

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

DANIELE RUELA MENDES

Ativação de receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal de ratos na dor aguda – envolvimento de fibras do tipo C

UBERLÂNDIA

2017

DANIELE RUELA MENDES

Ativação de receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal de ratos na dor aguda – envolvimento de fibras do tipo C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Professora Dr^a Celina Monteiro da Cruz Lotufo

UBERLÂNDIA

2017

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

M538a

2017

Mendes, Daniele Ruela, 1983-

Ativação de receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal de ratos na dor aguda - envolvimento de fibras do tipo C / Daniele Ruela Mendes. - 2017.

45 f. : il.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.59>

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses.
2. Hiperalgesia - Teses.
3. Nociceptores - Teses.
4. Dor aguda - Teses. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 581

Aos meus pais Eleutério (*in memorian*) e Maria das Graças, que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência. Ao meu esposo, meu grande amor e amigo, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar sempre a sua mão como um Pai amoroso que jamais abandona seus filhos.

Aos meus pais, Eleutério (*in memorian*) e Maria das Graças, pela formação humana baseada no amor e no respeito. Eu devo tudo que sou a vocês, e se sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão.

Ao meu marido Gilberto, pelo amor compartilhado, por acreditar em mim o tempo todo e estar sempre ao meu lado. Mesmo quando tudo pareceu tão difícil, você insistiu para que eu fosse em frente.

À minha família, em especial aos meus queridos tios Joana D'Arc e Maximino e aos meus primos Leonardo e Luciana, pela amizade, hospitalidade, carinho e companheirismo. Obrigada a vocês que sempre estiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida e por torcerem pela minha vitória.

À minha orientadora e mãe científica, Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de uma pessoa que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, inibindo a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia, em especial a querida Júlia, Taís, Débora, Ruth, Paula e Maria Vitória pelos momentos de alegria compartilhados e por me auxiliarem em todas as etapas desse trabalho.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pela contribuição na minha formação.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de formação e crescimento profissional.

Enfim, a todos os que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

“...Saber que a gente gosta disso e gosta daquilo é fácil. O difícil é saber qual, dentre todas, é aquela de que a gente gosta supremamente. Pois, por causa dela, todas as outras terão de ser abandonadas. A isso que se dá o nome de “vocação”; que vem do latim, *vocare*, que quer dizer “chamar...”

Muito Cedo Para Decidir, Rubem Alves

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de receptores NMDA presentes em células satélites do gânglio da raiz dorsal em modelos de dor aguda e hiperalgesia, determinar os tipos de fibras nociceptivas envolvidas neste processo e avançar nos mecanismos envolvidos na comunicação entre neurônios nociceptivos primários e células satélites gliais. Para isto, foram realizados experimentos comportamentais *in vivo* e culturas primárias de gânglio da raiz dorsal para investigar os mecanismos envolvidos na interação neurônio/glia *in vitro*. Utilizamos a administração intraganglionar (L5) do antagonista do receptor NMDA, AP-5, de forma a avaliar a participação deste receptor no gânglio da raiz dorsal na dor aguda (nocicepção) induzida por capsaicina e na sensibilização (hiperalgesia) induzida por PGE2. Além disto, foi avaliada a destruição seletiva de fibras C por injeção intratecal de capsaicina na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE2. Verificamos que a destruição preferencial de fibras C através da administração de capsaicina, assim como a administração intraganglionar de AP-5, não afeta a sensibilidade mecânica basal tendo, no entanto, impedido a sensibilização induzida por PGE2. A administração intraganglionar de AP-5 inibiu a resposta nociceptiva induzida por capsaicina. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem a participação de receptores NMDA em células satélites gliais no processamento da dor aguda envolvendo ativação de fibras do tipo C. Verificamos também que, em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal, a ativação de receptores NMDA em células satélites gliais induz uma despolarização no potencial de repouso neuronal, sugerindo um mecanismo pelo qual a ativação de receptores NMDA gliais influencia a excitabilidade neural e, portanto, a transmissão do sinal nociceptivo.

Palavras-chave: gânglio da raiz dorsal, células gliais satélites, NMDA, fibras sensoriais do tipo C.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the participation of NMDA receptors present in satellite cells of the dorsal root ganglion in models of acute pain and hyperalgesia and to determine the types of nociceptive fibers involved in the process. It was also intended to advance in the mechanisms involved in the communication between primary nociceptive neurons and satellite glial cells. For this, in vivo behavioral experiments and dorsal root ganglion cultures were performed to investigate the mechanisms involved in neuronal/glia interaction in vitro. We used intraganglionic (L5) administration of the NMDA receptor antagonist, AP-5, in order to assess the receptor in the dorsal root ganglion in acute pain (nociception) induced by capsaicin and in PGE2-induced sensitization (hyperalgesia). In addition it was tested the selective destruction of C-fibers by intrathecal injection of capsaicin in the inflammatory hyperalgesia induced by PGE2. We have found that preferential destruction of fibers by administration of capsaicin as well as intraganglion administration of AP-5 does not affect basal mechanical sensitivity while PGE2-induced sensitization was reduced. Intraganglionic administration of AP-5 inhibited the nociceptive behavior induced by intraplantar capsaicin administration. Taken together, results suggest that NMDA receptors present in satellite glial cells are involved in processing acute pain. This process seems to depend on activation of type C fibers. We have found that in dorsal root ganglion primary cultures the activation of NMDA receptors in satellite glial cells induces depolarization in the neuronal resting potential, suggesting a mechanism by which activation of glial NMDA receptors influences neural excitability and, therefore, the nociceptive signal transmission.

Key words: dorsal root ganglia, satellite glial cells, NMDA, C-fiber nociceptors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama esquemático das características estruturais do gânglio da raiz dorsal.	
Gânglio da raiz dorsal L4 e L5.....	12
Figura 2. Sítios de ligação do receptor NMDA.....	17
Figura 3. Diagrama esquemático da organização entre as células satélites e os corpos neurais no gânglio da raiz dorsal.....	19
Figura 4. Injeção intratecal.....	23
Figura 5. Injeção intraganglionar.....	24
Figura 7. Resposta nociceptiva a prostaglandina E2 em ratos TRPV1- destruído e TRPV1-intacto tratados com AP-5 ou salina (controle).	30
Figura 8. Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E2 – papel dos receptores NMDA e fibras C.	31
Figura 9. Efeito do tratamento com NMDA (250 μ M) em culturas primárias de GRD (24 h) na presença de Mg^{2+} sobre o potencial de repouso neuronal.	32
Figura 10. Efeito do tratamento com glicina (10 μ M) sobre o potencial de repouso neuronal em culturas primárias de GRD (24 h) na presença de Mg^{2+} .	32
Figura 11. Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC4(3) induzida por NMDA (250 μ M) em culturas primárias de GRD de 24 h na presença ou ausência de Mg^{2+} .	33
Figura 12. Diagrama esquemático ilustra a liberação de glutamato a partir do soma do GRD após a estimulação do terminal periférico.	37

LISTA DE ABREVIASÕES

- AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
- ATP - Adenosina trifosfato
- CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CGSs - Células Gliais Satélites
- COX - enzimas ciclooxygenases
- D-AP-5 - 2-amino-5-phosphovalerate
- DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecc
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EPSCs - correntes pós-sinápticas excitatórias
- GLY - glicina
- GRD - Gânglio da Raiz Dorsal
- GT - Gânglio trigeminal
- GLU - glutamato
- HEPES - ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
- I.g. - Injeção Intraganglionar
- I.pl. - Injeção Intraplantar
- IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IB4 - isolectina B4
- IGluRs - receptores ionotrópicos de glutamato
- L5 - vértebra lombar 5
- mGluRs - receptores metabotrópicos de glutamato
- NMDA - N-metil-D-aspartato
- PGE2 - Prostaglandina E2
- PKA - proteína quinase A
- PKC - proteína quinase C
- SNC – sistema nervoso central
- SNP – sistema nervoso periférico
- TNF α – fator de necrose tumoral α
- TrkA - receptor com alta afinidade para neurotrofina
- TRPV1 - receptor vanilóide de potencial transitório 1
- VNUT – transportador nucleotídico vesicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Dor	11
2.2. Nociceptores.....	12
2.2.1. Visão anatômica	12
2.2.2. Nociceptores térmicos ativados por calor	14
2.2.3. Sensibilização dos nociceptores – hiperalgesia.....	15
2.3. Sistema glutamatérgicos.....	16
2.3.1. Interações entre células gliais satélites e soma neuronal nos gânglios sensoriais	
18	
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Animais	22
4.2. Drogas	22
4.3. Administração de drogas.....	22
4.3.1. Administração intraplantar (i.pl.)	22
4.3.2. Administração intratecal (i.t.) de drogas através do método direto.....	22
4.3.3. Administração de drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal (i.gl.)	23
4.4. Testes comportamentais	25
4.4.1. Teste da capsaicina	25
4.4.2. Hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E2 (PGE2)	25
4.5. Microscopia confocal.....	26
4.5.1. Cultura primária do gânglio da raiz dorsal.....	26
4.5.2. Avaliação do potencial de membrana neuronal.....	27
4.6. Forma de análise dos resultados	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1. Participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por capsaicina	29
5.2. Participação de fibras C e de receptores NMDA na hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E2 (PGE2).....	29
5.3. Avaliação do efeito do tratamento com NMDA sobre o potencial de repouso em neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal	31
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais. O termo nocicepção está relacionado ao processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos intensos são detectados pelos nociceptores, neurônios sensoriais primários que são ativados por estímulos capazes de causar danos aos tecidos (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001)

Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira inclui as fibras A δ que são mielinizadas e a segunda classe inclui as fibras C, não mielinizadas e que podem ser subdivididas em peptidérgicas e não-peptidérgicas (BASBAUM et al., 2009; TREDEDE et al., 1995). A ativação desses neurônios leva à liberação de glutamato em seus terminais central e periférico gerando correntes pós-sinápticas excitatórias em neurônios do corno dorsal de segunda ordem (DEGROOT; ZHOU; CARLTON, 2000; GU; MACDERMOTT, 1997). A liberação aumentada de glutamato despolariza os neurônios pós-sinápticos ao ativar receptores de NMDA (N-metil-d-aspartato) quiescentes.

Todavia, estudos recentes têm evidenciado a possibilidade de que o glutamato também seja liberado no corpo celular dos neurônios no gânglio da raiz dorsal (GRD) e que as células gliais satélites (CGSs) contêm toda a proteína necessária para a absorção e reciclagem de glutamato (FERRARI et al., 2014; KUNG et al., 2013) .

Diante do exposto, a ideia para o presente trabalho surgiu após a realização de experimentos *in vitro* que avaliaram o aumento de cálcio intracelular em células satélites do GRD após a ativação dos receptores NMDA por glutamato (FERRARI et al., 2014). O referido estudo mostra evidências que o impulso nociceptivo gerado por um evento inflamatório no tecido periférico é regulado nos GRD por um sistema que envolve rNMDA glutamatérgicos.

Sendo assim, buscamos avaliar se os receptores NMDA estão envolvidos na dor aguda e quais tipos de fibras seriam responsáveis pela liberação de glutamato nos GRDs. Para isto, foram realizados experimentos *in vivo* e *in vitro* buscando compreender os mecanismos envolvidos. Foi utilizado antagonista do receptor NMDA, AP-5, de forma a avaliar a participação deste receptor no GRD na dor aguda (nocicepção) e na sensibilização (hiperalgesia).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”. A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo. A dor serve, normalmente, como um dispositivo de alerta, permitindo ao indivíduo adotar comportamentos de proteção adequados em resposta aos danos iminentes (BASBAUM et al., 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

Neste sentido, indivíduos que sofrem de anomalias congênitas que os tornam incapazes de detectar estímulos dolorosos não podem sentir a dor penetrante de uma picada de agulha, o calor de uma chama ou mesmo o desconforto associado com lesões internas, como um osso quebrado. Como resultado, esses indivíduos não adotam comportamentos de proteção adequados contra tais condições, muitas das quais podem ser fatais (BASBAUM et al., 2009). Dessa forma, a capacidade de reagir a estímulos nocivos é vital aos organismos, o que sugere que a capacidade de detectar e memorizar o perigo pode ter sido uma das principais forças evolutivas para o desenvolvimento de um sistema nervoso plástico (WOOLF; SALTER, 2000).

Uma vez que o tecido foi danificado mecanicamente ou por infecção, múltiplos mediadores químicos – citocinas, fatores de crescimento, cininas, purinas, aminas, prostanoïdes e íons – são liberados de células danificadas e inflamatórias. Alguns mediadores inflamatórios ativam diretamente os neurônios sensoriais primários, evocando a dor. Outros agem em conjunto produzindo uma sensibilização do sistema nervoso somatossensorial, característico da dor inflamatória, facilitando as vias de ativação da dor e o reparo tecidual. A dor pode tornar-se patológica quando ocorre dano ou disfunção do sistema nervoso periférico ou central. Nesse cenário a dor pode ser gerada espontaneamente e não possui qualquer papel protetor ou reparador (WOOLF; SALTER, 2000). Assim sendo, diferentes formas de dor são produzidas por diversos mecanismos. Compreender a neurobiologia da dor é substancial para a descoberta de novos alvos terapêuticos e controle dos processos dolorosos.

2.2. Nociceptores

2.2.1. Visão anatômica

As vias nervosas especializadas em detectar a presença de estímulos nocivos são conhecidas como vias nociceptivas, compostas por neurônios sensoriais primários denominados nociceptores. Essas células possuem morfologia, denominada pseudo-unipolar. Seus corpos celulares, localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminais (GT), emitem um axônio que se divide em dois ramos (Figura 1). O ramo periférico percorre os nervos sensitivos e termina nos diversos órgãos (para GRD) e regiões orofaciais (para GT), onde recebem estímulos sensoriais através de terminações nervosas. O ramo central se dirige para o corno dorsal da medula espinhal ou para o núcleo do trato espinhal do trigêmeo, onde o estímulo nervoso é enviado ao sistema nervoso central (SNC).

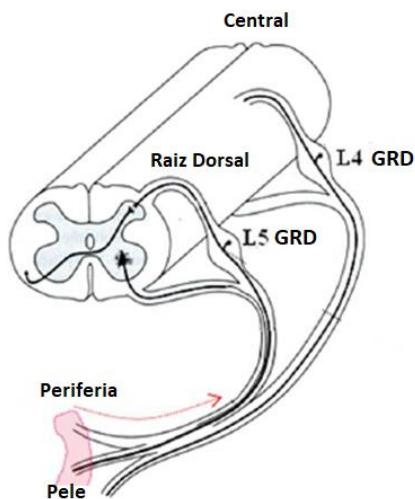


Figura 1. Diagrama esquemático das características estruturais do gânglio da raiz dorsal. Gânglio da raiz dorsal L4 e L5. Adaptado de HUANG et al (2013).

De acordo com o diâmetro, mielinização e velocidade de condução, os nociceptores podem ser classificados em dois grupos principais: o primeiro inclui as fibras A-delta (A δ) e o segundo inclui as fibras C. As fibras A δ , responsáveis pela dor rápida, aguda e lacinante sentida após estimulação nociva, possuem axônios de diâmetro médio (2 a 6 μm) ligeiramente mielinizados, cuja velocidade de condução média varia entre 12 e 30 m/s. As fibras C, responsáveis por transmitir a dor mal localizada, possuem diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μm), não são mielinizadas e apresentam velocidade de condução lenta (0,5 a 2 m/s) (HARPER; LAWSON, 1985).

Os nociceptores respondem a uma ampla gama de estímulos físicos, mecânicos e químicos. São ativados apenas quando a intensidade do estímulo atinge a faixa nociva, sugerindo que possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente prejudiciais (BASBAUM et al., 2009; CATERINA; JULIUS, 2001).

Portanto, existem várias classificações dos nociceptores de acordo com a modalidade de estímulo a que são sensíveis. A grande maioria dos nociceptores de fibra C são classificados como polimodais por serem sensíveis a estímulos mecânicos moderadamente intensos, calor nocivo e substâncias químicas irritantes. Outros são mecanicamente insensíveis, mas respondem ao calor nocivo. Há aqueles que respondem a estímulos químicos nocivos, como ácido ou capsaicina, o componente picante das pimentas vermelhas. Finalmente, os nociceptores silenciosos que desenvolvem sensibilidade somente no contexto da lesão tecidual (BESSOU; PERL, 1969; SCHMIDT et al., 1995).

Quanto aos nociceptores A δ , existem dois grupos principais. Os de tipo I, conhecidos como nociceptores mecânicos de alto limiar, respondem a estímulos mecânicos intensos e ao calor nocivo (temperaturas acima de 52 °C). Os nociceptores A δ do tipo II também são sensíveis aos estímulos mecânicos e ao calor, mas apresentam limiar de temperatura mais baixo, em torno de 43 °C (TREDEDE et al., 1995).

Em relação à neuroquímica, todos os nociceptores possuem glutamato, o aminoácido excitatório mais abundante no sistema nervoso. Porém, um grupo de nociceptores C possui também neuropeptídios como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor de neurotrofina TrkA, alvo do fator de crescimento nervoso (NGF). A população de nociceptores C não peptidérgicos expressa o receptor de neurotrofina c-Ret, alvo do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), receptores acoplados à proteína G da família Mrg, bem como o receptor purinérgico P2X3, um subtipo específico de canal iônico ativado por ATP (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001; SNIDER; MCMAHON, 1998).

Os nociceptores também podem ser distinguidos de acordo com sua expressão diferencial de canais que conferem sensibilidade ao calor, ao frio, ao meio ácido e a irritantes químicos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Logo, essas classes de nociceptores funcionalmente e molecularmente heterogêneas se associam com funções específicas na detecção de diferentes modalidades de dor (BASBAUM et al., 2009).

2.2.2. Nociceptores térmicos ativados por calor

Estudos fisiológicos têm demonstrado que há um limiar de dor que separa a percepção do calor inócuo e calor nocivo, o que nos permite reconhecer e evitar temperaturas capazes de causar danos aos tecidos. Esse limiar de dor, que normalmente situa em torno de 43 °C, assemelha-se à sensibilidade ao calor dos nociceptores A δ de tipo II e C descritos anteriormente (CATERINA et al., 1997; LEFFLER et al., 2007).

A compreensão molecular sobre o processo da sensação de calor veio da clonagem e caracterização funcional do receptor vanilóide subtipo 1 (VR1) a partir de células sensoriais de ratos localizadas no gânglio da raiz dorsal (CATERINA et al., 1997). Esse receptor foi denominado pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) como receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1 (TRPV1) (CATERINA et al., 1997; SOUTHALL et al., 2003).

O TRPV1 foi o primeiro membro da família de receptores vanilóides (TRPV1 à TRPV6) a ser caracterizado. São denominados de receptores vanilóides pelo fato da capsaicina e os compostos vanilóides relacionados serem seus principais agonistas. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é o principal e mais irritante constituinte ativo de *Capsicum* sp., popularmente conhecida como pimenta vermelha. De fato, a capsaicina possui a capacidade de evocar a sensação de dor ardente por mimetizar as ações de um estímulo fisiológico ou um ligante endógeno produzido durante a lesão tecidual. Estudos eletrofisiológicos e bioquímicos mostraram que a capsaicina excita os nociceptores ao aumentar a permeabilidade da membrana plasmática aos cátions (Ca $^{2+}$, Mg $^{2+}$, Na $^{+}$) através do receptor TRPV1 (BASBAUM et al., 2009; CATERINA et al., 1997; CATERINA; JULIUS, 2001; CORTRIGHT; SZALLASI, 2004; SOUTHALL et al., 2003).

A maioria dos nociceptores sensíveis à capsaicina são fibras C, mas outra população, menos numerosa, consiste em fibras A δ . A ativação periférica de neurônios aferentes sensíveis à capsaicina induz a liberação vesicular de glutamato e neuropeptídos, principalmente substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) de seus terminais centrais no corno dorsal da medula espinal, provocando assim uma resposta aguda da dor. No entanto, a estimulação por capsaicina ou outros estímulos nocivos (exposição ao calor ou a prótons) nestes nociceptores também podem desencadear a liberação de neuropeptídos a partir dos seus terminais periféricos (CATERINA; JULIUS, 2001; HOLZER P., 1991).

A ativação das vias nociceptivas, por capsaicina ou por algum outro estímulo nocivo, denomina-se nocicepção sendo o estímulo nocivo caracterizado como estímulo nociceptivo.

Por outro lado, a dor pode ser acompanhada por fenômenos paralelos, como a hiperalgesia, ou seja, sensibilização das fibras neuronais sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos (MILLAN et al., 1999; FEIN, 2011).

2.2.3. Sensibilização dos nociceptores – hiperalgesia

Os nociceptores podem ser sensibilizados por mediadores inflamatórios, como bradicinina, histamina, serotonina e prostaglandina E2 (PGE2) que são liberados durante as lesões teciduais, estresse metabólico e inflamação. Tais mediadores podem atuar em seus respectivos receptores, induzindo um aumento de excitabilidade dos neurônios nociceptivos, aumentando assim a probabilidade de disparos de potenciais de ação em resposta a um estímulo, fenômeno característico da hiperalgesia (HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; RIEDEL, W; NEECK, 2001).

Por sensibilizarem diretamente os neurônios nociceptivos, tais substâncias inflamatórias são denominadas mediadores hipernociceptivos. Entre esses mediadores, as prostaglandinas, produzidas pela ação das enzimas ciclooxygenases (COX), sobretudo a prostaglandina E2 (PGE2), tem sido a mais estudada, visto que um grande número de trabalhos *in vivo* tem demonstrado que a PGE2 injetada perifericamente produz hiperalgesia e alodinia (sensação dolorosa induzida por um estímulo inócuo) tanto em animais experimentais quanto em humanos (FERREIRA; MONCADA; VANE, 1973).

O efeito nociceptivo da PGE2 parece estar relacionado à capacidade desse mediador para sensibilizar terminais periféricos de fibras aferentes primárias que possuem diâmetro pequeno e alto limiar. As ações biológicas de PGE2 são atribuídas à sua capacidade de interagir com os receptores EP acoplados a proteína G. Estudos sugerem que os receptores EP2, EP3 e EP4 podem mediar o efeito da PGE2 sobre a sensibilização dos nociceptores (KASSUYA et al., 2007; SMITH et al., 1998).

A estimulação dos receptores EP pode resultar na ativação de vias complexas de transdução de sinal. Estudos demonstraram que a hiperalgesia mecânica causada pela injeção periférica de PGE2 em ratos é mediada por ativação da proteína quinase A (PKA). Esta ativação levaria à fosforilação de canais iônicos e/ou modulação de estruturas citosólicas que controlam os níveis intracelulares de cálcio (Ca^{+2}). Outros trabalhos verificaram que a ativação de receptores EP por PGE2 pode ainda estimular outras proteínas cinases (PK), incluindo a proteína quinase C (PKC) que está envolvida no processo de liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares que provavelmente está relacionado à sensibilização neuronal (FERREIRA;

MONCADA; VANE, 1973; HUANG; ZHANG; MCNAUGHTON, 2006; KASSUYA et al., 2007).

O mecanismo de sensibilização neuronal pelas PGE2 além de estar associado à fosforilação de canais iônicos considerados importantes para a atividade elétrica neuronal também está associada à indução de alterações na liberação de neurotransmissores no gânglio da raiz dorsal de ratos. Nesse sentido, foi observado que, quando administrada por via intraplantar, a PGE2 sensibiliza os neurônios periféricos. Mais ainda, essa sensibilização é fortemente inibida por administração por via intraganglionar do antagonista de receptores para glutamato (GLU) tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AP-5, o que indica que a hiperalgesia induzida por injeção PGE2 desencadeia a liberação desse aminoácido no gânglio da raiz dorsal (FERRARI et al., 2014; FERREIRA; MONCADA; VANE, 1973) e que este neurotransmissor atua em receptores presentes em células satélites gliais. A interação entre neurônios e células satélites gliais será explorada em tópico seguinte.

Dessa forma, os nociceptores sensibilizados poderão ser ativados mais facilmente após uma estimulação, e devido a essa nova condição, estímulos que antes não eram capazes de ativá-los, passam fazê-lo mais intensamente. Sendo assim, o processo inflamatório pode ser associado à hipernocicepção ou hiperalgesia “dor aumentada em resposta a um estímulo que já era doloroso” (MILLAN et al., 1999; FEIN, 2011). Neste estudo é relevante ressaltar a diferença entre a nocicepção, que seria associada à sensação nociceptiva de fato, ou seja, à excitação dos neurônios e a hipernocicepção ou hiperalgesia, que seria uma ativação de mecanismos intracelulares que resultam em aumento da excitabilidade neuronal.

2.3. Sistema glutamatérgicos

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório dos sistemas nervoso central e periférico, sendo encontrado tanto em vias sensoriais nociceptivas como não-nociceptivas (KUNG et al., 2013).

Esse neurotransmissor promove suas ações através de interações com os receptores específicos classificados como receptores metabotrópicos (mGluRs) ligados a mecanismos intracelulares de transdução de sinal, via proteína G ou receptores ionotrópicos (IGluRs) ligados a um canal iônico presente na membrana celular (KUNG et al., 2013; MELDRUM, 2000).

Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. São compostos por subunidades que formam um poro central com condutância seletiva para Ca^{2+} e Na^+ (DINGLEDINE et al., 1999). Os receptores NMDA

foram estudados com certo destaque, pois diversos estudos mostraram que esses receptores estão associados ao desenvolvimento e manutenção da sensibilização dos neurônios da medula espinhal (CODERRE; MELZACK, 1992).

Uma característica distintiva do receptor NMDA é o seu bloqueio por Mg^{2+} em condições basais de potencial de membrana, condição que pode ser superada pela despolarização prévia neuronal (LAUBE; KUHSE; BETZ, 1998). Outra característica específica do receptor NMDA é a possibilidade de ser modulado farmacologicamente por influência de ligantes que se acoplam a sítios de ação diferentes do sítio para o glutamato (LAUBE; KUHSE; BETZ, 1998; MELDRUM, 2000).

Trabalhos realizados por KLECKNER; DINGLEDINE (1988), demonstram que o complexo canal-receptor NMDA requer dois agonistas diferentes para a sua ativação, glicina (GLY) e glutamato (GLU). Foi proposto que a glicina, como outros agonistas, pode induzir uma mudança conformacional no complexo canal-receptor, que é essencial para a abertura do canal ou para a ligação do glutamato.

Os receptores NMDA funcionam como conjuntos heteroméricos compostos por duas subunidades NR1 em combinação com duas ou três subunidades NR2 e/ou NR3 (SCHORGE; COLQUHOUN, 2003). A ativação do receptor NMDA ocorre em sítios de ligação nas subunidades NR1 e/ou NR3 (GLY), e em sítios na subunidade NR2 (GLU) (LIPTON, 2006) (Figura 2). A expressão da subunidade NR3A está presente em células satélites, assim como nos astrócitos e sua a presença reduz a sensibilidade de receptores NMDA ao Mg^{2+} extracelular (FERRARI et al., 2014; SASAKI et al., 2002).

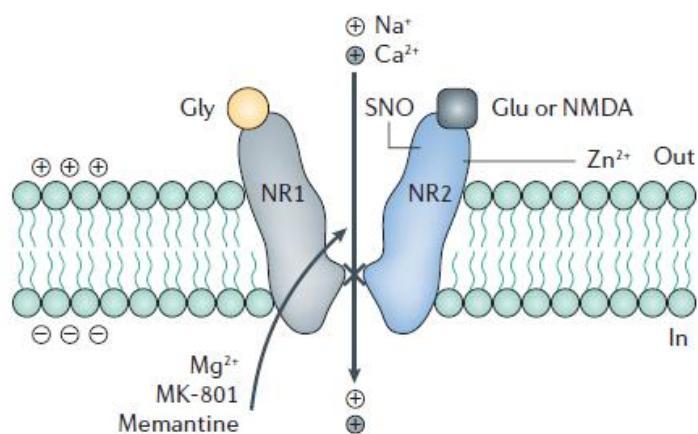


Figura 2. Sítios de ligação do receptor NMDA. Glicina (Gly) e glutamato/N-metil-D-aspartato (Glu/NMDA) ligados aos seus respectivos sítios de ligação, o local de ligação para Mg^{2+} , MK-801 está na região do poro do canal iônico. NR1 subunidade 1 do receptor NMDA; NR2 subunidade 2 do receptor NMDA Reproduzido com permissão de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Drug Discovery] (LIPTON, 2006), copyright 2006.

A transmissão glutamatérgica no sistema nervoso periférico tem sido sugerida, dado que os neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro, muitos dos quais são nociceptivos, expressam glutamato e receptores de glutamato. A ativação desses neurônios leva à liberação de glutamato em seus terminais central e periférico e por conseguinte à nocicepção (DEGROOT; ZHOU; CARLTON, 2000; GU; MACDERMOTT, 1997; MCMAHON; NICHOLLS, 1991).

Sendo assim, a dor aguda é sinalizada pela liberação de glutamato dos terminais centrais dos nociceptores, gerando correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) em neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Isto ocorre especialmente, por meio da ativação de receptores AMPA e Cainato pós-sinápticos. A soma de correntes pós-sinápticas excitatórias no neurônio pós-sináptico resulta em potencial de ação de disparo e transmissão da mensagem de dor para neurônios de ordem superior (BASBAUM et al., 2009; KUNG et al., 2013).

Nestas condições, o receptor de glutamato NMDA que se encontrava silenciado, é ativado na configuração de lesão, o aumento da liberação de neurotransmissores dos nociceptores despolarizam suficientemente os neurônios pós-sinápticos ativando os receptores NMDA quiescentes. Por conseguinte, o aumento do influxo de cálcio, via receptores NMDA fortalece as conexões sinápticas entre nociceptores e neurônios de 2º ordem da medula espinhal, agravando assim, as respostas aos estímulos nocivos (gerando hiperalgesia) (BASBAUM et al., 2009).

2.3.1. Interações entre células gliais satélites e soma neuronal nos gânglios sensoriais

Está bem estabelecido que em resposta a uma estimulação elétrica ou química o glutamato é liberado das terminações axonais central e periférica dos neurônios sensoriais primários (BASBAUM et al., 2009; DEGROOT; ZHOU; CARLTON, 2000), mas evidências sugerem que o glutamato também pode ser liberado a partir dos corpos celulares (soma) de neurônios sensoriais primários.

Inicialmente, a principal função atribuída ao corpo celular dos neurônios aferentes primários referia-se à sustentação metabólica afim de garantir a manutenção dos níveis de canais iônicos, receptores e proteínas nos terminais centrais e periféricos. Entretanto, estudos que avaliam as funções neuronais sugerem que o corpo neuronal no gânglio da raiz dorsal (GRD) possui propriedades morfológicas e fisiológicas que colocam definitivamente de lado o papel passivo atribuído ao corpo celular na trajetória da informação da periferia para o sistema nervoso central (COSTA; MOREIRA NETO, 2015).

A possibilidade de que o glutamato também seja liberado dentro do gânglio sensorial veio de estudos que demonstraram a presença de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1, 2 e 3) associados à membrana plasmática somática (BRUMOVSKY; WATANABE; HÖKFELT, 2007), a presença de proteínas necessárias à captação e reciclagem de glutamato em células gliais satélites (JASMIN et al., 2011) e a presença de receptores funcionais de glutamato no corpo celular neuronal e nas células gliais satélites (KUNG et al., 2013).

Essas observações complementam o estudo realizado por Kung et al. (2013), que revelou que a injúria no nervo ciático é acompanhada de aumento do glutamato no soma de neurônios ganglionares sensoriais, sugerindo que glutamato pode atuar localmente no gânglio e, por sua vez, ativar os receptores glutamatérgicos e alterar a excitabilidade dos neurônios ganglionares (KUNG et al., 2013).

No entanto, os corpos celulares dos neurônios sensoriais encontram-se completamente isolados em bainhas individuais de células gliais satélites (CGSs). Cada corpo celular envolto pela sua bainha de CGSs forma uma unidade morfológica e funcional. Essas unidades estão separadas da bainha perineural vizinha por regiões que contêm tecido conjuntivo (HANANI, 2005; PANNESE, 1981) (Figura 3).

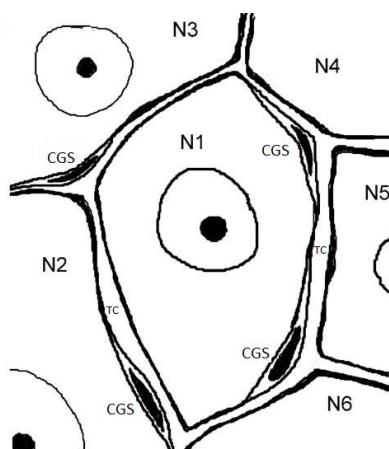


Figura 3. Diagrama esquemático da organização entre as células satélites e os corpos neuroniais no gânglio da raiz dorsal. CGS, célula glial satélite; N1-N6, corpo celular dos neurônios sensoriais; TC, tecido conjuntivo. Adaptado de HANANI (2005).

Numerosos estudos mostraram que as células gliais na maioria das regiões do sistema nervoso são mutuamente acopladas por junções comunicantes, que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas (peso molecular de até 1000 Da) (HANANI et al., 2002; ROUACH et al., 2002). Sob o microscópio eletrônico, essas junções foram vistas apenas entre as CGSs adjacentes que envolviam um único soma no GRD, não sendo encontrada entre a bainha de

CGSs e o seu soma neuronal (PANNESE, 2010). No entanto, em condições patológicas, estudos de eletrofisiologia e injeção de corantes confirmaram o acoplamento entre CGSs de bainhas perineurais vizinhas (HANANI, 2005; HANANI et al., 2002).

Vários pesquisadores questionam se essa bainha de CGSs em torno dos neurônios pode desempenhar uma função de barreira, protegendo os neurônios das substâncias circulantes. Ao contrário da barreira hematoencefálica presente no sistema nervoso central, nos gânglios sensoriais tal barreira não existe, aparentemente porque alguns dos capilares desses gânglios são fenestrados (AZZI et al., 1990; JACOBS; MACFARLANE; CAVANAGH, 1976; TEN TUSSCHER; KLOOSTER; VRENSEN, 1989).

Em trabalhos realizados por Shinder e Devor (1994) foi observado que o íon La^{3+} é capaz de penetrar o espaço existente entre CGSs e neurônios. Tais pesquisadores sugeriram que esse arranjo permite a comunicação entre os neurônios do gânglio da raiz dorsal pela difusão de neurotransmissores, que é a base proposta da excitação cruzada encontrada entre os neurônios (SHINDER; DEVOR, 1994).

Apoiando essa evidência, Zhang e colaboradores (2007) demonstraram que o ATP liberado a partir do soma neuronal é capaz de ativar os receptores P2X7 em células satélites que envolvem cada neurônio do GRD e desencadear a comunicação entre soma neuronal e células gliais. Esses pesquisadores mostraram ainda que a ativação dos receptores P2X7 pode levar à liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) a partir de células satélites. Por sua vez, o TNF α é capaz de potencializar as respostas mediadas pelo receptor P2X3 e aumentar a excitabilidade dos neurônios vizinhos no GRD (ZHANG et al., 2007).

Esse estudo corrobora com os trabalhos realizados por Ferrari et al. (2014) e fornece fortes evidências de que quando o neurônio aferente primário é estimulado química ou eletricamente, ocorre a liberação de glutamato, além da liberação de ATP. Uma vez que as CGS possuem receptor para NMDA, é possível que esses mediadores neuronais também participem da excitação cruzada entre o neurônio aferente primário e as CGS (FERRARI et al., 2014). Entretanto, o mecanismo pelo qual as células satélites ativadas por glutamato influenciam a excitabilidade neuronal e contribuem para a transmissão de estímulos dolorosos não está esclarecido.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar a participação de receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal em modelos de dor aguda e hiperalgesia, determinar os tipos de fibras nociceptivas envolvidos neste processo e avançar nos mecanismos envolvidos na comunicação entre neurônios nociceptivos primários e células satélites gliais.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração intraganglionar (L5 direito) do antagonista de receptores NMDA (AP-5) na nocicepção manifesta induzida por injeção de capsaicina na pata de ratos.
- Avaliar o efeito da desativação das fibras C sobre a sensibilidade mecânica basal e sobre o efeito do antagonista NMDA na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE2.
- Avaliar o efeito do tratamento com NMDA sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos e células satélites presentes em culturas primárias de GRD.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Uberlândia, campus Umuarama (UFU-UBERLÂNDIA), onde os animais eram mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida *ad libitum* até o dia do experimento. Os testes comportamentais foram realizados com animais pesando entre 180 e 200 g e os experimentos *in vitro*, com animais pesando de 100 a 160 g. 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 008/14).

4.2. Drogas

- Prostaglandina E2 (PGE2) (Sigma)
- NMDA (N-metil-D-aspartato) (TOCRIS) – agonista de receptores para glutamato NMDA (NMDARs).
- D-AP-5 (2-amino-5-phosphovalerate) (TOCRIS) - antagonista competitivo de NMDAR.
- Capsaicina (Sigma)
- DiBAC₄(3) (Invitrogen)

4.3. Administração de drogas

Nos testes comportamentais, as drogas foram administradas por três vias diferentes: via intraplantar (i.pl.), via intratecal (i.t.) ou via intraganglionar (i.gl.).

4.3.1. Administração intraplantar (i.pl.)

As drogas foram injetadas na pata traseira dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa e inserida no meio da pata, entre as cinco calosidades distais. As injeções foram realizadas utilizando um volume de 50 µl (PARADA et al., 2003).

4.3.2. Administração intratecal (i.t.) de drogas através do método direto

Primeiramente os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) e, em seguida realizou-se a tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas. Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que

sua região lombar ficasse hiperfletida. O método de injeção intratecal foi realizado de acordo com o trabalho publicado por Mestre et al., (MESTRE et al., 1994). Uma agulha BD Ultra-Fine® (29G) de seringa para insulina 50 unidades foi inserida no espaço subaracnóide, perfurando a região medial entre as vértebras L5-L6 (± 1) em ângulo de aproximadamente 45°, e um volume de 10 μL foi injetado (Figura 4). A correta localização da punção no espaço subaracnóide foi verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal. Após a injeção, a agulha foi mantida por alguns segundos em posição antes de sua cuidadosa retirada, para evitar o refluxo da solução injetada.

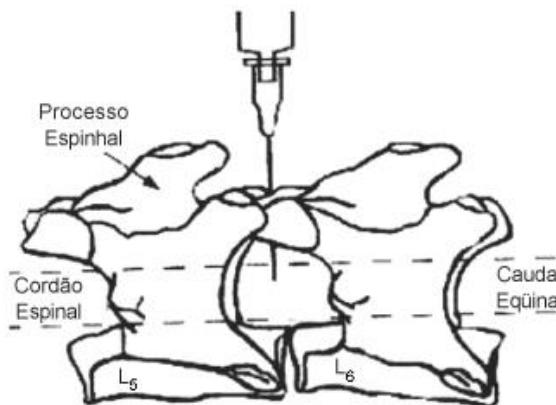


Figura 4. Injeção intratecal. Inserção da agulha no espaço subaracnóide na região medial entre as vértebras L5-L6. Adaptado de Mestre et al. (1994).

4.3.3. Administração de drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal (i.gl.)

Para a inoculação de drogas no gânglio da raiz dorsal (GRD) foi utilizado o método de injeção direta no quinto GRD lombar (GRD-L5) descrito por (FERRARI et al., 2007). De acordo com o pesquisador, 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. (FERRARI et al., 2007). O método de injeção direta no GRD, permite a verificação dos 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.

Devido ao pequeno tamanho do gânglio, volumes acima de 5 μL são passíveis de extravasar e permear estruturas adjacentes ao gânglio. Dessa maneira, para que o volume de 5 μl pudesse ser administrado sem o risco de permear estruturas adjacentes ao gânglio, 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 $1\mu\text{l}$ de solução. O cateter foi conectado a uma agulha gengival (Dentbras, 30G curta), e, em sua outra extremidade, a uma seringa de vidro (Figura 5A). Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados por via inalatória por isoflurano 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 (Figura 5B). 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 transverso da quinta vértebra lombar.

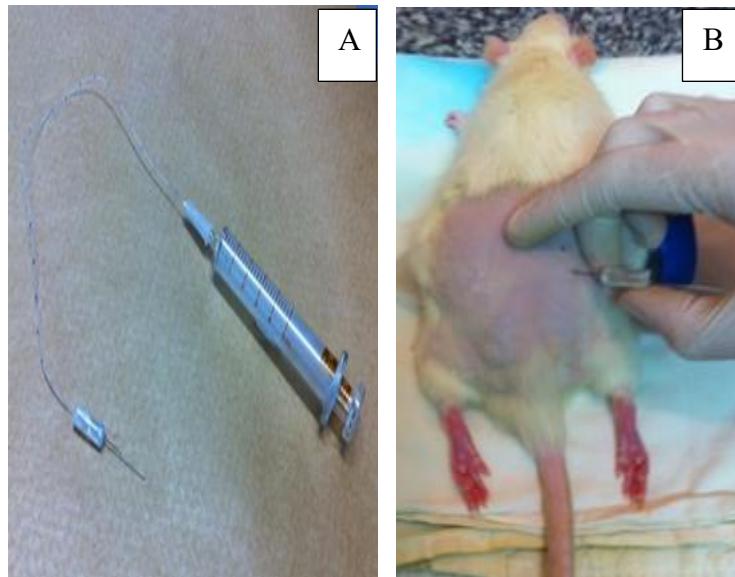


Figura 5. Injeção intraganglionar. A: material utilizado para a realização do teste (agulha gengival-cateter-seringa de vidro). B: rato anestesiado recebendo a droga via i.g.

4.4. Testes comportamentais

4.4.1. Teste da capsaicina

O teste da capsaicina foi proposto por Sakurada et al. (1992), para o estudo de compostos que atuam sobre a dor neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídios envolvidos na transmissão dolorosa. Foi demonstrado que a capsaicina induz a nocicepção durante um período de 5 minutos, começando imediatamente após a injeção e desaparecendo completamente aos 10 minutos. Considerando que a capsaicina ativa seletivamente as fibras C (CATERINA; JULIUS, 2001), este teste foi utilizado para avaliar a participação de tais fibras na liberação de glutamato no gânglio da raiz dorsal. Sendo assim, nessa pesquisa 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 foi realizada após 30 minutos da injeção intraganglionar do antagonista do receptor NMDA AP-5 (9 μ g diluído em 5 μ L de salina). No grupo controle realizou-se a administração intraganglionar de veículo (5 μ L de salina) e injeção intraplantar subcutânea de 50 μ L contendo 10 μ g de capsaicina após 30 minutos a administração i.g. de salina. Nos dois grupos experimentais os ratos foram observados por 5 minutos e foram registrados o número de vezes que o animal sacudiu a pata afetada.

4.4.2. Hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E2 (PGE2)

Este experimento foi realizado para avaliar se a sensibilidade mecânica basal e a sensibilidade mecânica após injeção de PGE2 dependem da ativação de fibras C. Para isso os animais receberam ao nível da cintura pélvica 10 μ g de capsaicina em um volume de 10 μ L. A capsaicina por via intratecal destrói seletivamente as fibras C de forma a manter apenas o efeito dependente das fibras A δ . Para avaliar se a injeção intratecal de capsaicina foi capaz de desativar as fibras C foi avaliada a sensibilidade dos animais tratados à injeção intraplantar de capsaicina.

Nesse experimento os animais foram separados em quatro grupos compostos por seis animais:

- **PGE2:** Os animais receberam por via i.pl. 100 ng de PGE2 e os testes comportamentais para avaliação da hipernocicepção mecânica foram realizados 1, 2 e 3 horas após a administração de PGE2. O teste comportamental utilizado foi o Randall & Selitto (RANDALL; SELITTO, 1957), um método para avaliação da hipernocicepção bastante utilizado. Para a execução deste teste utiliza-se equipamento apropriado denominado

analgesímetro (Ugo-Basile, Stoelting, Chicago, IL), que gera aumento linear da força (em gramas) sobre a superfície dorsal da pata do animal, até que o mesmo produza uma resposta caracterizada pela retirada da pata. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A força necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas. O LNRP foi avaliado antes e após a administração de PGE2. Para reduzir o stress, os ratos foram habituados ao equipamento 1 dia antes da execução dos experimentos.

- **PGE2 + AP-5 + Capsaicina intratecal:** Para destruir os terminais centrais dos aferentes que expressam TRPV1, os 6 animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg). Os ratos receberam ao nível da cintura pélvica 10 µg de capsaicina em um volume de 10 µL. Após 7 dias os ratos receberam por via i.pl. 100 ng de PGE2 e 2 horas após o estímulo inflamatório receberam por via intraganglionar 9 µg de AP-5 diluído em 5µL de salina. O teste comportamental Randall & Selitto foi realizado 1 hora após a administração i.gl. de AP-5.
- **PGE2 + AP-5:** Os animais receberam por via i.pl. 100 ng de PGE2 e 2 horas após o estímulo inflamatório receberam por via intraganglionar 9 µg de AP-5 diluído em 5µL de salina. O teste comportamental Randall & Selitto foi realizado 1 hora após a administração i.gl. de AP-5.
- **PGE2 + Capsaicina intratecal:** Após serem anestesiados, os animais receberam ao nível da cintura pélvica 10 µg de capsaicina em um volume de 10 µL. Após 7 dias os ratos receberam por via i.pl. 100 ng de PGE2. O teste comportamental Randall & Selitto foi realizado 3 horas após a administração i.pl. de PGE2.

4.5. Microscopia confocal

4.5.1. Cultura primária do gânglio da raiz dorsal

Ratos Wistar foram anestesiados em ambiente saturado com Isoflurano e eutanasiados por decaptação. As culturas foram realizadas conforme protocolo descrito por LINHART et al. (2003). Pele e músculos que recobrem a região dorsal do animal foram removidos de modo a expor os ossos da coluna vertebral. As vértebras foram então removidas para expor a medula espinhal do animal. Com o auxílio de uma pinça as raízes da medula foram expostas e os gânglios ligados a essas raízes foram retirados. Os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução

salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37°C por 75 minutos em solução salina de Hank's contendo 0,28 U/ml de colagenase (tipo 2, Sigma) e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de streptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente e contadas em "trypan blue" para determinar a viabilidade celular. As células foram cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com o mesmo meio de cultura já descrito, e utilizadas após 24 horas.

4.5.2. Avaliação do potencial de membrana neuronal

As culturas primárias de gânglios sensoriais foram realizadas em placas contendo uma lamínula de vidro aderida ao fundo para permitir a visualização por microscopia confocal. As placas foram lavadas com solução Hank's contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) e incubadas com 5 mM do indicador de potencial de repouso DiBAC₄ (3) (Invitrogen) por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. O indicador é uma molécula que possui carga global negativa e sua difusão pela membrana celular, de acordo com o gradiente eletroquímico, determina a fluorescência emitida. O DiBAC₄(3) penetra pela membrana em células despolarizadas sendo que a ligação com proteínas intracelulares induz aumento de fluorescência desta molécula. Desta forma, um aumento de fluorescência indica despolarização, enquanto que uma diminuição indica hiperpolarização da membrana celular. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Os dados foram mostrados como ($\Delta F/F_0$), ou seja, a variação de intensidade de fluorescência ($\Delta F=F-F_0$) dividida pela fluorescência basal (F_0) de forma a normalizar as variações de concentração do indicador fluorescente nas células.

Nesse experimento os tratamentos foram separados da seguinte forma:

- Controle: administração de veículo (Hanks) e após 5 minutos administração de capsaicina (100 nM).
- Tratado com glicina: administração de glicina (10 μ M) e após 5 minutos administração de capsaicina (100 nM).
- Tratado com NMDA: administrou-se glicina (10 μ M), após 2 minutos administrou-se NMDA (250 μ M) e 10 minutos após administrou-se capsaicina (100 nM).

- Tratado com AP-5: administrou-se glicina (10 μ M), após 2 minutos administrou-se AP-5 (200 μ M) e 10 minutos após administrou-se capsaicina (100 nM).

Foi realizada uma sequência de fotos logo após cada administração e, posteriormente as imagens foram analisadas no ImageJ onde quantificou-se a fluorescência emitida do neurônio em cada momento.

4.6. Forma de análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita pelo Teste t ou Anova duas vias realizadas por software SigmaPlot. Quando o nível de significância indicou diferença estatística entre as médias testadas utilizou o Teste Bonferroni para comparar os tratamentos. O nível de significância foi de $p<0,05$. A análise das imagens da cultura primária do gânglio da raiz dorsal foi feita utilizando o software ImageJ (NIH).

5. RESULTADOS

5.1. Participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por capsaicina

No experimento *in vivo* para avaliação do efeito da administração intraganglionar (L5 direito) do antagonista de receptores NMDA (AP-5) na nocicepção induzida por injeção de capsaicina na pata de ratos, foi observado que os animais tratados com AP-5 (i.g.l.) apresentaram uma diminuição da resposta nociceptiva (35 ± 4 sacudidas) em relação aos animais controles, que receberam solução salina via injeção intraganglionar (76 ± 10 sacudidas) (Figura 6).

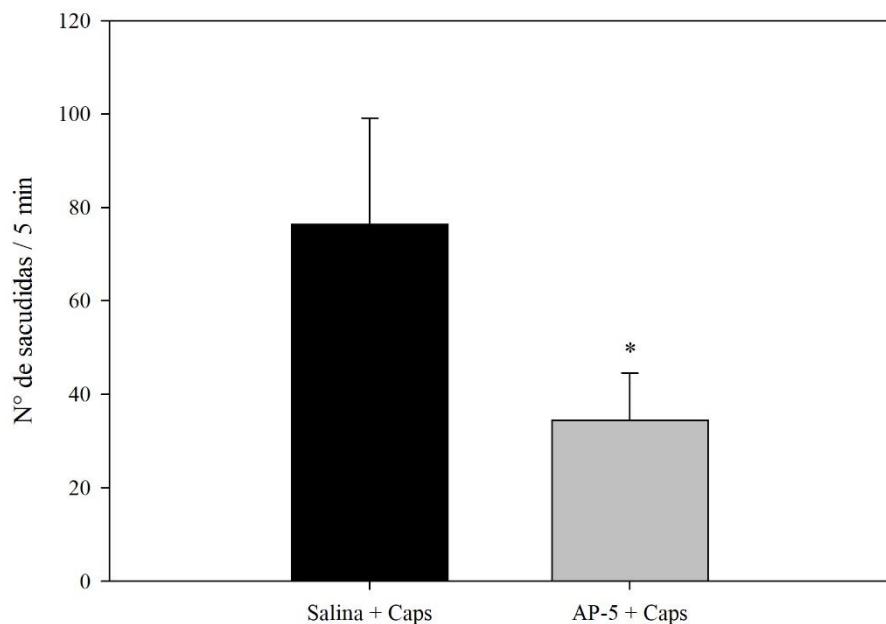


Figura 6. Teste de nocicepção induzida por capsaicina. Salina (5 μ l) ou AP-5 (9 μ g em 5 μ l) foram administrados por via intraganglionar (L5 ipsilateral) 30 minutos antes da injeção intraplantar de capsaicina (10 μ g/50 μ l). O comportamento nociceptivo registrado foi o número de sacudidas (flinches) observados durante 5 minutos. Dados mostrados como média e erro padrão da média (n = 6). * Difere do grupo controle (teste t, $p < 0,05$).

5.2. Participação de fibras C e de receptores NMDA na hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E2 (PGE2)

Utilizando o teste de sensibilidade mecânica de Randall-Selitto, observamos que a administração de antagonista de receptores NMDA por via intraganglionar ou a inativação de fibras C por injeção intratecal de capsaicina não alteram o limiar de sensibilidade mecânica basal dos animais (Figura 7). Por outro lado, a hipernocicepção inflamatória induzida por PGE2 foi reduzida nos animais tratados com AP-5 por via intraganglionar em relação aos controles, sendo que a injeção de AP-5 (i.g.l.) ou administração prévia de capsaicina (i.t.) reduziram a sensibilização induzida por prostaglandina E2 (Figura 8). Para garantir que os animais tratados com capsaicina por via intratecal tiveram os terminais que expressam TRPV1 destruídos, foi

realizado o teste de capsaicina por via intraplantar (dados não mostrados). Nestes animais, foi observada uma redução quase total na resposta comportamental à injeção de capsaicina.

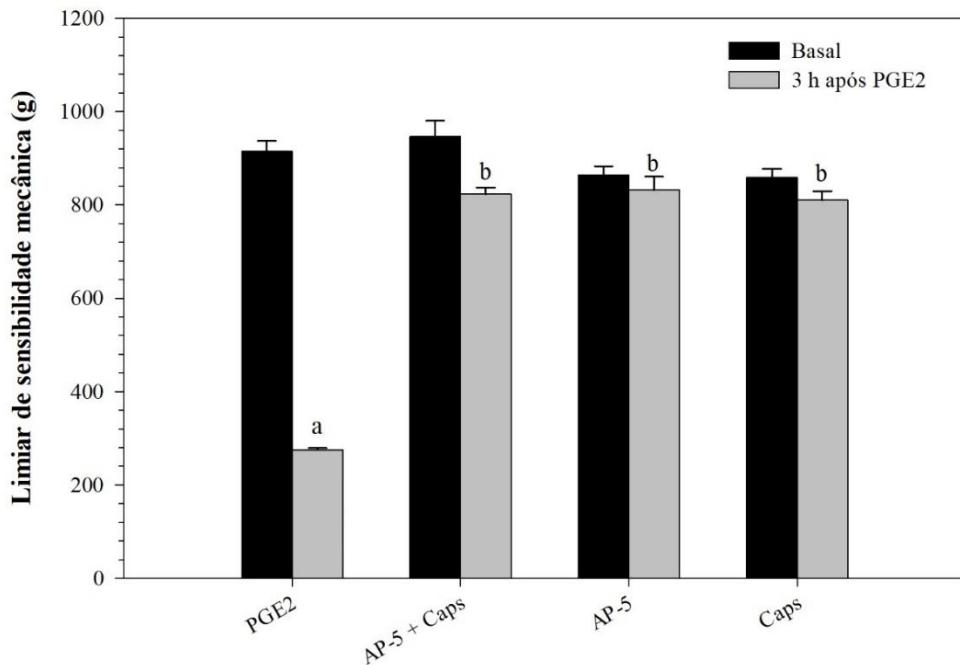


Figura 7. Resposta nociceptiva a prostaglandina E2 em ratos TRPV1- destruído e TRPV1-intacto tratados com AP-5 ou salina (controle). A administração de antagonista de receptores NMDA por via intraganglionar ou a inativação de fibras C por injeção intratecal de capsaicina não alteram o limiar de sensibilidade mecânica basal dos animais. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras de erros representam o erro padrão da média ($n = 6$).

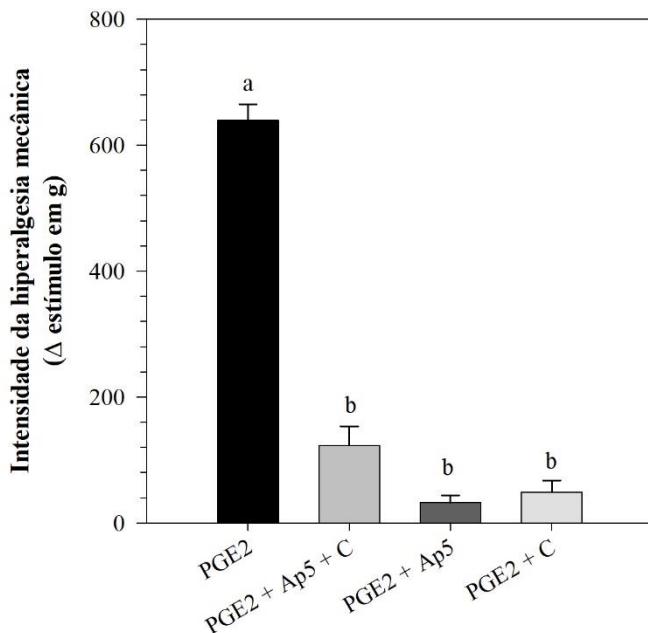


Figura 8. Avaliação da hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E2 – papel dos receptores NMDA e fibras C. Intensidade da hiperalgesia mecânica foi avaliada em ratos tratados com capsaicina via intratecal (10 µg de capsaicina em um volume 10 µl, sete dias antes da injeção intraplantar de prostaglandina E2 (100ng)), em ratos tratados com AP-5 (9 µg em 5 µl duas horas após a injeção intraplantar de prostaglandina E2) ou em ratos que receberam os tratamentos combinados, capsaicina por via intratecal e AP-5 por via intraganglionar duas horas após a injeção intraplantar de prostaglandina E2. O limiar mecânico de todos os grupos foi avaliado 3 h após a injeção intraplantar de prostaglandina E2 pelo teste Randall-Selitto. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Barras de erros representam o erro padrão da média ($n = 6$).

5.3. Avaliação do efeito do tratamento com NMDA sobre o potencial de repouso em neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal.

Para avaliar o efeito da ativação de receptores NMDA sobre a excitabilidade neuronal, foi avaliado o potencial de repouso através do uso do indicador fluorescente DiBAC₄(3). A presença deste indicador no meio resulta em um aumento de fluorescência celular quando ocorre uma despolarização ou diminuição no caso de hiperpolarização. Observamos um aumento de fluorescência, ou seja, despolarização neuronal imediatamente após a administração de NMDA (250 µM) à cultura - na presença de glicina (10 µM) em solução tampão com Mg²⁺ (Figura 9). O aumento da fluorescência também foi observado em culturas em que foi adicionado somente glicina (Figura 10).

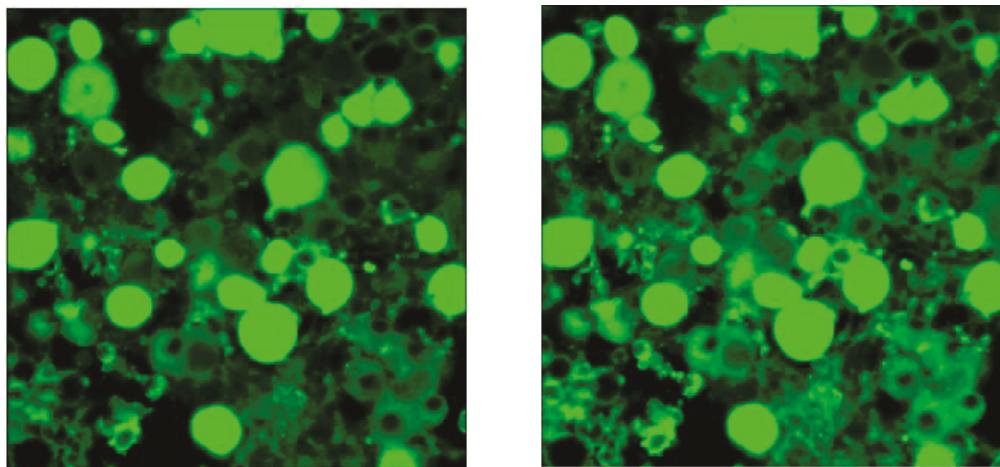


Figura 9. Efeito do tratamento com NMDA (250 μ M) em culturas primárias de GRD (24 h) na presença de Mg^{2+} sobre o potencial de repouso neuronal. À esquerda: Fluorescência basal. À direita: Fluorescência observada nas mesmas células após administração de NMDA (250 μ M).

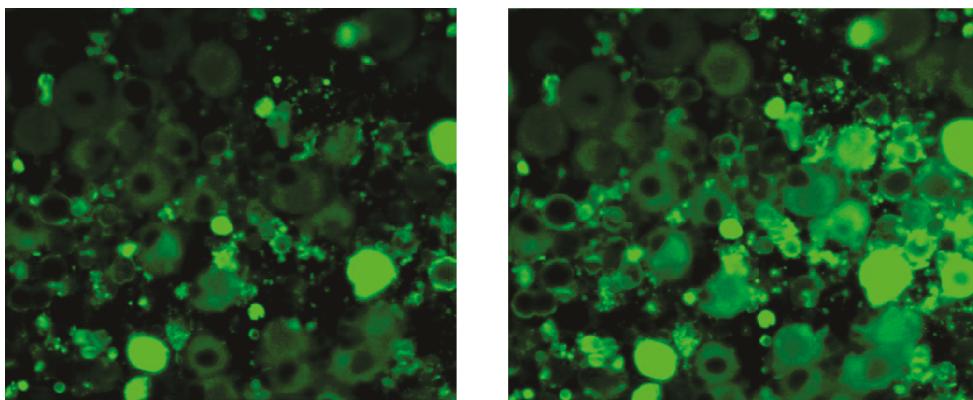


Figura 10. Efeito do tratamento com glicina (10 μ M) sobre o potencial de repouso neuronal em culturas primárias de GRD (24 h) na presença de Mg^{2+} . Imagem esquerda: Fluorescência basal. Imagem direita: Fluorescência observada nas mesmas células após administração de glicina (10 μ M).

Como podemos observar através das imagens, tanto a administração de NMDA quanto de glicina resulta em aumento de fluorescência em praticamente todos os neurônios presentes.

As imagens de cultura primária de GRD obtidas através de microscopia confocal utilizando DiBAC₄(3) em solução tampão com Mg^{2+} (0,9 mM) ou sem Mg^{2+} , foram analisadas no ImageJ onde quantificou-se a fluorescência emitida por cada neurônio ao longo do tempo (Figura 11). Para quantificação foram considerados apenas os neurônios que responderam a uma administração posterior de capsaicina (100 nM). A administração de capsaicina foi utilizada como controle positivo para detectar neurônios nociceptivos que estavam viáveis na cultura (dados não mostrados). Os resultados mostraram que a adição de NMDA após 2 minutos da administração de glicina levou a despolarização no potencial de repouso. A administração

do co-agonista glicina também induziu um aumento de fluorescência, porém com uma resposta de intensidade menor comparada à cultura em que foi adicionado o NMDA (Figura 11). Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC₄(3) induzida por NMDA (250 μ M) em culturas primárias de GRD de 24 h na presença ou ausência de Mg²⁺. (A) Aumento máximo de fluorescência induzida por NMDA (250 μ M) na presença do co-agonista glicina (10 μ M), aumento máximo de fluorescência induzida por glicina sozinha ou na presença de D-AP-5 (200 μ M). (B) Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC₄(3) induzida por NMDA (250 μ M) em solução sem Mg²⁺. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$). * Difere significativamente do controle (teste t, $p < 0,05$). Barras de erro representam o erro padrão da média ($n = 10$ células em A e 16 células em B). Por outro lado, o efeito da administração de glicina foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento com antagonista de receptores NMDA, AP-5 (200 μ M) (Figura 11A). O efeito do NMDA sobre a cultura de GRD em solução tampão sem Mg²⁺ também resultou em despolarização (Figura 11B).

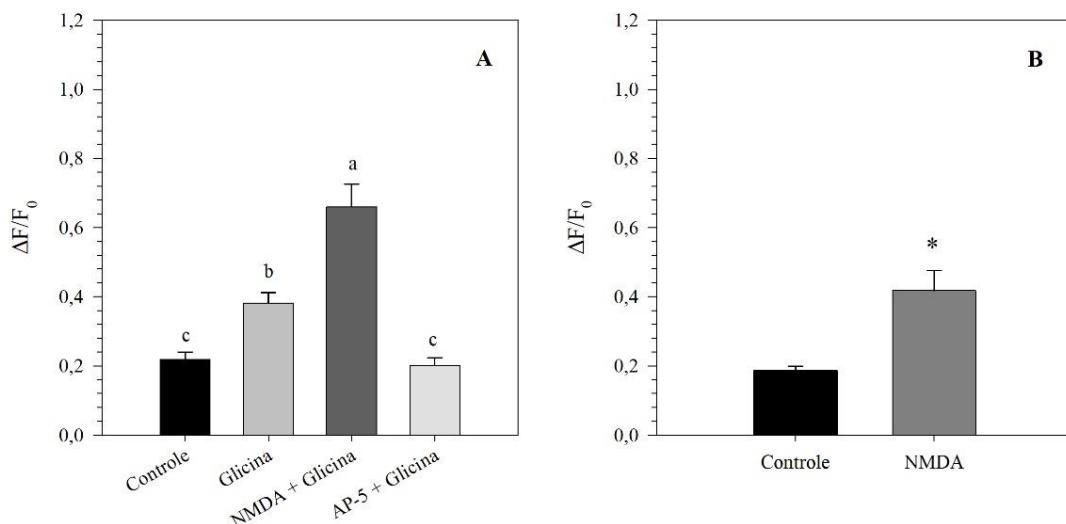


Figura 11. Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC₄(3) induzida por NMDA (250 μ M) em culturas primárias de GRD de 24 h na presença ou ausência de Mg²⁺. (A) Aumento máximo de fluorescência induzida por NMDA (250 μ M) na presença do co-agonista glicina (10 μ M), aumento máximo de fluorescência induzida por glicina sozinha ou na presença de D-AP-5 (200 μ M). (B) Alterações da fluorescência emitida pelo indicador de potencial de repouso DiBAC₄(3) induzida por NMDA (250 μ M) em solução sem Mg²⁺. Tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Bonferroni ($p < 0,05$). * Difere significativamente do controle (teste t, $p < 0,05$). Barras de erro representam o erro padrão da média ($n = 10$ células em A e 16 células em B).

6. DISCUSSÃO

No estudo publicado por Ferrari e col. (2014) evidencia-se a participação de receptores NMDA presentes em células satélites do gânglio da raiz dorsal na manutenção da hiperalgesia induzida por prostaglandina E2. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a participação de células satélites ocorre no processamento da dor e não somente na hiperalgesia.

Inicialmente, foi avaliado o efeito da administração intraganglionar do antagonista de receptor NMDA (AP-5) no teste da capsaicina. Neste teste, administra-se capsaicina na pata e avalia-se a resposta comportamental nociceptiva, chacoalhar e lamber a pata, durante 5 minutos. Após este tempo, os animais também desenvolvem hiperalgesia mecânica (não mostrado). A ideia inicial seria testar se os receptores NMDA no GRD estariam envolvidos no processo de hiperalgesia e não na nociceção. Surpreendentemente, observamos que a administração de AP-5 no GRD (L5) inibiu a dor aguda, ou nociceção, induzida por capsaicina (Figura 6). Considerando que a capsaicina ativa os neurônios sensoriais aferentes primários através de ação direta sobre o receptor TRPV1 altamente expresso por um subconjunto de nociceptores de fibra C e que este receptor é um canal iônico que promove despolarização e excitação direta dos neurônios, esse resultado sugere, portanto, que a ativação de fibras C parece estar envolvida na liberação de glutamato no GRD seguido da ativação de receptores NMDA, possivelmente em células satélites no GRD.

A participação dos receptores NMDA periféricos em processos dependentes de ativação de fibras C poderia explicar o fato da administração do antagonista NMDA inibir a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE2. Isto porque é sabido que as fibras C são as principais fibras sensibilizadas por este prostanoide (AHLGREN; WANG; LEVINE, 1997). Para testar esta hipótese, avaliamos o efeito da administração de prostaglandina E2 sobre a sensibilidade mecânica em animais que tiveram as fibras C seletivamente inativadas através da administração intratecal de capsaicina (Figura 7). Verificamos que a administração de capsaicina intratecal foi capaz de inibir o efeito da administração intraplantar de PGE2 (Figura 8). É provável que essa falta de resposta à PGE2 em animais pré-tratados com capsaicina seja devido à perda de sinalização dependente de fibras C. Nesse experimento também confirmamos que o antagonista do receptor NMDA, AP-5, administrado diretamente no gânglio da raiz dorsal foi capaz de inibir o efeito da administração intraplantar de PGE2. Por outro lado, tanto a administração de AP-5 quanto a inativação de fibras C por injeção intratecal de capsaicina não alteram a sensibilidade mecânica basal dos animais. Isto indica que a sensibilidade basal não depende da ativação de fibras C, devendo, provavelmente, ocorrer por ativação de fibras A δ ou A β . Este resultado explica o motivo de no trabalho anterior (FERRARI et al., 2014) termos considerado

que os receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal participam apenas da hiperalgesia inflamatória.

Esses resultados sugerem que durante um evento nociceptivo o glutamato é liberado no GRD a partir do neurossoma de neurônios associados a fibra C. Estudos de outros autores corroboram com esta ideia, uma vez que transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT), os quais são responsáveis pela absorção do aminoácido excitatório em vesículas sinápticas, já foram identificados no soma de neurônios de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (KUNG et al., 2013). De fato, em trabalhos realizados por Hwang et al. (2004), foi relatado que após a lesão nervosa há um aumento da liberação de glutamato no GRD a qual é acompanhada pelo aumento do transportador vesicular VGLUT2 em neurônios ganglionares de pequeno diâmetro. Os autores citados também afirmam que existe no GRD de ratos uma relação considerável de TRPV1, o receptor de capsaicina, com VGLUT2.

Estudos *in vitro* detectaram ativação de neurônios nociceptivos por glutamato ou NMDA (KUNG et al., 2013), no entanto, estudo anterior de nosso grupo usando culturas primárias de gânglio da raiz dorsal (FERRARI et al., 2014) verificou influxo de cálcio apenas em células satélites gliais após ativação com glutamato ou NMDA. De fato, nos parece mais provável que o glutamato liberado por um neurônio no GRD não consiga atingir outro neurônio nociceptivo, já que as células satélites envoltas no soma do neurônio possuem transportadores de glutamato, assim como os astrócitos no sistema nervoso central, captando rapidamente o glutamato presente no meio extracelular e o convertendo em glutamina (KUNG et al., 2013). Entretanto, é possível que a liberação de glutamato funcione como uma forma de comunicação entre neurônios e células satélites, assim como verificado na hipernocicepção inflamatória (FERRARI et al., 2014).

Embora não possamos descartar completamente a participação de receptores NMDA nos neurônios sensoriais durante os processos nociceptivos estudados, as características das respostas condizem melhor com a atuação do glutamato nas células satélites e não nos neurônios. Isso porque os receptores NMDA neuronais encontram-se bloqueados por um “plug” de Mg^{2+} (LAUBE; KUHSE; BETZ, 1998) que só é liberado quando ocorre uma despolarização, em geral por ativação de receptores do tipo AMPA. Todavia, estudos anteriores demonstraram que a injeção do antagonista do receptor AMPA DNQX no gânglio da raiz dorsal não altera a hipernocicepção induzida por injeção i.pl. de PGE2, embora a administração intratecal deste antagonista tenha inibido esta resposta (FERRARI et al., 2014). Como sugerido nesse estudo, os receptores ganglionares AMPA, em contraste com aqueles que se expressam

pós-sinapticamente no corno da raiz dorsal, não parecem estar envolvidos na sensibilização do neurônio sensitivo primário (FERRARI et al., 2014).

Experimentos de imagem de transientes de Ca^{2+} intracelular em cultura primária de GRD revelaram que os receptores NMDA são ativados apenas em células satélites, sendo que nessas células esses receptores não são sensíveis ao bloqueio por Mg^{2+} (FERRARI et al., 2014). Portanto, sugerimos que esses receptores possam ser prontamente ativados independentemente do potencial negativo (~ -80 mV) da membrana dessas células satélites. De fato, a expressão da subunidade NR3A está presente em células satélites, assim como nos astrócitos e sua a presença reduz a sensibilidade de receptores NMDA ao Mg^{2+} extracelular (FERRARI et al., 2014; SASAKI et al., 2002).

Experimentos realizados anteriormente pelo nosso grupo, ainda não publicados, mostraram que as células satélites apresentam oscilações de cálcio na presença de neurônios e que estas oscilações são inibidas pela administração do antagonista do receptor NMDA, AP-5. Todavia, estas oscilações não ocorrem nas culturas de células satélites isoladas, mostrando que a presença dos neurônios é necessária para que haja liberação de glutamato no meio extracelular. Portanto, na cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal parece ocorrer uma liberação basal de glutamato, o qual ativa receptores NMDA nas células satélites presentes.

Considerando que o receptor NMDA é um canal permeável a cálcio e que apenas as células satélites gliais responderam com aumento de cálcio intracelular durante administração de NMDA em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal (FERRARI et al., 2014), podemos concluir que, pelo menos em nossas condições experimentais, a administração de NMDA está ativando estas células gliais e não os neurônios sensoriais.

Os resultados obtidos no desenvolvimento deste projeto indicam que a interação entre neurônios e células satélites ocorre de forma rápida, no processamento da dor aguda. Deste modo, o efeito das células satélites sobre a atividade neural deve se dar de forma rápida também. Para testar o efeito da ativação de receptores NMDA, presentes em células gliais, na excitabilidade neural, decidimos avaliar o efeito da administração de NMDA sobre o potencial de repouso em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal utilizando o indicador molecular DIBAC₄₍₃₎. Através destes experimentos observamos que a administração de NMDA induziu uma despolarização em praticamente todos os neurônios presentes, o que refletiu em um aumento na fluorescência observada na cultura de GRD (Figura 9). Este resultado é interessante por indicar um mecanismo pelo qual as células satélites ativadas pelo glutamato atuam na dor e na sensibilização neural. Os resultados indicam que a ativação de receptores NMDA nas células satélites induz uma possível liberação de mediador por estas células de forma que este

despolarize neurônios próximos. Processo semelhante, que foi denominado excitação cruzada, foi verificado por Amir e Devor (2003) em experimentos eletrofisiológicos. Os autores relataram que neurônios do GRD são transientemente despolarizados quando neurônios vizinhos do mesmo gânglio são estimulados repetidamente. Nossos resultados corroboram com este processo de excitação cruzada e sugerem a participação de glutamato, receptores NMDA e células satélites gliais neste processo (Figura 12). Os mecanismos pelos quais as CGS ativadas por glutamato interferem no potencial de repouso neuronal, entretanto, ainda não estão determinados.

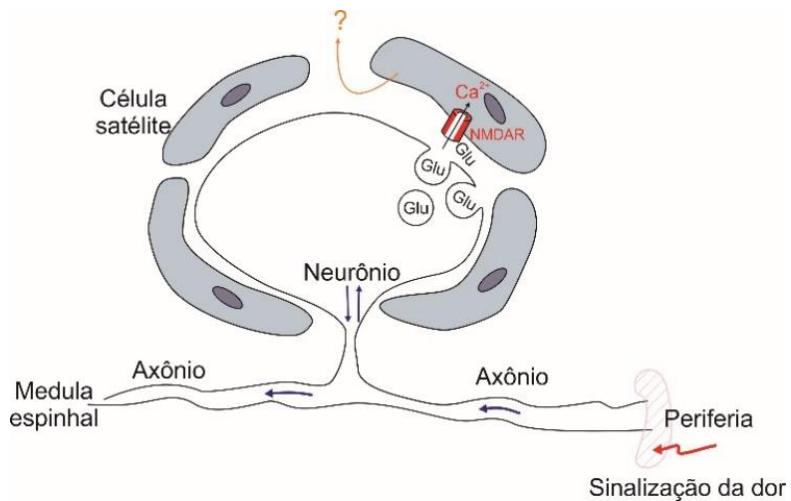


Figura 12. Diagrama esquemático ilustra a liberação de glutamato a partir do soma do GRD após a estimulação do terminal periférico. Adaptado de (GU et al., 2010)

As CGS podem liberar uma série de mediadores e neurotransmissores, incluindo citocinas, ATP e prostanoïdes (para revisão HANANI, 2005). Resultados anteriores indicam que a prostaglandina não causa liberação de mais prostanoïdes no gânglio da raiz dorsal, uma vez que o anti-inflamatório inibidor de ciclooxygenase (COX), indometacina, não afetou a hiperalgesia induzida pela administração intraganglionar de NMDA (FERRARI et al., 2014), indicando que o efeito de NMDA em células GRD não depende da ativação de COX e liberação adicional de prostaglandinas. O efeito da administração de NMDA em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal sobre a despolarização neuronal é um resultado importante por sugerir um mecanismo de ação para a interação neurônio/glia e também por viabilizar a investigação do mediador liberado pelas células satélites que atuaria nos neurônios sensitivos primários.

Em resumo, no estudo publicado anteriormente (FERRARI et al., 2014) foi sugerido que os receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal participariam da manutenção da sensibilização inflamatória. Nossos resultados, no entanto, indicam que estes receptores devem,

de fato, estar envolvidos em um processamento que envolve preferencialmente a ativação de fibras do tipo C. Além disso, verificamos que a ativação de células gliais satélites por glutamato, via receptores NMDA, resulta em despolarização neuronal, alterando, portanto, a excitabilidade destas células e sugerindo um mecanismo pelo qual as células satélites gliais participam do processamento do sinal nociceptivo no gânglio da raiz dorsal.

Considerando que o gânglio da raiz dorsal não apresenta barreira hemato-neural, a participação de receptores NMDA periféricos no processamento da dor abre novas possibilidades terapêuticas que, possivelmente, apresentem poucos efeitos adversos. Antagonistas de receptores NMDA, especialmente a ketamina, tem sido bastante utilizada na clínica como anestésicos e analgésicos. No entanto, os efeitos adversos dependentes dos efeitos centrais do bloqueio de receptores NMDA restringem o uso de tais fármacos. O desenvolvimento de antagonistas de ação preferencialmente periférica, que não atravessem a barreira hemato-neural, pode propiciar um efeito analgésico com reduzidos efeitos adversos.

7. CONCLUSÃO

Receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal estão envolvidos na dor aguda induzida por capsaicina, sugerindo a participação de receptores NMDA em células satélites gliais no processamento da dor aguda envolvendo fibras do tipo C.

Inativação seletiva de fibras C por injeção de capsaicina não alteram a sensibilidade mecânica basal, mas impede a sensibilização induzida por prostaglandina E2, um processo dependente de ativação de receptores NMDA ganglionares.

A ativação de receptores NMDA em células satélites gliais em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal induzem uma depolarização no potencial de repouso neuronal, sugerindo um mecanismo pelo qual a ativação de receptores NMDA gliais influencia na excitabilidade neural e, portanto, na transmissão do sinal nociceptivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlgren, S. C.; Wang, J. F.; Levine, J. D. C-fiber mechanical stimulus-response functions are different in inflammatory versus neuropathic hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*, v. 76, n. 1, p. 285–90, jan. 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00290-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00290-4)

Amir, R.; Devor, M. Electrical excitability of the soma of sensory neurons is required for spike invasion of the soma, but not for through-conduction. *Biophysical journal*, v. 84, n. 4, p. 2181–2191, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75024-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75024-3)

Azzi, G. et al. Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins G. *Biology of the cell*, v. 68, n. 1, p. 31–6, 1990.
<https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1990.tb00890.x>

Basbaum, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

Bessou, P.; Perl, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of neurophysiology*, v. 32, n. 6, p. 1025–1043, 1969.

Brumovsky, P.; Watanabe, M.; Hökfelt, T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience*, v. 147, n. 2, p. 469–490, 29 jun. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.068>

Caterina, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 1997.
<https://doi.org/10.1038/39807>

Caterina, M. J.; Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 487–517, mar. 2001.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>

Coderre, T. J.; Melzack, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 12, n. 9, p. 3671–5, 1 set. 1992.

Cortright, D. W.; Szallasi, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1: An update. European Journal of Biochemistry, v. 271, n. 10, p. 1814–1819, 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04082.x>

Degroot, J.; Zhou, S.; Carlton, S. M. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. Neuroreport, v. 11, n. 3, p. 497–502, 28 fev. 2000.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200002280-00014>

Dingledine, R. et al. The glutamate receptor ion channels. Pharmacological reviews, v. 51, n. 1, p. 7–61, mar. 1999.

Ferrari, L. F. et al. A novel technique to perform direct intraganglionar injections in rats. Journal of Neuroscience Methods, v. 159, n. 2, p. 236–243, 30 jan. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.025>

Ferrari, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 111, n. 51, p. 18363–8, 2014.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1420601111>

Ferreira, S. H.; Moncada, S.; Vane, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. British Journal of Pharmacology, v. 49, n. 1, p. 86–97, 1973.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08270.x>

Gu, J. G.; Macdermott, A. B. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. Nature, v. 389, n. 6652, p. 749–753, 16 out. 1997.
<https://doi.org/10.1038/39639>

Gu, Y. et al. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. Neuron glia biology, v. 6, n. 1, p. 53–62, 2010.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000116>

Hanani, M. et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. Neuroscience, v. 114, n. 2, p. 279–283, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00279-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00279-8)

Hanani, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Research Reviews*, v. 48, n. 3, p. 457–476, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>

Harper, A. A.; Lawson, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology*, v. 359, p. 31–46, 1985.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015573>

Holzer P. Capsaicin: cellular selectivity targets, for thin mechanisms of action, sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 2, p. 143–201, 1991.

Huang, J.; Zhang, X.; Mcnaughton, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*, v. 4, n. 3, p. 197–206, 2006.
<https://doi.org/10.2174/157015906778019554>

Hwang, S. J. et al. Vanilloid receptor VR1-positive primary afferents are glutamatergic and contact spinal neurons that co-express neurokinin receptor NK1 and glutamate receptors. *Journal of Neurocytology*, v. 33, n. 3, p. 321–329, maio 2004.
<https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000044193.31523.a1>

Jacobs, J. M.; Macfarlane, R. M.; Cavanagh, J. B. Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase. *Journal of the neurological sciences*, v. 29, n. 1, p. 95–107, set. 1976.
[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90083-6)

Jasmin, L. et al. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol*, v. 6, n. 1, p. 63–71, 2011.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000098>

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.
<https://doi.org/10.1038/35093019>

Kassuya, C. A. L. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *British Journal of Pharmacology*, v. 150, n. 6, p. 727–737, 2007.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707149>

kleckner, n.; Dingledine, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in Xenopus oocytes. *Science*, v. 241, n. 4867, p. 835–837, 12 ago. 1988.

Kung, L. H. et al. Evidence for Glutamate as a Neuroglial Transmitter within Sensory Ganglia. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068312>

Laube, B.; Kuhse, J.; Betz, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 18, n. 8, p. 2954–61, 15 abr. 1998.

Leffler, A. et al. A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium. *European Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 1, p. 12–22, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05643.x>

Linhart, O.; Obreja, O.; Kress, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience*, v. 118, n. 1, p. 69–74, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00960-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00960-0)

Lipton, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 2, p. 160–170, 2006.

<https://doi.org/10.1038/nrd1958>

Mcmahon, H. T.; Nicholls, D. G. Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca²⁺. *Journal of Neurochemistry*, v. 56, n. 1, p. 86–94, 1 jan. 1991.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02566.x>

Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S–15S, 2000.

Mestre, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 32, n. 4, p. 197–200, dez. 1994.

[https://doi.org/10.1016/1056-8719\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)90087-6)

Pannese, E. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. Berlin: Springer-Verlag, 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.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000037>

Parada, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 5, p. 2923–8, 4 mar. 2003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.252777799>

Randall, L. O.; Selitto, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, v. 111, n. 4, p. 409–19, 1 set. 1957.

Riedel, W; Neeck, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. v. 8, n. 3, p. 469–472, 2001.

Rouach, N. et al. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the cell*, v. 94, n. 7–8, p. 457–75, nov. 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)00016-3)

Sakurada, T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, v. 31, n. 12, p. 1279–85, dez. 1992.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(92\)90057-V](https://doi.org/10.1016/0028-3908(92)90057-V)

Sasaki, Y. F. et al. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 87, n. 4, p. 2052–2063, 1 abr. 2002.
<https://doi.org/10.1152/jn.00531.2001>

Schmidt, R. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 333–341, 1995.

Scholz, J.; Woolf, C. J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, v. 5 Suppl, n. november, p. 1062–1067, 2002.

Schorge, S.; Colquhoun, D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 4, p. 1151–8, 15 fev. 2003.

Shinder, V.; Devor, M. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. *J Neurocytol*, v. 23, n. 9, p. 515–531, 1994.
<https://doi.org/10.1007/BF01262054>

Smith, J. A. M. et al. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. p. 513–523, 1998.

Snider, W. D.; McMahon, S. B. Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron*, v. 20, n. 4, p. 629–632, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81003-X)

Southall, M. D. et al. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 304, n. 1, p. 217–22, 2003.
<https://doi.org/10.1124/jpet.102.040675>

Ten Tusscher, M. P.; Klooster, J.; Vrensen, G. F. Satellite cells as blood-ganglion cell barrier in autonomic ganglia. *Brain research*, v. 490, n. 1, p. 95–102, 19 jun. 1989.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90434-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90434-4)

Treede, R. D. et al. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *Journal of Physiology*, v. 483, n. 3, p. 747–758, 1995.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020619>

Woolf, C. J.; Salter, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, n. 5472, p. 1765–1768, 2000.
<https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1765>

Zhang, X. et al. Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 23, p. 9864–9, 2007.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611048104>