na hiperalgesia mecânica, induzidas por capsaicina. A- Número de sacudidas após a injeção intraplantar da capsaicina (10 μ g) de animais controles (salina i.g.) e animais tratados (Carbenoxolona 1nM i.g). B- Teste von Frey eletrônico 15, 30, 60 minutos após a injeção da capsaicina. Dados mostrados como média e EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,005$ diferente do grupo controle (teste t).

4.4. Avaliação do efeito conjunto do bloqueio de junções comunicantes e receptores P2X7 na nocicepção induzida por capsaicina.

Nesse experimento foi administrado o antagonista de receptores P2X7 juntamente com inibidor das junções comunicantes (1 nM A740003 + 1 nM carbenoxolona) por via

intraganglionar. Como pode-se observar na figura 7, os animais tratados com ambas as drogas obtiveram uma redução da nocicepção à capsaicina quando comparado com o controle, porém não há um somatório do efeito das drogas. A aplicação conjunta do inibidor de junções comunicantes e antagonista de receptores P2X7 no gânglio não teve efeito maior do que aplicação das drogas separadamente, como é mostrado na figura 5A e 6A.

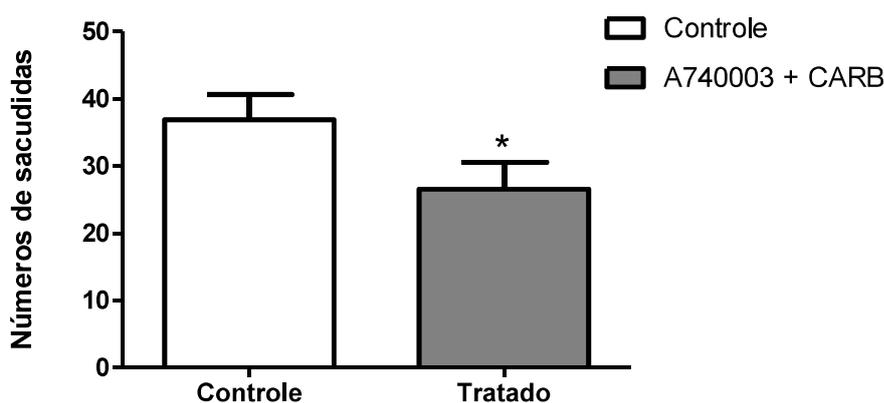


Figura 7: Avaliação do efeito conjunto de A740003 + carbenoxolona na nocicepção induzida por capsaicina. O gráfico representa o número de sacudidas após a injeção intraplantar da capsaicina (10 µg) de animais controles (salina i.g.) e animais tratados (A740003 + Carbenoxolona 1nM i.g). Dados mostrados como média e EPM de 11 animais por grupo. * $p < 0,005$ diferente do grupo controle (teste t).

4.5. Participação dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por mentol.

No experimento *in vivo* para a avaliação do papel dos receptores P2X7 na nocicepção induzida por mentol (25 mg), os animais foram previamente tratados o antagonista desse receptor, A740003 (1 nM, 5 µl, i.g.). Os animais tratados com A740003 apresentaram menor número de sacudidas da pata do que os animais controles, (Figura 8^a). a sensibilidade mecânica foi avaliada através do teste de von Frey eletrônico 15, 30 e 60 minutos após a administração de mentol (Figura 8B). No entanto, o mentol na dose utilizada não alterou a sensibilidade mecânica de forma que não foi possível testar o efeito do A740003 sobre este evento.

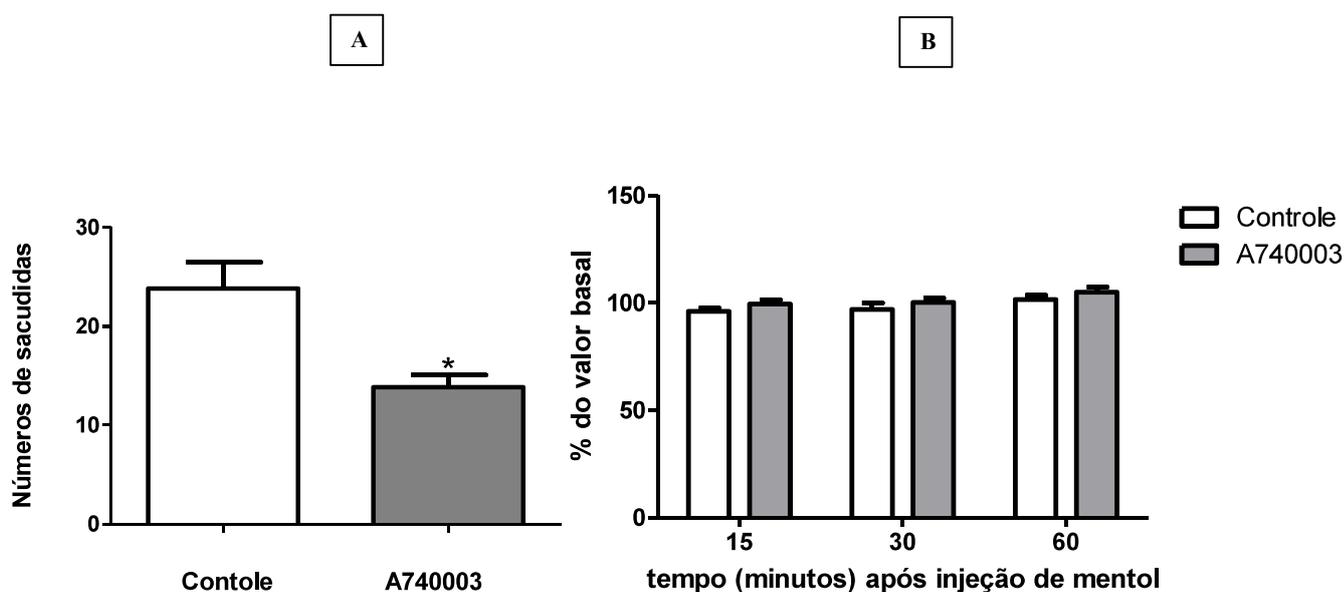


Figura 8: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nociceção induzida por mentol. A- Número de sacudidas após a injeção intraplantar de mentol (25 mg em 25 μ l) em animais controles (salina i.g.) e animais tratados (A740003 1nM i.g). B- Teste von Frey eletrônico 15, 30, 60 minutos após a injeção intraplantar de mentol. Dados mostrados como média e EPM de 6 animais por grupo. * $p < 0,005$ diferente do grupo controle (teste t).

4.6. Participação dos receptores P2X7 na nociceção induzida por formalina

Nesse experimento os animais foram previamente tratados com uma injeção intraganglionar de 1nM de A740003 no grupo tratado e veículo no grupo controle assim como nos testes anteriores. Após 30 minutos os animais tratados e controles receberam a injeção intraplantar de 1% de formalina e, logo em seguida, foram observados durante 60 minutos. Foi registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata afetada em blocos de 5 minutos (Figura 9). Os resultados mostraram uma redução na nociceção induzida por formalina do grupo tratado apenas na segunda fase, nos tempos 15, 20, 25 minutos. Na primeira fase que corresponde aos primeiros 10 minutos não houve diferença estatística entre os grupos.

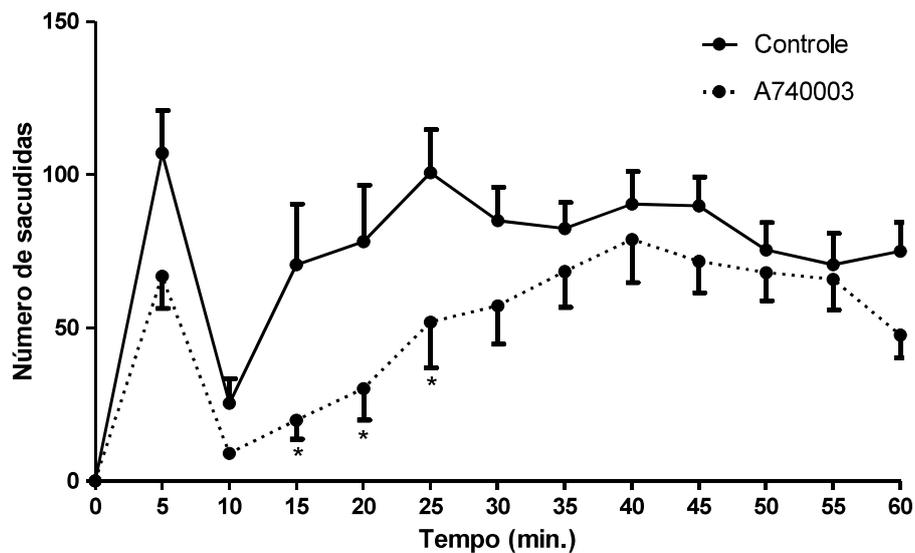


Figura 9: Avaliação da participação dos receptores P2X7 na nociceção induzida por formalina. O gráfico representa o número de sacudidas após a injeção intraplantar de formalina a 1% em animais controles (10% DMSO + salina i.g.) e animais tratados (1nM A740003 i.g.). Dados mostrados como média e EPM n= 6. * p<0,05 diferente do grupo controle (ANOVA duas vias e teste Bonferroni).

4.7. Participações das junções comunicantes na nociceção induzida por formalina

No teste da formalina, para avaliação das junções comunicantes, os animais previamente tratados com o inibidor dessas junções (1 nM Carbenoxolona i.g.) obtiverem também uma redução na nociceção induzida por formalina a 1% apenas na segunda fase, porém agora, nos tempos 40 e 50 minutos (Figura 10).

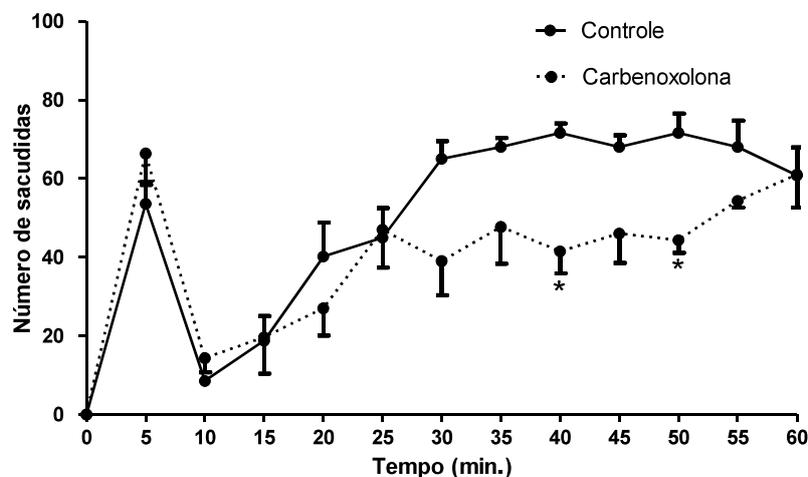


Figura 10: Avaliação da participações das junções comunicantes na nociceção induzida por formalina. O gráfico representa o número de sacudidas após a injeção intraplantar de formalina a 1% em animais controles

(salina i.g.) e animais tratados (1 nM Carbenoxolona i.g). Dados mostrados como média e EPM n= 6. * p<0,05 diferente do grupo controle (ANOVA duas vias seguida por teste Bonferroni)

4.8. Cultura do GRD: avaliação do efeito do BzATP sobre a resposta dos neurônios e células satélites estimulados com capsaicina.

O intuito deste teste foi avaliar se o neurônios respondiam diferentemente a capsaicina na presença do agonista de receptor P2X7 (BzATP). As placas foram separadas em controles onde administrou-se Hank's e posteriormente capsaicina 1 μ M, e placas tratadas onde administrou-se BzATP 500 μ M e posteriormente a capsaicina 1 μ M. Foi avaliada as alterações dos níveis de Ca²⁺ tanto dos neurônios quanto de células satélites em cada administração através do uso da sonda fluorescente Fluo3-AM. Como pode-se observar na figura 11, a administração de Hank's não altera os níveis de Ca²⁺ em nenhuma das células, como já era esperado, visto que, refere-se ao controle. A administração de BzATP induz aumento significativo dos níveis de Ca²⁺ nas células satélites e em neurônios. A administração de capsaicina nas placas controles leva a aumento dos níveis de cálcio tanto neurônios e células satélites, como também já era esperado. E a administração da capsaicina após o tratamento com o agonista BzATP resultou em uma diminuição na resposta neuronal e nenhuma resposta nas células satélites (Figura 11).

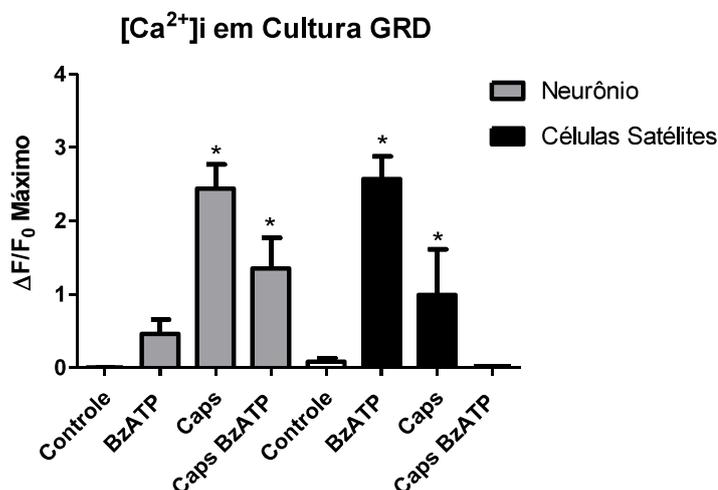


Figura 11: Avaliação do efeito do BzATP sobre a resposta dos neurônios e células satélites estimulados com capsaicina. O gráfico mostra as alterações dos níveis de Ca²⁺ observado através de fluorescência dos neurônios e células satélites logo após cada administração. A estimulação da capsaicina (1 μ M) em placas já tratadas com BzATP (500 μ M) resultou uma redução da resposta neuronal e nenhuma resposta das células satélites. Teste realizado através de microscopia confocal em cultura de GRD de ratos carregadas com o indicador fluorescente Fluo3-AM (5 μ M).

5. DISCUSSÃO

Recentemente, vários estudos tem evidenciado a participação das células gliais do sistema nervoso periférico no processamento da dor. As células satélites do gânglio da raiz dorsal vem se destacando por apresentar um papel modulador na resposta dolorosa atuando em comunicação com os nociceptores. A molécula de ATP parece ser um importante mediador da comunicação entre neurônios e células satélites gliais (CHEN et al., 2008; CHERKARS et al., 2004). Em um estudo de Hang et al. (2006) foi detectada a liberação de ATP pelos corpos celulares dos neurônios do GRD, em resposta a um estímulo elétrico. O ATP liberado, por sua vez, atuou nas células satélites através da ativação de receptores purinérgicos do subtipo P2X7. Mecanismo semelhante a esse foi encontrado em nossos resultados. Na cultura do GRD, a administração da capsaicina levou à ativação dos neurônios através dos receptores TRPV1, resultando no aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Em seguida, também foi observada ativação das células satélites. Visto que as células satélites não apresentam receptores para capsaicina, pudemos inferir que algum mediador estava sendo liberado pelos neurônios para então atuar nas células satélites. Em vista do trabalho de Huang et al. (2006), decidimos investigar se estaria ocorrendo liberação de ATP pelos neurônios e ativação de receptores P2X7 em células satélites gliais. Para tanto, foi utilizado o antagonista seletivo A740003 incubado previamente ao tratamento com capsaicina. A administração do antagonista resultou no bloqueio da resposta das células satélites mas não nos neurônios. Considerando que o receptor P2X7 está presente apenas nas células satélites e que são ativados por altas concentrações de ATP (ZHANG et al., 2005), identificamos que o mediador dessa comunicação neurônio-glia no GRD estimulado pela capsaicina é o ATP.

O estudo sobre a liberação de ATP pelos neurônios sensoriais de gânglios é recente. Em estudos de Jung et al. (2013) foi observado em cultura do GRD quando quantidades de ATP estocadas em vesículas lisossomais nas margens do corpo neuronal. Nesse mesmo estudo, foi avaliada a localização do transportador nucleotídico vesicular (VNUT) cuja função é transportar o ATP para dentro de vesículas lisossomais. A marcação para VNUT foi detectada também nas margens do soma, indicando assim sua participação na formação de estoques de ATP. Em estudo posterior, foi observado que VNUT é predominantemente expresso em neurônios de pequeno ($< 750 \mu m^2$) e médio (entre 750 a $1.750 \mu m^2$) diâmetro do GRD, sugerindo portanto, a participação de VNUT na sinalização nociceptiva através da acumulação de ATP nos neurônios do GRD (NISHIDA et al., 2014). Esses resultados colaboram com a nossa

pesquisa, pois mostram que os neurônios pequenos e médios, possivelmente nociceptores, liberam ATP no GRD.

Visto que a ativação de nociceptores por capsaicina nos teste *in vitro* resultou em liberação de ATP e ativação de células satélites gliais, decidimos avaliar se esta comunicação de alguma forma poderia interferir na atividade dos nociceptores *in vivo*. Para tanto, foi realizado o teste da capsaicina de forma que os neurônios nociceptivos foram ativados diretamente através de injeção intraplantar de capsaicina, resultando em comportamentos tipicamente nociceptivos como o sacudir e lambar as patas dos animais. A participação das células satélites gliais na nocicepção foi avaliada através da injeção intraganglionar do antagonista de receptores P2X7, o A740003, de forma a bloquear a comunicação entre neurônios e células satélites da mesma maneira que nos testes *in vitro*. Pudemos observar que os animais tratados com o antagonista obtiveram uma redução significativa da nocicepção induzida por injeção de capsaicina. Este resultado é surpreendente visto que a capsaicina ativa diretamente potenciais de ação em neurônios, os quais são transmitidos até os terminais centrais levando à liberação de neurotransmissores. Isso sugere que esses receptores estão envolvidos na transmissão do estímulo da capsaicina, confirmando o que foi visto em cultura, isto é, existe uma comunicação entre neurônios e células satélites no GRD que envolve a liberação de ATP pelos neurônio quando ativado pela capsaicina e que por sua vez, atua sobre os receptores P2X7 nas células satélites gliais. A ativação do receptor P2X7 por ATP supostamente promove outros eventos moleculares, os quais, atuariam novamente no neurônio alterando a resposta nociceptiva à capsaicina. Seria uma ação de “feedback” das células satélites para os neurônios. Embora este tipo de comunicação tenha sido avaliada por outros autores, este estudo é o primeiro que sugere a participação das células satélites gliais na dor aguda, sem que ocorra sensibilização dos nociceptores.

O estudo da influência da glia na atividade do neurônio foi estudada em outros tipos de células gliais. Foi visto que o ATP liberado a partir de astrócitos inicia um aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, formando ondas de Ca^{2+} que se propagam para astrócitos vizinhos. O ATP liberado por essas células é convertido pelas ATPases que então ativam os receptores nos neurônios do hipocampo modulando a resposta neuronal (GUTHRIE et al., 1999; COTRINA et al., 2000; ZHANG et al., 2003). Nos gânglios sensoriais, a influência da ativação das células satélites na atividade neuronal ainda não está totalmente esclarecida, mas alguns estudos sugerem prováveis mecanismos. Ao contrário dos neurônios, as células satélites não expressam canais de Na^+ dependentes de voltagem, mas expressam canais de Ca^{2+} e K^+ dependentes de

voltagem (CHERKAS et al., 2004; VIT et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Apesar dessas células não responderem a estímulos elétricos, elas respondem a estímulos externos por mudanças no Ca^{2+} citosólico através da abertura de receptores permeáveis a Ca^{2+} , como por exemplo, receptores purinérgicos ionotrópicos P2X (ZHANG et al., 2007; CERUTI et al., 2008). Deste modo, essas células usam Ca^{2+} intracelular para sinalização, de forma semelhante às células gliais no SNC. Em culturas do gânglio trigêmeo, a estimulação mecânica das células satélites promove ondas de Ca^{2+} que espalham aos neurônios e entre as células satélites adjacentes. Essa sinalização de Ca^{2+} é mediada por receptores purinérgicos e por junções comunicantes, as “gap junctions” (SUADICANI et al., 2010). Considerando isso em nossos resultados, pode-se sugerir que a ativação dos receptores P2X7 pelo ATP liberado pelos neurônios em resposta a capsaicina, levaria ao aumento de Ca^{2+} intracelular que resultaria em ondas de cálcio. Essas ondas teriam ação sobre outras células satélites de unidades vizinhas, resultando na liberação de mais ATP que atuaria agora nos neurônios, provocando uma amplificação do sinal doloroso. Assim sendo, em nossos experimentos, quando realizamos o bloqueio de P2X7 diretamente no GRD, esse possível mecanismo de ondas de Ca^{2+} não estaria ocorrendo e portanto, a resposta do neurônio à capsaicina é reduzida, resultado que foi constatado pela diminuição da nocicepção.

A capsaicina excita de forma robusta e seletiva neurônios sensoriais aferentes primários associados a fibras C, provocando uma sensação de dor aguda de queimação acompanhada de vasodilatação e inflamação locais, seguida de hipersensibilidade ao calor (hiperalgesia térmica) e, em alguns graus, ao toque (hipersensibilidade mecânica) (JANC’O et al., 1967). Em nosso teste para a avaliação da hipersensibilidade mecânica utilizando método von Frey eletrônico, na dor induzida por capsaicina, obteve-se diferença estatística apenas no tempo de 15 minutos dos animais tratados com A740003. Portanto, a inibição de receptor P2X7 reduziu a hiperalgesia mecânica, entretanto, nos demais tempos avaliados não houve diferença entre os grupos. A concentração de capsaicina utilizada causou uma dor rápida e hipersensibilidade branda, por isso, não foi verificada alterações nos demais tempos. Nos demais experimentos em que mentol ou capsaicina foram administrados, estes agentes não foram suficientes para induzir um aumento de sensibilidade mecânica. Deste modo, não pudemos avaliar a participação de junções comunicantes ou do receptor P2X7 na sensibilização induzida por estes agentes.

No teste *in vivo* da capsaicina onde os animais foram previamente tratados com o A740003 juntamente com Carbenoxolona, obteve-se redução da nocicepção. Mas o efeito não

foi somatório quando comparado com os testes em que essas drogas foram aplicadas separadamente. Podemos perceber, inclusive que o efeito observado foi menor do que de qualquer um dos inibidores sozinhos. Este resultado sugere que a ativação dos receptores P2X7 nas células gliais e o transporte de substâncias através de junções comunicantes são processos dependentes. Este resultado corrobora com a ideia de que as células satélites seriam ativadas por ATP liberado por neurônios ativados e o sinal seria amplificado através da comunicação entre células satélites de neurônios próximos no gânglio da raiz dorsal. Deste modo, a liberação de ATP e ativação de receptores P2X7 parece depender da comunicação via junções comunicantes para que o sinal possa ser amplificado ou processado no gânglio da raiz dorsal.

Nos experimentos seguintes, procuramos avaliar se a participação de ATP/P2X7 e da comunicação entre neurônios e células satélites é um processo que depende da ativação de receptores TRPV1 para capsaicina, ou se ocorre em qualquer situação de dor aguda. Para tanto, buscamos outros modelos de nocicepção. Visto que os bloqueadores são administrados no gânglio da raiz dorsal no nível L5, só pudemos utilizar de modelos de nocicepção induzida na pata traseira dos animais. Foram utilizados, portanto, os testes de administração de mentol e formalina na pata de ratos. No teste *in vivo* do mentol observou-se uma diminuição na nocicepção em animais tratados com antagonista dos receptores P2X7 no gânglio, sugerindo novamente uma comunicação neurônio-glia no GRD mediada por ATP, tal como foi visto com a capsaicina. Dessa forma, o antagonista A740003 alterou a resposta neuronal à dor ao frio induzido pelo mentol, possivelmente também pelo efeito “feedback” das células satélites sobre os neurônios. O mentol atua nos neurônios aferentes primários através dos receptores TRPM8, que são abundantemente expressos em neurônios não mielinizados (fibras C) e a capsaicina através do TRPV1, que é expresso apenas em fibras C (KOBAYASHI et al. 2005b). O outro teste nociceptivo utilizado foi o teste da formalina. A injeção intraplantar de formalina na pata traseira do rato desencadeia um padrão bifásico composto por um período agudo (fase 1) seguido, de um segundo período mais longo de atividade comportamental sustentada (fase 2) (DUBUISSON e DENNIS, 1977). A fase 1 compreende os primeiros 10 minutos e é atribuída a um efeito direto sobre os nociceptores, enquanto que a fase 2 está relacionada com o desenvolvimento de inflamação e sensibilização na medula espinhal (MALMBERG e YAKSH, 1992). Nos experimentos realizados utilizando o teste da formalina, aqueles animais que receberam o antagonista de receptores P2X7 i.g., obtiveram uma redução na nocicepção, nos tempo 15, 20 e 25 minutos, que compreende a segunda fase da formalina. Na primeira fase, entretanto, não houve diferença estatísticas entre os grupos. Este resultado sugere que a liberação de ATP e ativação de células gliais no gânglio da raiz dorsal não ocorre em toda

situação de nocicepção. Os resultados obtidos nos testes com capsaicina, mentol e formalina indicam que esta comunicação é exclusiva de um subtipo de fibras nociceptivas, as fibras C, visto que o receptor TRPA1 encontram-se expressos abundantemente nesse tipo de fibra (MCNAMARA et al., 2007). Em um estudo de Puig e Sorkin (1995), foi investigado de forma detalhada o envolvimento de diferentes tipos de fibras nervosas no teste da formalina. Foi verificado que na fase 1 as fibras A β , A δ e C são ativadas, sendo que os picos médios de ativação de fibras A δ e A β foram significativamente maiores do que as fibras C. Já na fase 2, foi observado ativação apenas das fibras A δ e C, sendo que 100% das fibras C apresentaram atividade nesse fase, porém não de maneira uniforme. Esse estudo colabora com os resultados obtidos nesse trabalho. Outro estudo mais recente (SHIELDS et al., 2010), utilizando a destruição de fibras do tipo C através da administração intratecal de capsaicina em camundongos, também mostra a participação diferencial das fibras A δ e C no teste da formalina. Neste estudo, verifica-se que a concentração de formalina utilizada interfere no tipo de fibra ativada, sendo em 0,5% de formalina ambos os tipos de fibra são ativados, em 2% de formalina predomina a ativação das fibras A δ , sendo que apenas na segunda fase do teste é detectada ativação de fibras C. Dessa maneira, considerando que as fibras C participam mais ativamente durante a fase 2 e a administração do antagonista dos receptores P2X7 reduziu a nocicepção nesta fase em alguns momentos, sugere-se que este receptor está envolvido em processo de nocicepção envolvendo a ativação das fibra C. Como na fase 1 a fibra C é pouco ativada, o bloqueio do P2X7 não alterou a resposta, pois as ação as fibras A β e A δ se sobressaem nessa fase. Apesar não ter diferença significativa na fase 1, observa-se uma queda na nocicepção dos animais tratados com o antagonista, sugerindo novamente que a ativação de receptores P2X7 das células satélites parece estar envolvido na ativação de fibras não mielinizadas.

As junções comunicantes ou “gap junctions” no GRD estão presentes entre as células satélites gliais da bainha de um mesmo neurônio e também entre células satélites de unidades de neurônios vizinhos (HUANG et al., 2006; PANNESSE, 2010). Em nosso estudo também buscamos estudar o papel dessas junções na transmissão da dor induzida por capsaicina e formalina, visto que, em diversos modelos de dor inflamatória ou crônica esse canal parece exercer função importante na manutenção da dor (DUBLIN e HANANI, 2007). Entretanto, ainda não haviam relatos do papel dessas junções na dor aguda. Pelas junções comunicantes podem ser liberados várias moléculas, dentre elas o ATP (BAO et al., 2004), assim, esse canal poderia estar envolvido no mecanismo que encontramos entre neurônio e glia no GRD na nocicepção rápida. No teste da capsaicina, a administração da carbenoxolona, resultou em um

efeito analgésico. Os animais tratados apresentaram menor resposta nociceptiva do que os animais controles. Esse resultado indica uma possível participação das junções comunicantes na nocicepção induzida por capsaicina. Já no teste da formalina, o grupo tratado com carbenoxolona, apresentou uma diminuição na nocicepção apenas nos tempos 40 e 45 minutos, ou seja, no fim da segunda fase da formalina. Isso sugere que as junções comunicantes tem participação mais tardiamente, e os receptores P2X7 atuariam no início da fase 2 como visto no resultado do teste da formalina em animais tratados com antagonista A740003. A carbenoxolona é um inibidor amplamente utilizado em estudos com dor. Em um modelo de dor inflamatória por CFA, o tratamento com carbenoxolona via intraperitoneal reduziu o acoplamento entre CSGs no GRD (DUBLIN e HANANI, 2007), e em um modelo de dor sistêmica por LPS, a carbenoxolona também administrada por via intraperitoneal resultou em uma redução da hipersensibilidade mecânica nos animais afetados (BLUM et al., 2014). Esses resultados corroboram com o possível papel das junções comunicantes na transmissão da dor, entretanto, geram algumas dúvidas devido ao local de administração, pois a droga pode atuar em outros locais que não no GRD. Em nossos testes a administração de carbenoxolona foi diretamente no gânglio sensitivo (L5), o que permite ter maior segurança quanto ao local de atuação da droga. Estudos mais recentes verificaram que em certas concentrações a carbenoxolona também funciona como um inibidor de panexinas, mais especificadamente panx-1 (DAHL et al., 2013). As panexinas também estão envolvidas na liberação de ATP assim como de outros mediadores (ZHANG et al., 2015). Inicialmente foram consideradas como membros da família das “gap junctions” por apresentarem semelhanças na sequência gênica. Porém, fortes evidências demonstram que as panexinas são canais de membrana funcionais e que não atuam como canal intercelular em membranas opostas como ocorre nas conexinas (proteínas que formam as “gap junctions”) (SOSINKY et al., 2011; LOCOVEI et al., 2006). Alguns estudos apontam para uma relação entre panx1 e receptor P2X7 no sistema nervoso central em modelos de crônica (BRAVO et al., 2015). Desta forma, é possível que a administração de carbenoxolona possa não somente estar bloqueando a comunicação intercelular através de junções comunicantes, mas também esteja inibindo a liberação de ATP através de panexinas. Os processos envolvidos na liberação de ATP no gânglio da raiz dorsal parecem ser importantes para o processamento da dor e pretendemos estudar estes eventos em estudo próximo.

Visto que os resultados obtidos indicam um papel da comunicação neurônio/glia no processamento da dor e que este estudo derivou de resultados iniciais *in vitro*, em que observou-

se que a administração de capsaicina levava à ativação de células satélites, como descrito anteriormente, era a nossa intenção realizar uma série de experimentos com culturas de GRD na tentativa de esclarecer a forma pela qual a ativação dos receptores P2X7 na glia iria influenciar na resposta neuronal ao estímulo doloroso. No entanto, não foi possível realizar todos os experimentos planejados por problemas técnicos no microscópio confocal. Foi realizado um experimento utilizando o agonista BzATP, que ativa receptores P2X7. A idéia era de buscar ativar seletivamente as células satélites e avaliar a resposta neuronal à capsaicina. De fato, no teste para a avaliação do efeito de BzATP em cultura do GRD, foi visto que os neurônios e as células satélites responderam diferentemente à capsaicina quando a cultura foi previamente tratada com o agonista. Os neurônios obtiveram uma redução dos níveis de cálcio e, portanto, uma resposta menor. Já as células satélites não apresentaram nenhuma resposta. A diminuição da resposta nas células satélites era esperada visto que o receptor já estava sendo ativado pelo agonista administrado, sendo que este permaneceu no meio durante o experimento. A resposta neuronal diminuída à capsaicina, entretanto, parece não ter ocorrido por causa da interação entre neurônios e células satélites. Isto porque pudemos observar que a administração de BzATP resultou em um rápido aumento de cálcio nos neurônios, sugerindo um efeito direto. O estudo de funções purinérgicas é geralmente complicado pela falta de seletividade dos agonistas e antagonistas. Diferente do que ocorre com o A740003, que possui alta seletividade, o BzATP além de atuar em receptores P2X7 também ativa outros subtipos de receptores. O BzATP também é potente agonista de receptores P2X1 em humanos e receptores P2X3 em humanos e ratos (WILEY et al., 1996). Sabendo-se que os receptores P2X3 estão expressos nos nociceptores do gânglio da raiz dorsal (KOBAYASHI et al., 2005a) é provável que a diminuição da resposta à capsaicina observada em nossos experimentos resulte da ativação de receptores purinérgicos por BzATP nos neurônios. Assim, seria oportuno investigar o efeito do BzATP em culturas do GRD previamente tratada com o antagonista seletivo A740003. Ainda assim, a observação de que a ativação de receptores P2X3 resulta em diminuição do efeito da ativação de receptores TRPV1 é interessante e relevante para o estudo. O estudo de Chen e colaboradores (2008) mostra que a ativação de receptores P2X7 no gânglio da raiz dorsal de ratos induz uma diminuição na expressão de receptores P2X3 em neurônios. Deste modo, a atividade destes dois subtipos de receptores, presentes em células distintas parece estar relacionada e interferir no processamento da dor. Em resumo, os experimentos realizados durante o desenvolvimento deste estudo sugerem um novo papel para os receptores P2X7 e para a atividade de células satélites gliais no gânglio da raiz dorsal. Até o presente, o receptor P2X7 tem sido considerado como peça importante em situações de dor crônica e inflamatória,

visto que a ativação deste é chave para a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Os resultados aqui descritos indicam que a ativação destes receptores em células satélites glias participa de um processamento rápido do sinal nociceptivo nos gânglios sensitivos. Ainda, os resultados sugerem que o envolvimento do receptor, assim como das junções comunicantes em células satélites, ocorre apenas quando neurônios nociceptivos associados a fibras C são ativados. Conforme mencionado anteriormente (DEVOR, 1999) os gânglios da raiz dorsal não apresentam barreira hemato-neural, o que facilita a administração de drogas que atuem neste local. Desta forma, entender o processamento da dor no gânglio da raiz dorsal pode permitir o desenvolvimento de fármacos com menos efeitos adversos, que não atuem centralmente por não atravessarem a barreira hematoencefálica/hematoneural. Os resultados aqui apresentados sugerem que a modulação de receptores P2X7 ou da liberação de ATP no sistema nervoso periférico pode ser um alvo para o tratamento da dor.

5.1. Esquema: Comunicação neurônio-glia no GRD envolvendo liberação de ATP.

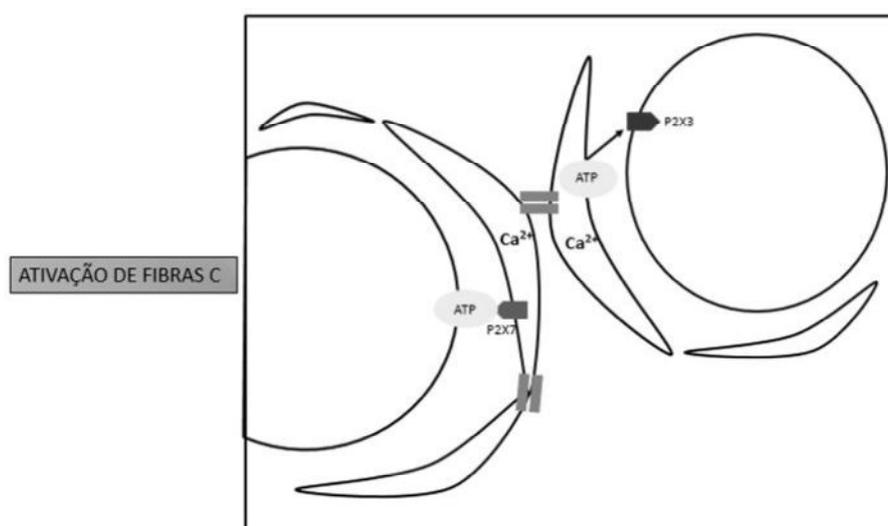


Figura 12: Comunicação neu-glia. O esquema representa o possível mecanismo encontrado nesse estudo. A imagem mostra a liberação de ATP por um neurônio nociceptor após ativação de fibras C. O ATP liberado atua sobre as células satélites glias por meio da ligação ao receptor P2X7. Essa ativação resulta no aumento de Ca^{2+} intracelular nas células satélites, o qual atua agora sobre os junções comunicantes provocando uma onda de cálcio que passa a atuar sobre unidades vizinhas. Dessa maneira, ocorre mais liberação de ATP pela célula satélite vizinha, o qual, irá atuar no neurônio dessa unidade, modulando a resposta dolorosa. Portanto, quando utilizamos os inibidores de junções comunicantes e o agonista de receptores P2X7 esse mecanismo não ocorreu e os animais obtiveram uma redução da nocicepção.

6. CONCLUSÃO

A partir desse estudo podemos então concluir que:

- Existe uma comunicação entre neurônios e células satélites no gânglio da raiz dorsal que é importante para reposta da dor rápida, isto é, da nocicepção.
- Essa comunicação envolve a liberação de moléculas de ATP a partir de nociceptores e ativação de receptores purinérgicos do tipo P2X7 nas células satélites gliais.
- Os resultados sugerem que a ativação dos receptores P2X7 gliais por ATP parece depender da ativação prévia de fibras não mielinizadas, fibras C.
- O processamento da dor envolvendo a comunicação entre células satélites e neurônios via ATP/P2X7 parece depender da comunicação intercelular através de junções comunicantes.

Portanto, o estudo traz uma nova ideia de que não apenas os neurônios mas também as células satélites gliais participam do processamento da nocicepção no gânglio da raiz dorsal.

REFERÊNCIAS

ABASCAL, F. e ZARDOYA, R. Evolutionary analyses of gap junction protein families. **Biochim. Biophys. Acta.** 1828, p. 4–14. 2012.

ABBRACCHIO, M. P., G. BURNSTOCK, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, v.58, n.3, Sep, p.281-341. 2006.

ABBRACHIO, M. P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci.** v. 32, p. 19–29. 2009.

ARVIDSON, B. Distribution of intravenously injected protein tracers in peripheral ganglia of adult mice. **Exp. Neurol.** v. 63, p.388–410. 1979.

AXELROD F.B., HILZ M.J. Inherited autonomic neuropathies . **Semin Neurol.** v. 23, n. 4, p. 381-90. 2003.

AZZI, G., BERNAUDIN, C., et al. Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins. **G. Biol. Cell.** v. 68, p. 31– 36. 1990.

BAO, L., S. LOCOVEI, et al. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. **FEBS Lett**, v.572, n.1-3, p.65-8. 2004.

BASBAUM A., JESSELL T. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. **Principles of Neural Science.** 4^a ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.

BASBAUM, AI., BAUTISTA, DM., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v.139, p. 267–284. 2009.

BAUTISTA, DM., SIEMENS, J., et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature.** v. 448, p. 204–8. 2007.

BEVAM, S., QUALLO, T., ANDERSSON, DA. TRPV1. **Handb Exp Pharmacol.** v. 222, p. 207-45. 2014.

BINSHTOK, AM., BEAN, BP., WOOLF, CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. **Nature**. v. 449, p. 607-610. 2007.

BLUM, E., PROCACCI, P., CONTE, V., HANANI, M. Systemic inflammation alters satellite glial cell function and structure. A possible contribution to pain. **Neuroscience**. v.274, p. 209–217. 2014.

BODIN, P. e G. BURNSTOCK. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochem Res**, v.26, n.8-9, p.959-69. Sep, 2001.

BRAVO, D., MATURANA, CJ., et al. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. **Pharmacological Research**. v. 101, p. 86–93. 2015.

BURNSTOCK G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**. v.87, p. 659-797. 2007.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci**. v.27, n.3, p.166-76. Mar, 2006.

CAO, X. et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviours. **Nat. Med**. v. 19, p. 773–777. 2013.

CATARINA, MJ., SCHUMACHER, MA., et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v. 389, p. 816–24. 1997.

CASPANI, O., HEPPENSTALL, PA. TRPA1 and cold transduction: An unresolved issue? **J. Gen. Physiol**. v. 133, p. 245, p. 2009.

CERUTI, S., FUMAGALLI, M, et al. Villa G, Verderio C, Abbracchio MP. Purinoceptor-mediated calcium signaling in primary neuron-glia trigeminal cultures. **Cell Calcium**. v. 43, p.576–590. 2008.

CHEN, Y., X. ZHANG, et al. Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.43, p.16773-8. 2008.

- CHERKAS, PS., HUANG, TY., et al. The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. **Pain**. v. 110, p. 290–298. 2004.
- CHESSELL, I.P., HATCHER, J.P., et al. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. **Pain**. v. 114, p. 386-396. 2005.
- CHIANG, CY., DOSTROVSKY, JO., et al. Role of glia in orofacial pain. **Neuroscientist**. v.303, p. 320. 2011.
- COTRINA, ML., LIN, JH., et al. ATP-mediated glia signaling. **Journal of Neuroscience**. v.20, p. 2835–2844. 2000.
- CUNHA, F. Q., B. B. LORENZETTI, et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, v.104, n.3, Nov, p.765-7. 1991.
- DAHL, G. et al. The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1 **Neuropharmacology**. v. 75, p. 583-93. 2013.
- DAVIS, JB., GRAY. J., et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**. v. 405, p. 183–87. 2000.
- DEVESA, I., et al. α CGRP is essential for algesic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors. **Proc Natl Acad Sci**, v. 111, p. 18345–18350. 2014.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 6, p.S27-35. 1999.
- DHAKA, A., MURRAY, AN., et al. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron**. v. 54, p. 371–78. 2008.
- DI VIRGILIO, F., P. CHIOZZI, et al. Cytolytic P2X purinoceptors. **Cell Death Differ**, v.5, n.3, Mar, p.191-9. 1998.
- DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience**, v. 101, p. 393-401. 2000.
- DUBLIN, P. e M. HANANI. Satellite glial cells in sensory ganglia: their possible contribution to inflammatory pain. **Brain Behav Immun**, v.21, n.5, p.592-8. 2007.

DUBUISSON, D. e DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v.4, p.161-174. 1977.

ENGLAND, S.; S. BEVAN; R. J. DOCHERTY. PGE2 modulates the tetrodotoxin resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J Physiol**, v.495 (Pt 2), p.429-40, 1996.

FEIN, A. Nociceptors: The Cells That Sense Pain. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>> Petrov P, Francischi JN, Ferreira SH, et al. tradutores. Acesso em 10 de Novembro de 2016. 2011.

FERRARI, D., C. PIZZIRANI, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J Immunol**, v.176, n.7, p.3877-83. 2006.

FERRARI, D., CHIOZZI P., et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. **J Immunol**, v.159, n.3, p.1451-8. 1997.

FERRARI, L. F., F. Q. CUNHA, et al. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. **J Neurosci Methods**, v.159, n.2, p.236-43. 2007.

FERREIRA, S. H.; B. B. LORENZETTI; A. F. BRISTOW; S. POOLE. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698-700. 1988.

GENTRY, C., STOAKEY, N., et al. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. **Molecular Pain** v. 6, p.4. 2010.

GOLD, M.S., GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat. Med.** v. 16, p. 1248–1257. 2010.

GOLD, M.S.; J. D. LEVINE; A. M. CORREA. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J Neurosci**, v.18, p.10345-55, n. 24. 1998.

GOODENOUGH D. A., PAUL D. L. Gap junctions. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 2009.

GRUBB, B.D., EVANS, R.J. Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. **Eur J Neurosci**. v. 11, n. 1, p.149-54. 1999.

GU, Y., CHEN, Y, *et al.* Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. **Neuron Glia Biol.** v.6, p. 53–62. 2010.

GUTHRIE, PB., KNAPPENBERGER, J., *et al.* ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. **Journal of Neuroscience.** v. 19, p. 520–528. 1999.

HAMILTON, SG, WADE A., MCMAHON, SB, The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. **Br. J. Pharmacol.** v. 126, p. 326–332. 1999.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res Brain Res Rev**, v.48, n.3, p.457-76. 2005.

HANANI, M., HUANG, T.Y., CHERKAS, P.S., LEDDA, M., PANNESE, E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience.** v. 114, p. 279–283. 2002.

HILLIGES M., WEIDNER, C., *et al.* ATP responses in human C nociceptors. **Pain.** v. 98, p.59–68. 2002.

HU, P., MCLACHLAN, E.M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience.** v.112, n.1, p. 23–38. 2002.

HUANG, J., X. ZHANG; P. A. MCNAUGHTON. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Curr Neuropharmacol**, v.4, p.197-206, n.3. 2006.

HUANG, LY, , [GU, Y.](#), CHEN, Y. Communication Between Neuronal Somata and Satellite Glial Cells in Sensory Ganglia. **GLIA.** v.61, p. 1571–1581. 2013.

HUANG, T.Y., BELZER, V., HANANI, M. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. **Eur J Pain.** v. 49 p.1-11. 2010.

IDZKO, M., FERRARRI, D., ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature.** v. 509, p. 310–317. 2014.

JACOBS, JM., MACFARLANE, RM., *et al.* Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase, **J. Neurol. Sci.** v. 29, p. 95–107. 1976.

JANCS'Ó, N., et al. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** v. 31, p. 138–51. 1967.

JASMIN, L., VIT, JP., BHARGAVA, A., OHARA, PT. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control?. **Neuron Glia Biol.** v. 6, p. 63–71. 2010.

JI, RR, XU, ZZ., GAO, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 13, p. 533–548. 2014.

JI, RR., KAWASAKI, Y., et al. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: Review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. **Neuron. Glia Biol.** v. 2, p. 259–269. 2006.

JULIUS, D. From peppers to peppermints: natural products as probes of the pain pathway. **Harvey Lect.** v. 101, p. 89–115. 2005.

JULIUS, D.; A.I. BASBAUM. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-10, n. 6852. 2001.

JUNG, J., SHIN, YH., et al. Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 488–493. 2013.

KARASHIMA, Y., DAMANN, N., et al. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. **J Neurosci**, v. 27, p. 9874–9884. 2007.

KHAKH, B.S., BURNSTOCK, G. The double life of ATP. **Sci. Am.** v. 301, p. 84-90. 2009.

KNOWLTON, WM., BIFOLCK-FISHER, A. et al. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics *in vivo*. **Pain.** v. 150, p. 340–50. 2010.

KOBAYASHI, K., et al. Differential Expression Patterns of mRNAs for P2X Receptor Subunits in Neurochemically Characterized Dorsal Root Ganglion Neurons in the Rat. **The journal of comparative neurology.** n. 2. v. 481, p. 377–390. 2005a.

KOBAYASHI, K., FUKUOKA, T., et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with δ/c -fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.** v. 493, p. 596–606. 2005b.

KUSHNIR, R., CHERKAS, PS., HANANI, M. Peripheral inflammation upregulates P2X receptor expression in satellite glial cells of mouse trigeminal ganglia: a calcium imaging study. **Neuropharmacology.** v. 61, p. 739 - 46. 2011.

KWAN, KY., COREY, DP. Burning Cold: Involvement of TRPA1 in Noxious Cold Sensation. **J Gen Physiol.** v. 133, p. 251-256. 2009.

LIEBERMAN, AR. Sensory ganglia, in: D.N. Landon (Ed.), *The Peripheral Nerve*, Chapman and Hall, London, p. 188–278. 1976.

LINHART, O., O. OBREJA, et al. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience.** v. 118, n.1, p.69-74. 2003.

LISHKO, PV., PROCKO, E., JIN, X., PHELPS, CB., GAUDET, R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. **Neuron.** v. 54, p. 905–918. 2007.

LIU, X., ZHOU JL., CHUNG, K., CHUNG, JM. Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat. **Brain Res.** v. 900, p. 119–127. 2001.

LOCOVEI, S., BAO, L. DAHL, G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.103, n. 20, p.7655–7659. 2006.

LOESER, J.D., TREEDE R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n.3, p. 473-477. 2008.

LUSTIG, K.D. et al. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. **Proc.Natl.Acad. Sci. U. S. A.** v. 90, p. 5113–5117. 1993.

MALMBERG, A.B. e YAKSH, T.L., Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal antiinflammatory agents on the formalin test in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Therapeut.** v. 263, p. 136-263. 1992.

MCCOY, DD., KNOWTON, WM., MCKEMY, DD. Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 300, p. 1278–87. 2011.

MCKEMY, DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. **Mol Pain.** p. 1:16. 2005.

MCMAHON, SB., KOLTZENBURG M., editors. Wall and Melzack's - textbook of pain. 5th ed. **Philadelphia: Elsevier;** 2006.

MCNAMARA, CR., et al. TRPA1 mediates formalin- induced pain. **PNAS.** v. 104, n. 33, p. 13525–13530. 2007.

MILLAN, MJ. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** v. 57, p.1–164. 1999.

MOLLER, K. A., B. JOHANSSON, et al. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods**, v.84, n.1-2, p. 41-7. Oct, 1998.

NILIUS, B. TRP channels in disease. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1772, p. 805–12. 2007.

NISHIDA, K., NOMURA, Y., et al. Expression profile of vesicular nucleotide transporter (VNUT, SLC17A9) in subpopulations of rat dorsal root ganglion. **Neuroscience Letters.** v. 579, p. 75–79. 2014.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol. Rev.** v. 82, p.1013–1067. 2002.

OLIVEIRA, L. M. As Dores. In: Lent, R. Neurociência da Mente e do Comportamento. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8. p. 183-201. 2008.

ORELLANA, J. A., MORAGA-AMARO, R., et al. Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. **Front. Cell. Neurosci.** v.9, p. 102. 2015.

PALAZZO, E., et al. Transient receptor potentialvanilloid type 1 and pain development. **Curr Opin Pharmacol** 2012, v. 12, p. 9–17. 2012.

PANKRATOV, Y., LALO U., et al. Vesicular release of ATP at central synapses. **Pflugers Arch.** v. 452, n. 5, p.89-97. 2006.

PANNESE E. The satellite cells of sensory ganglia, **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.** 1981.

PANNESE E. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. **Neuron Glia Biol**, v.6, n.1, p. 3-10. 2010.

PANNESE, E., LEDDA, M., et al. Clusters of nerve cells bodies enclosed within a common connective tissue envelope in the spinal ganglia of the lizard and rat. **Cell Tissue Res.** v. 264, p. 209–214. 1991

PANNESE, E., PROCACCI, P., et al. Age-related reduction of the satellite cell sheath around spinal ganglion neurons in the rabbit, **J. Neurocytol.** v. 25, p. 137– 146. 1996.

PATAPOUTIAN, A., TATE, S., WOOLF, CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 8, p. 55–68. 2009.

PEIER, AM., MOQRICH, A., et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell.** v.108, p. 705–15. 2002.

PUIG, S., e SORKIN, LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity **Pain.** v. 64, p. 345-355. 1995.

PURVES, D. et al. Neurociências – Cap. 10. 4 Ed. P. 231-250. 2010.

RAJA, S. N., MEYER, R. A., et al. Textbook of Pain (eds Wall, P. D. & Melzack, R.) p. 11–57. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999.

RALEVIC, V., BURSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.** 50, p. 413–492. 1998

RAMSEY, IS., DELLING, M, CLAPHAM, DE. An introduction to TRP channels. **Annu. Rev. Physiol.** v. 68, p. 619–47. 2006.

RASH, J.E., STSINES, W.A., et al. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 97, p. 7573–7578. 2000.

RIEDEL, W.; G. NEECK. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v.60, p.404-15, 2001, n.6.

- ROBERTS, J.A. et al. Molecular properties of P2X receptors. **Pflugers Arch.** v. 452, p. 486–500. 2006.
- ROUACH, N., AVIGNONE, A., et al. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. **Biology of the Cell.** v. 94, p. 457–475. 2002.
- ROZENTAL, R., GIAUME, C., SPRAY, D.C. Gap junctions in the nervous system. **Brain Res. Brain Res. Rev.** v.32, p.11–15. 2000.
- SACHS, D., F. Q. CUNHA, et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**, v.96, n.1-2, p.89-97. 2002.
- SAKURADA, T. KATSUMATA, K., TAN-NO K., SAKURADA, S. KISARA, K. The Capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology.** v.31; p.1279-1285, 1992.
- SATAKE, M. et al. Connexin32 gene expression in rat sciatic nerves and cultured Schwann cells. **Dev Neurosci.** v. 19, n. 2p. 189-95. 1997.
- SCHMIDT, R. F. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J. Neurosci.** v. 15, p. 333–341. 1995.
- SCHOLZ, J., WOOLG, C.J. Can we conquer pain?. **Nat Neurosci.** v 5, p.1062---7. 2002.
- SHERRINGTON, C. S. The Integrative Action of the Nervous System. Scribner, New York, 1906.
- SHIELDS, S.D., CAVANAUGH, D.J., et al. Pain behavior in formalin test persist after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain.** v. 151, n. 2., p. 422-9. 2010.
- SHINDER, V., DEVOR, M. Structural basis of neuron-to-neuron crossexcitation in dorsal root ganglia, **J. Neurocytol.** v. 23, p. 515– 531. 1994.
- SMUTZER, G, DEVASSY, RK. Integrating TRPV1 receptor function with capsaicin psychophysics. **Adv Pharmacol Sci.** p.1 –16. 2016.
- SNIDER, W. D. & MCMAHON, S. B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. **Neuron.** v. 20, p. 629–632. 1998.

SOHL, G., MAXEINER, S., WILLECKE, K. Expression and functions of neuronal gap junctions. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 6, p. 191–200. 2005

SOLLE, M., et al. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. **J Biol Chem.** v. 276,n.1, p.125-32. 2001.

SOSINSKY, GE., BOASSA, D., et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. **Channels (Austin).** p.193–197. 2011.

SPERLAGH, B., ILLES, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 35, p. 537–547. 2014.

SRINIVASAN, K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: A review. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 56, p. 1488–1500. 2015.

SUADICANI, S.O., CHERKAS, PS., ZUCKERMAN, J., et al. Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. **Neuron Glia Biol.** v.6, p.43-51. 2010.

SURPRENANT, A., F. RASSENDREN, et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science.** v.272, n.5262, p.735-8. 1996.

STORY, GM., PEIER, AM., REEVE, A.J., et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell.** v. 112, p. 819, o. 2003.

TAKEDA, M., TAKAHASHI, M., MATSUMOTO, S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain. **Neuroscience Biobehav Rev.** 2009.

TEN TUSSCHER, M.P.M., KLOOSTER, J., et al. Satellite cells as blood-ganglion barrier in autonomic ganglia. **Brain Res.** v.490, p. 95– 102. 1989.

TOMINAGA, M., CATERINA, MJ., et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron.** v. 21, p. 531–43. 1998.

TSUDA, M., MASUDA, T., TOZOZAKI-SAITOH, H., INOUE, K. P2X4 receptors and neuropathic pain. **Front. Cell. Neurosci.** v. 7, p. 191. 2013.

TSUDA. M., INOUE, K., SALTER, MW. Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in "small" glia. Trends **Neurosci.** v. 28, p.101–107. 2005.

- VIT, JP., JASMIN, L., et al. Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. **Neuron Glia Biology**. v. 2, p. 247–257. 2006.
- WATKINS, LR., HUTCHINSON, MR., et al. "Listening" and "talking" to neurons: implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids. **Brain Res Rev**. v. 56, p. 148–169. 2007.
- WEICK, M., CHERKAS, PS, et al. P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. **Neuroscience**, v.120, p. 969–977. 2003.
- WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.;
- WILEY, J.S., CHEN, J.R., SNOOK, M.S., GARGETT, C.E., JAMIESON, G.P. Transduction mechanisms of P2Z purinoceptors. **Ciba Found. Symp**. v.198, p. 149–160. 1996.
- WOODHAM, P., ANDERSON, P.N., NADIM, W., TURMAINE, M. Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein. **Neurosci Lett**. v.98, n. 1, p. 8-12. 1989.
- XIAO, B., DUBLIN, AE., et al. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. **J Neurosci**. v. 28, p. 9640–9651. 2008.
- YUDIN, Y., ROHACS, T. Regulation of TRPM8 channel activity. **Mol. Cell. Endocrinol**. v. 353, p. 68–74. 2012.
- ZHANG, H., MEI, X., et al. Altered functional properties of satellite glial cells in compressed spinal ganglia. **Glia**. v. 57, p. 1588–1599. 2009.
- ZHANG, JM., WANG, HK., et al. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. **Neuron**. v. 40, p. 971–982. 2003.
- ZHANG, X, HAN, P., et al. Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. **Brain Res**. v. 1052, p. 63–70. 2005.
- ZHANG, X., Y. CHEN, et al. Neuronal somatic ATP release triggers neuron satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.23, p.9864-9. 2007.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-10.1983.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Participação dos receptores P2X7 das células da glia do gânglio da raiz dorsal, na dor aguda induzida por capsaicina”, protocolo nº 098/16, sob a responsabilidade de **Celina Monteiro da Cruz Lotufo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, 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 **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **21 de outubro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Participação dos receptores P2X7 das células da glia do gânglio da raiz dorsal, na dor aguda induzida por capsaicina", protocol 098/16, under the responsibility of Celina Monteiro da Cruz Lotufo - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of October 21st, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 01/12/2018
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	102
Peso / Idade	200 g / 5 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Biotério CBEA / Depositário da ARFIS
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU