

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NO POTENCIAL DE REPOUSO NEURONAL  
INDUZIDAS POR PROSTAGLANDINA E2 EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE  
GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE  
FLUORESCÊNCIA**

**DÉBORA DE OLIVEIRA SANTOS**

**DOUTORADO**

**2018**

DÉBORA DE OLIVEIRA SANTOS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NO POTENCIAL DE REPOUSO NEURONAL  
INDUZIDAS POR PROSTAGLANDINA E2 EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE  
GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL DE RATOS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE  
FLUORESCÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

**UBERLÂNDIA**

**2018**

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

---

S237e  
2018

Santos, Débora de Oliveira, 1988

Estudo das alterações no potencial de repouso neuronal induzidas por prostaglandina E<sub>2</sub> em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos por meio de microscopia de fluorescência / Débora de Oliveira Santos. - 2018.

68 f. : il.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.465>  
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Prostaglandinas - Teses. 3. Nociceptividade - Teses. 4. Hiperalgesia - Teses. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado Nº 005/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Mecanismos celulares e moleculares da dor. Discente: Débora de Oliveira Santos – Matrícula nº 11413CSD003. Título do Trabalho: " Avaliação do potencial de repouso neuronal em cultura celular de gânglios da raiz dorsal de ratos como método de estudo para a avaliação da sensibilização neuronal por prostaglandia E2 (PGE2)." Às 14:00 horas do dia 05 de abril do ano de 2018, na sala de audiovisual do anfiteatro do Bloco 2A – 2º andar – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores:, Mani Indiana Funez (UNB) via Skype, Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues (UFTM), Tarciso Tadeu Miguel (UFU), Alexandre Antônio Vieira e Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU) – orientadora da discente, presentes no recinto. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir a candidata. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata ~~( )~~aprovada ( )reprovada. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:30 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo Celina Lotufo

Profa. Dra Mani Indiana Funez Participação via Skype

Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel Tarciso Tadeu Miguel

Prof. Dr. Alexandre Antônio Vieira Alexandre Antônio Vieira

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que todas as coisas caminhassem da melhor forma durante esses anos, me dando saúde, disposição, entendimento, e me cercando de pessoas boas e que me ajudaram tanto.*

*Agradeço ao incentivo que sempre recebi de toda a minha família e, principalmente, da minha mãe Marlene, e das minhas irmãs Daniela e Danúbia. Minha mãe sempre se esforçou ao máximo para nos dar a melhor educação possível, e, sem isso, não teria chegado até aqui.*

*À minha sobrinha Lara, a alegria da nossa família.*

*À minha orientadora, Profa. Celina, primeiramente pelo voto de confiança, quando aceitou me orientar, mesmo me conhecendo tão pouco. Agradeço por todos os ensinamentos, por ser tão paciente comigo e com os meus colegas. Em meio a tantas atividades, aulas e orientados, é sempre tão delicada e atenciosa, um exemplo profissional e pessoal para mim. Espero ter correspondido à confiança depositada em meu trabalho.*

*Aos meus colegas do grupo de estudos da dor, orientados da profa. Celina, que me ajudaram na realização dos experimentos e também pela convivência tão boa que tivemos, eu sentirei saudades.*

*À minha amiga Taís, por todos os anos de amizade, da graduação ao doutorado, por dividir os momentos bons e também os difíceis, e por me ajudar na realização dos experimentos deste trabalho.*

*Aos meus amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU, em especial do setor de Hematologia, por me auxiliarem trocando os plantões comigo todas as vezes que eu precisei, para que eu pudesse participar de Congressos, realizar as disciplinas e os experimentos. E não apenas isso, mas também por todo apoio e amizade.*

*À minha amiga Vanessa, que foi tão presente em minha vida nesses últimos anos, sempre com uma palavra de incentivo.*

*Aos amigos Pollynanna, Marília, Andressa, Daniel e Moline, pelas orações e por torcerem por mim em todos os momentos.*

*À Mariani, pelo suporte técnico e pela ótima companhia durante os experimentos.*

*Aos professores que aceitaram participaram da banca de defesa, por contribuírem com os seus conhecimentos para a construção final deste trabalho. Obrigada por se disponibilizarem, mesmo com tantos compromissos.*

*Ao professor Tarciso Tadeu Miguel, por ceder gentilmente uma das drogas utilizadas neste trabalho.*

*Aos demais funcionários da Universidade Federal de Uberlândia, em especial, aos funcionários do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde e também do ARFIS (Área de Ciências Fisiológicas).*

*Ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).*

*Muito obrigada a todos!*

*“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia” (Guimarães Rosa)*

## RESUMO

**Introdução:** A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um mediador inflamatório capaz de sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos e provocar hiperalgesia. Trabalhos sugerem que o mecanismo molecular envolvido na sensibilização por PGE<sub>2</sub> é dependente da ativação da via adenilato ciclase/AMPc/PKA e também de modificações em canais iônicos, como os canais de potássio (K<sup>+</sup>). **Objetivos:** Estudar a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> em culturas de neurônios sensoriais primários utilizando microscopia de fluorescência, como possível modelo para estudos da sensibilização dos nociceptores e avaliar o envolvimento de canais de K<sup>+</sup> neste processo. **Material e Métodos:** Foram realizadas culturas primárias de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) de ratos adultos e as variações no potencial de membrana foram registradas por microscopia confocal através da variação de fluorescência emitida pelos neurônios na presença do indicador DiBAC<sub>4</sub>(3). Avaliou-se o efeito da administração de PGE<sub>2</sub>, db-AMPc (análogo de AMPc), H89 (inibidor de PKA), morfina e dos bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>: glibenclamida, TEA e 4-AP nos neurônios em cultura. Também foi avaliado o potencial de membrana de neurônios isolados de animais tratados *in vivo* por injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub>. **Resultados:** A PGE<sub>2</sub> (1, 10 e 100 nM) despolarizou os neurônios de maneira dependente da concentração, e esse efeito ocorreu predominantemente nos neurônios de menor diâmetro (10 a 20 μm). Além disso, em culturas de neurônios obtidas de gânglios da raiz dorsal (L4 e L5) ipsilaterais ao tratamento por via intraplantar com PGE<sub>2</sub> (100 ng), verificou-se uma despolarização maior em relação a neurônios isolados de gânglios contralaterais dos mesmos animais, evidenciando uma correlação entre o efeito *in vivo* e *in vitro* de PGE<sub>2</sub>. Com relação ao envolvimento da via adenilato ciclase/AMPc/PKA na sensibilização dos neurônios sensoriais por PGE<sub>2</sub>, observou-se que a administração de db-AMPc induziu despolarização de forma semelhante ao observado com PGE<sub>2</sub> (100 nM) e que a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> é inibida na presença de H89. Foram testados também os efeitos de inibidores seletivos de canais de K<sup>+</sup> e observou-se que a 4-AP, um bloqueador de canais do tipo A, despolarizou neurônios de maneira semelhante à PGE<sub>2</sub>. Além disso, observou-se que a PGE<sub>2</sub> não apresenta efeito após despolarização induzida por 4-AP e este também não altera o potencial de membrana de neurônios previamente despolarizados por PGE<sub>2</sub>. Estes resultados indicam que PGE<sub>2</sub> e 4-AP atuam sobre os mesmos canais de K<sup>+</sup>. Foi testado também o efeito da morfina, analgésico cujo efeito periférico é dependente da abertura de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, e os resultados encontrados mostraram que a morfina inibe a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> e também por 4-AP, evidenciando que a PGE<sub>2</sub> e a

morfina atuam sobre canais de K<sup>+</sup> diferentes. **Conclusão:** Em conclusão, a PGE<sub>2</sub> despolarizou os neurônios do GRD de maneira dependente da concentração e os resultados sugerem que o mecanismo subjacente a essa sensibilização envolve a ativação de AMPc/PKA e a inibição de correntes de K<sup>+</sup> do tipo A. O modelo *in vitro* proposto para o estudo da sensibilização periférica reproduz resultados encontrados em outros modelos experimentais e pode contribuir para o entendimento da sensibilização nociceptiva e desenvolvimento de fármacos com ação analgésica.

**Palavras chave:** Prostaglandina E2, nocicepção, gânglio da raiz dorsal, hiperalgesia, canais de potássio.

## ABSTRACT

**Introduction:** Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is an inflammatory mediator able to sensitize peripheral sensory neurons and cause hyperalgesia. Studies suggests that the molecular mechanism involved in the sensitization by PGE<sub>2</sub> is dependent on the activation of adenylate cyclase/cAMP/PKA pathway, and also, modifications in ion channels, as potassium channels (K<sup>+</sup>). **Objectives:** Study the depolarization induced by PGE<sub>2</sub> in cultures of primary sensory neurons using fluorescence microscopy, as a possible model for studies of sensitization of nociceptors and evaluate the involvement of K<sup>+</sup> channels in this process. **Materials and Methods:** Primary cultures of neurons were cultivated from the dorsal root ganglia (DRG) of adult rats and variations in membrane potential were recorded by confocal microscopy through variation of fluorescence emitted by neurons in the presence of DiBAC<sub>4</sub>(3) indicator. The effect of administration of PGE<sub>2</sub>, db-cAMP (cAMP analogue), H89 (PKA inhibitor), morphine and the K<sup>+</sup> channel blockers: glibenclamide, TEA and 4-AP were evaluated. Also, the membrane potential of neurons isolated from animals treated *in vivo* by intraplantar injection of PGE<sub>2</sub> were evaluated **Results:** The PGE<sub>2</sub> (1, 10 and 100 nM) depolarized neurons of concentration-dependent manner, and this effect occurred predominantly in neurons of smaller diameter (10 to 20 μm). In addition, in cultures of neurons obtained from dorsal root ganglia (L4 and L5) ipsilateral to the treatment by intraplantar with PGE<sub>2</sub> (100 ng) in rats, there was a depolarized resting potential in relation to isolated neurons of contralateral ganglia of the same animals, evidencing a correlation between the effect *in vivo* and *in vitro* of PGE<sub>2</sub>. With regard to the involvement of adenylate cyclase/cAMP/PKA in the sensitization of sensory neurons by PGE<sub>2</sub>, it was noticed that the administration of db-cAMP induced depolarization in a similar manner to the ones observed with PGE<sub>2</sub> (100 nM) and that the depolarization induced by PGE<sub>2</sub> is inhibited in the presence of H89. Also the effects of selective inhibitors of K<sup>+</sup> channels were tested and it was observed that 4-AP, a type A channel blocker, depolarized neurons in a similar manner to PGE<sub>2</sub>. In addition, it was observed that the PGE<sub>2</sub> shows no effect after depolarization induced by 4-AP and it also does not alter the membrane potential of neurons previously depolarized by PGE<sub>2</sub>. These results indicate that PGE<sub>2</sub> and 4-AP acts on the same K<sup>+</sup> channels. The effect of morphine was also tested, an analgesic whose peripheral effect is dependent on the opening of K<sup>+</sup> channels sensitive to ATP, and the results have shown that morphine inhibits depolarization induced by PGE<sub>2</sub> and also by 4-AP, evidencing that PGE<sub>2</sub> and morphine act on different K<sup>+</sup> channels. **Conclusion:** In conclusion, the PGE<sub>2</sub> depolarized DRG neurons in a concentration – dependent manner and the results

suggest that the subjacente mechanism to this sensitization involves the activation of cAMP/PKA and the inhibition of  $K^+$  currents type A. The proposed *in vitro* model for the study of peripheral sensitization shows similar results found in other experimental models and can contribute to the understanding of nociceptive sensitization and development of drugs with analgesic action.

**Key words:** Prostaglandin E<sub>2</sub>, nociception, dorsal root ganglia, hyperalgesia, potassium channels.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal. B: Após 10 minutos da administração de PGE<sub>2</sub> (100 nM). C: Após 2 minutos da administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Aumento 400x ..... 36
- Figura 2. Efeito da PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração de PGE<sub>2</sub> (1, 10 e 100 nM). Dados mostrados como média ± E.P.M de 20 a 150 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni). ..... 37
- Figura 3. Diâmetros dos neurônios que responderam à PGE<sub>2</sub> (100 nM). O gráfico mostra a percentagem de neurônios que responderam à PGE<sub>2</sub> dentre um total de neurônios indicados entre parênteses. Foram consideradas respostas aumentos de fluorescências maiores de 20% após 10 minutos da administração de PGE<sub>2</sub>. ..... 38
- Figura 4. Avaliação da sensibilidade mecânica (von Frey eletrônico) de ratas Wistar após 120 minutos da administração de PGE<sub>2</sub> (100 ng) na pata direita, pata esquerda utilizada como controle. Médias de 3 animais. p= 0,13 (Dados avaliados por teste t pareado). ..... 39
- Figura 5. Efeito da administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. Foram realizadas culturas de neurônios ipsilaterais e contralaterais (controle) ao tratamento com PGE<sub>2</sub>. Dados mostrados como média ± E.P.M de 20 a 23 neurônios. \*p<0,03 (Dados avaliados por teste t pareado). ..... 39
- Figura 6. Efeito da ativação da via AMPc/PKA sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após administração de dibutiril-AMPc (100 μM). Dados mostrados como média ± E.P.M de 36 a 150 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni). ..... 40
- Figura 7. Efeito da ativação da via AMPc/PKA sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração de H89 (100 μM), H89 e PGE<sub>2</sub> (100 nM) ou apenas PGE<sub>2</sub> (100 nM). Dados mostrados como média ± E.P.M de 23 a 150 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni). ..... 41
- Figura 8. Efeito de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> sobre o potencial de repouso de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Efeito avaliado após 15 minutos da administração de 4-AP (10 mM),

glibenclamida (5  $\mu$ M) ou TEA (10 mM). Dados mostrados como média  $\pm$  E. P.M de 8 a 12 neurônios. \*\* p<0,005, \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni)..... 42

Figura 9. Efeito da PGE<sub>2</sub> (100 nM) na presença dos bloqueadores seletivos para canais de K<sup>+</sup>: 4-AP (10 mM), TEA (10 mM) ou glibenclamida (5  $\mu$ M) foram administrados 15 minutos antes de PGE<sub>2</sub>. Dados mostrados como média e E.P.M de 5 a 11 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni) ..... 43

Figura 10. Efeito de 4-AP após administração de PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> (100 nM) foi administrada 15 minutos antes de 4-AP (10 mM). O gráfico mostra separadamente o efeito de 4-AP sobre as células que foram despolarizadas pela administração de PGE<sub>2</sub> (6 células) e que não foram despolarizadas por PGE<sub>2</sub> (5 células) em duas placas diferentes. Os dados estão sendo mostrados como média  $\pm$  E.P.M. \*\* p < 0,005 (Dados avaliados por teste t)..... 44

Figura 11. Efeito da morfina sobre a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> (100 nM). O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração da morfina juntamente com PGE<sub>2</sub> (100 nM) ou apenas PGE<sub>2</sub> (100 nM). Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M de 31 a 49 neurônios. \*p< 0,05 significativamente diferente entre PGE<sub>2</sub> 100 nM e Morfina/PGE<sub>2</sub> 100 nM (Dados avaliados por teste t)..... 45

Figura 12. Efeito da morfina sobre o potencial de repouso nos neurônios sensitivos periféricos. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após administração da morfina. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M de 8 a 26 neurônios. \*p< 0,0001 significativamente diferente entre controle e Morfina (10  $\mu$ M) (Dados avaliados por teste t)..... 45

Figura 13. Efeito da morfina (10  $\mu$ M) sobre o potencial de repouso de neurônio sensitivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga..... 46

Figura 14. Efeito diazóxido (10  $\mu$ M) sobre o potencial de repouso de neurônio sensitivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga..... 47

Figura 15. Efeito da morfina em células despolarizadas por 4- AP. O efeito foi avaliado após 15 minutos da administração de 4-AP (10 mM) e, nas mesmas células a fluorescência observada após 15 minutos da administração da morfina (10  $\mu$ M), na presença de 4-AP.\*\*\* p< 0,0001 significativamente diferente do grupo 4-AP (Dados avaliados por teste t)..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5 metilsoxazol 4-propionico
ATP	Adenosina trifosfato
ASIC	Canais iônicos sensíveis a ácido
BKCa	Canal de potássio ativado por cálcio de condutância alta
Cav	Canal de cálcio voltagem dependente
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COXs	Ciclooxygenases
db-AMPc	dibutiril-AMPc
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DiBAC <sub>4</sub> (3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GT	Gânglio trigeminal
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanolsulfônico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IKCa	Canal de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária
K <sup>+</sup>	Potássio
K <sub>CA</sub>	Canal de potássio dependente de cálcio
K <sub>ir</sub>	Canal de potássio retificador de influxo
K <sub>v</sub>	Canal de potássio voltagem dependente
K <sub>2P</sub>	Canal de potássio com domínio de dois poros
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
Na <sup>+</sup>	Sódio
Nav	Canal de sódio voltagem dependente
Na <sup>+</sup> TTX-R	Canal de Na <sup>+</sup> resistente a tetrodotoxina
NK1	Neurocinina 1
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
PG	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF2α	Prostaglandina F2α
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
P2X	Canal sensível ao ATP
SKCa	Canal de potássio ativado por cálcio de condutância baixa
TASK	Canal de potássio com domínio de dois poros sensível ao ácido
TEA	Tetraetilamônio
TRAAK	Canal de potássio com domínio de dois poros estimulado por ácido araquidônico
TREK	Canal de potássio com domínio de dois poros de retificação interna
TRESK	Canal de potássio com domínio de dois poros com retificação interna associado ao canal de potássio da medula espinhal
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóide
TWIK	Canal de potássio com domínio de dois poros de retificação interna fraca
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
WDR	Neurônios de ampla faixa dinâmica
4-AP	4-aminopiridina
5-HT	5-hidroxitriptamina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	17
2.1 Sistema sensorial nociceptivo .....	17
2.1.1 Dor e nocicepção: considerações gerais .....	17
2.1.2 Os neurônios aferentes primários nociceptivos e a transmissão dos sinais ao Sistema Nervoso Central.....	18
2.1.3 Sensibilização dos nociceptores por mediadores do processo inflamatório .....	21
2.2 Prostaglandina E <sub>2</sub> .....	22
2.2.1 O papel da PGE <sub>2</sub> na sensibilização de neurônios sensoriais periféricos .....	24
2.3 Os canais de potássio .....	25
3 OBJETIVOS:.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Animais .....	30
4.2 Drogas .....	30
4.3 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal .....	31
4.4 Microscopia Confocal.....	32
4.5 Avaliação do efeito da injeção intraplantar de PGE <sub>2</sub> no potencial de repouso de neurônios sensoriais .....	33
4.5.1 Administração intraplantar de PGE <sub>2</sub> .....	33
4.5.2 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico .....	34
4.5.3 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	34
4.5.4 Microscopia confocal .....	35
4.5 Análise Estatística .....	35
5 RESULTADOS .....	36
5.1 Efeito da PGE <sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários.....	36
5.2 Papel do AMPc sobre a despolarização induzida por PGE <sub>2</sub> em neurônios nociceptivos primários .....	40
5.3 Envolvimento de canais de K <sup>+</sup> no efeito da PGE <sub>2</sub> sobre o potencial de repouso .....	41
5.4 Efeito da morfina sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários .....	44
6 DISCUSSÃO .....	49
7 CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
ANEXO I: Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A dor, embora descrita como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal dano” (Associação Internacional para o Estudo da Dor -IASP), é também essencial para sobrevivência, sendo um importante sinal de alerta contra um possível dano à integridade do organismo (DELLAROZA et al., 2008; BASBAUM et al., 2009). A nocicepção é a detecção de um estímulo potencialmente prejudicial, que é transmitida à medula espinhal e a centros cerebrais superiores para interpretação e percepção (LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

Durante o processo inflamatório, a produção e/ ou liberação celular de mediadores inflamatórios e citocinas leva à sensibilização dos neurônios sensoriais primários. Esta sensibilização depende, em última instância, da liberação de dois grupos de mediadores: eicosanoides e aminas simpatomiméticas (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; SANCHS et al., 2002). As prostaglandinas são membros da família dos eicosanoides, sintetizados a partir do ácido araquidônico, por meio da ação das enzimas ciclooxygenases (COX), que estão expressas nas células de forma constitutiva ou em resposta a estímulos específicos (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006).

Dentre os eicosanoides, a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é o principal mediador inflamatório responsável pelo fenômeno da hiperalgesia, que é caracterizado por uma resposta exacerbada a um estímulo nocivo. A capacidade da PGE<sub>2</sub> de sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos envolve receptores específicos acoplados a proteína G, que, quando ativados, levam ao acúmulo intracelular de AMPc e ativação das proteínas quinases PKA e PKC (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; KAWABA, 2011). O aumento da excitabilidade neuronal resultante dessa ativação parece ocorrer devido à fosforilação de canais de sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) (ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD; SHUSTER; LEVINE, 1996b; EVANS; VASKO; NICOL, 1999). Estudos demonstraram que a fosforilação de canais Nav1.8 e Nav1.9 resulta em uma redução no potencial de ação, enquanto a fosforilação de canais de K<sup>+</sup> levam a uma despolarização da membrana neuronal durante o potencial de repouso (NICOL et al., 1997; EVANS; VASKO; NICOL, 1999).

Os estudos sobre dor periférica normalmente utilizam testes comportamentais com modelo animal e também testes eletrofisiológicos em culturas de neurônios sensoriais primários, ferramentas de grande importância na área e pelas quais grandes avanços foram feitos no entendimento da fisiopatologia da dor. Contudo, o desenvolvimento de novas metodologias pode levar a uma menor utilização de animais nos experimentos e também

possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização dos receptores sensoriais para estímulos dolorosos, os nociceptores. O presente trabalho propôs a padronização de um modelo de estudo da dor *in vitro*, utilizando o indicador de potencial de membrana DiBAC<sub>4</sub>(3) em cultura de células do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos por meio de microscopia de fluorescência e utilizando a PGE<sub>2</sub>, cuja capacidade de sensibilização periférica já foi anteriormente descrita, como agente sensibilizante, bem como investigar o envolvimento da via de sinalização adenilato ciclase/AMPc/PKA e da modulação de canais de K<sup>+</sup> na despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> nos neurônios em cultura.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Sistema sensorial nociceptivo**

#### **2.1.1 Dor e nocicepção: considerações gerais**

A dor é definida pela Associação Internacional de Estudo para a Dor (IASP) como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Já o termo nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central, resultantes da ativação de receptores sensoriais que respondem a estímulos dolorosos, os nociceptores (OLIVEIRA, 2008; FEIN, 2011). Em condições normais a nocicepção e a percepção de dor são evocados apenas por estímulos extremos de pressão, temperatura ou estímulos químicos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e constitui um importante componente de defesa corporal. Indivíduos que sofrem de anormalidades congênitas que os tornam insensíveis à dor não desenvolvem o comportamento de proteção apropriado perante situações que afetem a integridade do organismo, como, por exemplo, a proximidade ao calor extremo ou mesmo desconforto associado a uma lesão interna (BASBAUM et al., 2009).

A dor pode ser classificada em nociceptiva ou patológica. A dor nociceptiva geralmente é transitória, pode ser somática ou visceral, e é resultante de danos aos tecidos que levam a uma ativação dos nociceptores periféricos. Esses sinais nociceptivos são transmitidos para a medula espinhal, onde são modulados e transmitidos para neurônios de segunda ordem e, por meio de vias ascendentes de transmissão sensorial, chegam ao encéfalo, onde são então interpretados em regiões superiores do córtex cerebral (GUYTON; HALL, 2011; PERGOLIZZI et al., 2013).

Contudo, a dor pode passar de um sinal de alerta agudo para um estado patológico, crônico e debilitante (BASBAUM et al., 2009). As dores patológicas estão associadas à inflamação do tecido periférico (dor inflamatória) e a lesões do sistema nervoso periférico ou central (dor neuropática), geralmente são de difícil localização e também podem resultar em sintomas secundários, como ansiedade e depressão (OLIVEIRA, 2008). A dor patológica pode ser subdividida em dois fenômenos inter-relacionados, mas distintos: hipersensibilidade (que inclui hiperalgesia e alodinia) e dor espontânea. A hipersensibilidade, no sistema nervoso periférico, é resultado da diminuição do limiar de excitabilidade nos nociceptores e geração

de potenciais de ação em resposta a estímulos não nocivos (alodinia) ou uma resposta exacerbada a um estímulo nocivo (hiperalgesia) (LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

### **2.1.2 Os neurônios aferentes primários nociceptivos e a transmissão dos sinais ao Sistema Nervoso Central**

Os neurônios aferentes primários são neurônios sensoriais que transmitem informações ao sistema nervoso central sobre estímulos mecânicos, térmicos e químicos, além de estímulos que ocasionem dano potencial aos tecidos (GUYTON; HALL, 2011; DU; GAMPER, 2013). Os receptores sensoriais que fornecem informação sobre uma lesão tecidual são denominados nociceptores, que são terminações nervosas livres presentes nesses neurônios (FEIN, 2011).

Os neurônios nociceptivos, assim como os outros neurônios sensoriais primários, são do tipo pseudounipolar: os corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) ou gânglio trigeminal (GT), e o axônio possui uma extremidade distal e outra proximal. A extremidade distal é a região na qual se localizam as terminações nervosas livres (região de transdução sensorial), na pele, músculos, articulações, vasos sanguíneos, vísceras e ossos, e a extremidade proximal faz sinapses com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal ou subnúcleo caudal trigeminal (BASBAUM et. al., 2009; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010; DU; GAMPER, 2013).

A velocidade de transmissão dos estímulos sensoriais é diretamente correlacionada ao diâmetro dos axônios dos neurônios aferentes e à presença de bainha de mielina. Existem três tipos principais de fibras sensoriais no sistema nervoso periférico, as fibras A $\beta$ , A $\delta$  e as fibras C, cada uma com propriedades distintas que permitem a resposta e a transmissão de diferentes tipos de informações sensoriais. As fibras A $\beta$  têm de maior diâmetro e são mielinizadas, permitindo a condução rápida de potências de ação de seus terminais periféricos para terminais centrais. Essas fibras possuem um baixo limiar de ativação e são responsáveis pela transmissão de informação tátil e proprioceptiva. As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, possuem menor diâmetro, são mais lentas e possuem limiar mais alto de ativação que as fibras A $\beta$ . As fibras C possuem o menor diâmetro, são amielinizadas, tornando a condução mais lenta, e possuem os limiares de ativação mais altos. Coletivamente, as fibras A $\delta$  e C podem ser denominadas de nociceptivas ou “fibras da dor”, respondendo a estímulos nocivos

(MELLO; DICKENSON, 2008). A velocidade de condução das fibras C varia de 0,4-1,4 m/s e das fibras A $\delta$  de 5 a 30m/s (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Além da classificação com base na velocidade de condução, as fibras nociceptivas podem ser classificadas com base na sensibilidade a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os nociceptores associados às fibras C respondem aos três tipos de estímulos e são denominados polimodais (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Os nociceptores associados às fibras A $\delta$  respondem a estímulos mecânicos, mas diferem com relação à resposta aos estímulos térmicos. Elas podem ser divididas em A $\delta$  tipo I e tipo II. As fibras do tipo I respondem ao calor intenso (maior que 50 °C) e as do tipo II a estímulo térmico moderado (aproximadamente 45 °C) (OLIVEIRA, 2008; BASBAUM et. al., 2009).

A excitação elétrica dos terminais periféricos dos neurônios sensoriais leva a geração de impulsos nervosos que, após o processamento no sistema nervoso central, resultam em diversos tipos sensações, incluindo dor. A nocicepção é um processo iniciado pela abertura de canais iônicos nos terminais nociceptivos em resposta a um estímulo nocivo, desencadeando a geração de um potencial de ação (LINLEY; ROSE; OOI, 2010; DU; GAMPER, 2013).

No processo de dor aguda a despolarização e geração de potenciais de ação são transitórias. Contudo, um processo inflamatório, lesão ou degeneração nervosa resulta, muitas vezes, em condições em que a sinalização nociceptiva se torna persistente, podendo levar à dor crônica ou neuropática. Modificações na estrutura ou atividade de canais iônicos são comumente os responsáveis pela desregulação na excitabilidade neuronal (ROZA et al., 2003; RAOUF et al., 2010).

Três grupos de canais iônicos são cruciais para a excitabilidade dos neurônios sensoriais nociceptivos: os canais de potássio (K $^{+}$ ) voltagem dependentes, cuja ativação reduz a excitabilidade dos terminais nociceptivos, enquanto sua inibição pode produzir efeito excitatório; os canais de sódio (Na $^{+}$ ) voltagens dependentes, responsáveis pelo início do potencial de ação e cuja ativação pode diminuir o limiar de potencial de ação e, portanto, tem um efeito excitatório; canais sensoriais e dependentes de ligante, que são canais catiônicos abertos pelos estímulos nocivos (por exemplo, os canais iônicos do receptor de potencial transitório (TRP)) ou por ligantes pró-inflamatórios, tais como ATP e H $^{+}$  (canais sensíveis ao ATP (P2X) e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), respectivamente), cuja ativação também possui um efeito excitatório nos neurônios (LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

A família de canais iônicos do receptor de potencial transitório (TRP) possui vários membros responsáveis pela detecção de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos

(LINLEY; ROSE; OOI, 2010). O receptor TRPV1 é o receptor ativado pela capsaicina, o ingrediente pungente ou quente da pimenta e a ativação desse canal produz a sensação de dor e queimação por despolarização de nociceptores (OLIVEIRA, 2008; BASBAUM et. al., 2009). Os canais TRPV1 também são ativados por temperaturas moderadas (aproximadamente 43°C) e também por agentes pró-inflamatórios, tais como bradicinina, prótons extracelulares e neutrofinas (TOMINAGA, 2008; BASBAUM et. al., 2009). Estudos demonstraram que ausência desse canal leva a perda da sensibilidade à capsaicina e a um comprometimento significativo na detecção do calor nocivo (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). Existem outros subtipos de canais TRPV relacionados com a sensação de calor nocivo. O canal TRPV2 responde a temperaturas iguais ou superiores a 52°C, o TRPV3 e TRPV4 são ativados entre 25 e 35°C (BASBAUM et. al., 2009).

A extremidade proximal dos neurônios aferentes primários nociceptivos se encontra no corno dorsal da medula espinhal (OLIVEIRA, 2008). Neste ponto é importante destacar que as informações sensoriais, após entrada na medula espinhal, são conduzidas até o encéfalo por duas vias sensoriais alternativas: o sistema coluna dorsal-lemnisco medial e o sistema anterolateral. O primeiro é responsável pela transmissão de sensações táteis, com alta velocidade de transmissão e que requerem alto grau de localização. Já o sistema anterolateral transmite um amplo espectro de informações sensoriais, incluindo a dor (GUYTON; HALL, 2011).

O corno dorsal da medula espinhal é organizado em seis lâminas distintas anatomicamente e fisiologicamente. Neste local, os neurônios sensoriais nociceptivos realizam sinapses excitatórias com neurônios de transmissão ou de segunda ordem (OLIVEIRA, 2008). Análises eletrofisiológicas demonstraram que os neurônios da lâmina I são geralmente responsivos a estimulação nociva (via fibras A $\delta$  e C), neurônios nas lâminas III e IV são responsivos principalmente a estimulação inócuia (via fibras A $\beta$ ) e os neurônios da lâmina V respondem uma ampla gama de intensidade de estímulos, sendo chamados de neurônios de ampla faixa dinâmica (WDR). Os nociceptores A $\delta$  fazem sinapses com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e V e as fibras C projetam para as lâminas I e II (BASBAUM et. al., 2009).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório encontrado em todo o sistema nervoso central e é utilizado nas sinapses da grande maioria dos aferentes primários. O glutamato pode causar a despolarização da membrana pós-sináptica por meio de três subclasses distintas de receptores: os receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5 metilsoxazol 4-

propiológico (AMPA), que produz um potencial pós-sináptico muito rápido, os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), cujo potencial pós-sináptico é mais lento ou de longa duração, e a família de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (mGluR) (MELLO; DICKENSON, 2008; OLIVEIRA, 2008). Existem também outros neurotransmissores envolvidos nas sinapses entre os neurônios aferentes primários nociceptivos e os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, tais como a substância P, que ativa o receptor denominado neurocinina 1 (NK1), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que ativa o receptor CGRP, e o trifosfato de adenosina (ATP), que ativa receptores purinérgico P2X ou P2Y (OLIVEIRA, 2008).

As principais vias anterolaterais de transmissão de sinais nociceptivos são o trato neoespinotalâmico e o trato paleoespinatalâmico. Ambos os tratos têm origem nos axônios dos neurônios de segunda ordem do corno dorsal, que decussam dentro da medula espinhal e ascendem para estruturas supra-espinhais. O trato neoespinatalâmico conduz informações nociceptivas com alta velocidade e, por isso, está envolvido na transmissão de dor rápida e aguda, e o trato paleoespinatalâmico conduz os sinais nociceptivos com baixa velocidade e está relacionado com a dor lenta e crônica (OLIVEIRA, 2008; GUYTON; HALL, 2011).

A dor resulta da interação dinâmica entre o processo sensorial nociceptivo e o contexto individual (cognitivo, emocional, motivacional), e está associada à ativação de diferentes áreas do cérebro, incluindo o córtex somatossensorial, insular, cingulado e pré-frontal, o tálamo, áreas subcorticais e tronco cerebral. Essas áreas não processam exclusivamente a experiência de dor, mas pertencem a diferentes sistemas funcionais do encéfalo, que são orquestrados de maneira transitória durante esse processo (APKARIAN et al., 2005; PLONER; SORG; GROSS, 2017). O tálamo é uma estrutura de extrema importância para a recepção, integração e transmissão de informações sensoriais. As informações de dor chegam ao córtex via projeções talâmicas provenientes de núcleos talâmicos laterais e mediais. Os núcleos talâmicos laterais estão relacionados ao aspecto sensorial-discriminativo da dor e os núcleos mediais ao componente afetivo emocional, uma vez que se projetam para várias estruturas corticais, estruturas do sistema límbico, córtex insular e córtex do cíngulo anterior (OLIVEIRA, 2008).

### **2.1.3 Sensibilização dos nociceptores por mediadores do processo inflamatório**

A inflamação é uma resposta imune complexa que ocorre em reação a uma injúria tecidual, tais como infecções, queimaduras ou danos ocasionados por produtos químicos

irritantes, e que visa remover o estímulo prejudicial e promover a regeneração tecidual (LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

O processo inflamatório é orquestrado por uma ampla gama de fatores químicos, denominados mediadores inflamatórios, liberados no espaço extracelular por células teciduais que sofreram injúria, células do sistema imune que foram recrutadas para a área da lesão e também por fibras sensoriais afetadas. Já foram descritos um grande número de mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina, substância P, ATP, prostaglandinas, histamina, fatores de crescimento, prótons, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, dentre outros, que podem causar um aumento da excitabilidade dos nociceptores (McMAHON et al., 2006; ROCHA et al., 2007; LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

A ação de mediadores inflamatórios nos neurônios sensoriais é mediada por receptores específicos, que se dividem em três categorias gerais: receptores acoplados a proteína G (como por exemplo, os receptores de bradicinina, B1 e B2 e histamina, H1); receptores tirosina quinase (como por exemplo, os receptores de fatores de crescimento) e receptores ionotrópicos (como por exemplo, os receptor purinérgico P2X). A ativação desses receptores pelos mediadores inflamatórios desencadeiam cascatas de sinalização específicas que modificam canais iônicos. Ação dos mediadores inflamatórios pode levar a despolarização, redução do limiar de potenciais de ação e repolarização retardada dos neurônios sensoriais, e, como resultado, a hiperexcitabilidade. Esta hiperexcitabilidade, importante na dor inflamatória, é responsável pelos processos de hiperalgesia e alodínia (LINLEY; ROSE; OOI, 2010).

Neste contexto, as prostaglandinas representam um importante grupo de agentes capazes de sensibilizar os neurônios sensoriais (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; EVANS; VASKO; NICOL, 1999).

## **2.2 Prostaglandina E<sub>2</sub>**

As prostaglandinas (PGs) e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), coletivamente chamados de prostanoïdes, são formados quando o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado de 20 carbonos, é liberado pela fosfolipase A<sub>2</sub> da membrana plasmática em resposta a uma variedade de estímulos celulares. Após a sua liberação, é metabolizado pela ação das enzimas ciclooxygenases (COXs). As COXs existem em duas formas distintas, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa de maneira constitutiva pela maioria das células, já a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento. Contudo, ambas as

enzimas contribuem para a geração de prostanoides autorreguladores e homeostáticos, e também na resposta inflamatória. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), fármacos muito utilizados no tratamento de dores de origem inflamatória, atuam reduzindo a produção de prostanoides pela inibição de COX-1 e/ou COX-2, o que, mais uma vez, indica um papel importante para as prostaglandinas na gênese e tratamento de dores (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006; HAEGGSTROM et.al., 2010; KAWABATA, 2011; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Existem quatro tipos de principais de prostaglandinas: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e prostaglandina F2α (PGF2α). As PGs atuam como mediadores na manutenção da homeostase do organismo, porém, a sua produção é baixa em tecidos não inflamados. Durante a resposta inflamatória ocorrem mudanças nos níveis e no perfil de produção das PGs (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A PGE<sub>2</sub> pode ser sintetizada por uma grande variedade de células do corpo humano, seja constitutivamente ou em resposta a um estímulo. Os seus efeitos biológicos são diversos e de grande complexidade, dependendo da quantidade disponível, do microambiente onde se encontra e dos receptores expressos nas células alvo (LEGLER et al., 2010).

A ação da PGE<sub>2</sub> em células alvo ocorre por meio de quatro receptores prostanóides E: EP1-EP4. Os receptores EP possuem sete domínios transmembrana, sendo receptores acoplados a proteína G. O receptor EP1 atua pela via do fosfatidil inositol, que leva a um aumento da concentração citosólica de cálcio livre. Já os receptores EP2 e EP4 atuam por meio da via de adenilado ciclase, aumentando a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O receptor EP3 é considerado um receptor inibitório que diminui a formação de AMPc (HATAE et al., 2002; LEGLER et al., 2010; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A PGE<sub>2</sub> regula numerosas funções fisiológicas, que incluem funções metabólicas, imunes e neurais. No sistema nervoso atua na regulação da temperatura corporal, controle vigília-sono e hiperalgesia. Também participa na regulação da formação óssea, controle da pressão sanguínea, motilidade gastrointestinal e função renal (RANG et al., 2004; DEY; LEJEUNE; CHADEE, 2006; HARRIS et al., 2002; LEGLER et al., 2010).

Durante resposta inflamatória a PGE<sub>2</sub> está envolvida em processos que levam ao desenvolvimento dos sinais clássicos da inflamação: eritema, edema e dor. O edema e o eritema são resultado do aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado, e a PGE<sub>2</sub> atua promovendo vasodilatação de arteríolas e aumento de permeabilidade vascular. Além disso, a PGE<sub>2</sub> parece ser um dos principais mediadores responsáveis pela sensibilização de neurônios

nociceptivos periféricos. Como mencionado anteriormente, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) suprimem a dor inflamatória pela redução da produção de prostanoïdes, principalmente PGE<sub>2</sub> (FUNK, 2001; LEGLER et al., 2010; KAWABATA, 2011; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

### **2.2.1 O papel da PGE<sub>2</sub> na sensibilização de neurônios sensoriais periféricos**

A capacidade das PGs de sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos foi extensivamente estudada em humanos e em modelo animal, utilizando testes comportamentais e técnicas de eletrofisiologia (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; KASAI; MIZUMURA, 2001). Em modelo animal, a administração de PGE<sub>2</sub> na pata é uma metodologia bastante empregada para o estudo de dor inflamatória. Em um trabalho publicado em 1978, Ferreira e colaboradores avaliaram os efeitos da administração de PGE<sub>2</sub> em ratos utilizando o teste comportamental Randall e Selitto e concluíram que intensidade de hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub> é dose dependente e tem seu máximo de efeito após três horas de aplicação, persistindo os efeitos por mais seis horas (FERREIRA et al., 1978).

A capacidade de PGE<sub>2</sub> de sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos e causar hiperalgesia envolve a ativação de duas proteínas quinases: proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; MORIYAMA et al., 2005, KAWABA, 2011).

Os receptores EP1 e EP4 parecem ser os principais responsáveis por ativar as proteínas PKA e PKC. O receptor EP4 quando ativado estimula a via AMPc/PKA, enquanto a estimulação do receptor EP1 provoca a ativação de PKC. A ativação das cascadas EP4/PKA e EP1/PKC induzidas por PGE<sub>2</sub> nos nociceptores periféricos desempenham um papel importante no desenvolvimento de dor e/ou hiperalgesia, e a utilização de inibidores desses receptores como analgésicos são de particular interesse, sendo uma opção ao uso de AINEs no tratamento da dor inflamatória (MORIYAMA et al., 2005 ; LIN et al., 2006; NAKAO et al., 2007; CLARK et al., 2008; MURASE et al., 2008; COLUCCI et al., 2010; MIKI et al., 2011).

Nos nociceptores, PKA e PKC também estão envolvidas na hiperalgesia térmica por sensibilização do receptor TRPV1 (MORIYAMA et al.; 2005; KAWABATA, 2011). Além disso, foi sugerido que a ativação por PKA da subunidade ε de PKC é um mecanismo importante durante a hiperalgesia mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> (SACHS et al., 2009).

Estudos demostram que a PKA pode fosforilar e sensibilizar canais de cálcio tipo T, particularmente a isoforma Cav3.2, que são expressos em nociceptores, e mediar a

hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> (SEKIGUCHI et al., 2013).

A ativação da via AMPc/PKA também está envolvida na sensibilização do receptor P2X3r induzida PGE<sub>2</sub>, e isso foi demonstrado em experimentos comportamentais e estudo eletrofisiológico do gânglio da raiz dorsal. Esse receptor, ativado por ATP, é de grande importância no processamento de informações nociceptivas nesses neurônios (WANG; LI; HUANG, 2007).

O mecanismo final responsável pela diminuição do limiar de ativação de nociceptores é, provavelmente, a modulação de canais iônicos neuronais. Foi descrito por outros autores que a administração de PGE<sub>2</sub> inibe correntes de K<sup>+</sup> por ativação de PKA em cultura de GRD (EVANS; VASKO; NICOL, 1999). A ativação de PKA também atua na fosforilação de canais de Na<sup>+</sup> resistentes a tetrodotoxina (Na<sup>+</sup>TTX-R), promovendo um aumento nas correntes de Na<sup>+</sup> (ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD et al., 1996a; FITZGERALD et al., 1999). Além disso, foi descrito que a ativação de PKC induz aumento em correntes de Na<sup>+</sup> em canais TTX-R e que é necessária também para a modulação de Na<sup>+</sup>TTX-R por PKA em culturas de gânglio da raiz dorsal (GOLD; LEVINE; CORREA, 1998). Em todos os casos descritos, a sinalização mediada por PKA e PKC em canais iônicos resulta na excitabilidade aumentada em neurônios sensoriais.

### **2.3 Os canais de potássio**

A transmissão e o processamento de sinais nociceptivos dependem da atividade de canais iônicos que são expressos nas fibras nociceptivas aferentes, os quais regulam o potencial de repouso da membrana e também o disparo de potenciais de ação. Modificações na expressão desses canais podem levar a hiperexcitabilidade neuronal, característica subjacente à dor neuropática e inflamatória, de modo que muitos trabalhos têm buscado o desenvolvimento de moduladores farmacológicos de canais iônicos como possíveis analgésicos (WAXMAN; ZAMPONI, 2014).

Os canais de potássio (K<sup>+</sup>) constituem o maior e mais diversificado grupo de canais iônicos, representando cerca de 70 *loci* conhecidos no genoma humano (GUTMAN et. al, 2005). Estão presentes na membrana de células excitáveis e não excitáveis e desempenham papel crítico nos processos de sinalização celular que regulam, entre outros, a liberação de neurotransmissores e excitabilidade neuronal, a frequência cardíaca, a secreção de insulina, o

transporte epitelial de eletrólitos, contração do músculo liso e a regulação do volume celular (SHIEH et.al., 2000).

Os canais de  $K^+$  podem ser classificados em: dependentes de voltagem ( $K_v$ ), ativados por íons (tais como cálcio- $K_{CA}$ ), com domínio de dois poros ( $K_{2P}$ ) e retificadores de influxo ( $K_{ir}$ ). Os nociceptores expressam membros desses quatro grupos (DU; GAMPER, 2013; WAXMAN; ZAMPONI, 2014).

Os canais de  $K^+$  voltagem dependentes ( $K_v$ ) são formados por quatro subunidades, cada uma com seis domínios transmembrana, um dos quais funciona como um sensor de voltagem, fazendo com que o canal se abra quando a membrana despolariza. Está principalmente envolvido na repolarização da membrana durante o potencial de ação. Foram identificadas até o momento 12 famílias de canais  $K_v$  ( $K_v1-K_v12$ ), esses canais são os principais determinantes da frequência e da duração do potencial de ação, e a redução da sua atividade leva a uma redução do limiar e hiperexcitabilidade da membrana. Muitos desses canais são bloqueados por fármacos como o tetraetilamônio (TEA) e 4-aminopiridina (4-AP). Os neurônios sensoriais expressam vários tipos de canais  $K_v$ , incluindo  $K_v1$ ,  $K_v2$ ,  $K_v3$ ,  $K_v4$ ,  $K_v7$  e  $K_v9$ , dependendo do subtipo neuronal (JENKINSO, 2006; DU; GAMPER, 2013; RANG et al., 2004; WAXMAN; ZAMPONI, 2014).

Nos neurônios do GRD foram identificados três tipos de correntes de  $K^+$  voltagem dependentes, com base em propriedades cinéticas e farmacológicas: correntes de inativação rápida (correntes do tipo A) que são sensíveis a 4-AP, correntes de inativação lenta e correntes retificadoras tardias, sensíveis ao TEA (GOLD; SHUSTER; LEVINE, 1996b; FEDULLOVA; VASILYEV; VESELOVSKY, 1998; CHIEN et al., 2007; VYDYANATHAN et al., 2005).

Estudos demonstraram modificações na expressão de canais de  $K_v$  em modelo experimental animal de dor. Em neurônios do GRD de ratos que passaram por axotomia houve uma diminuição da expressão de  $K_v1.2$  e  $K_v2.1$  (ISHIKAWA et al., 1999). A transecção do nervo ciático reduziu a expressão do mRNA de  $K_v1.2$ , 1.4 e 4.2 (PARK et al., 2003). Em outro estudo, também em modelo experimental de indução de neuropatia periférica, a expressão de dois canais de correntes do tipo A,  $K_v3.4$  e  $Kv4.3$ , foi reduzida em neurônios do GRD e a supressão da expressão desses canais por injeção intratecal de oligonucleotídeos antisense resultou no desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica nos animais (CHIEN et al., 2007). Em modelo de neuropatia diabética foi demonstrado uma diminuição do mRNA de canais de  $K_v$  que codificam correntes do tipo A em neurônios do GRD (CAO et al., 2010).

Os canais de  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $K_{CA}$ ) possuem arquitetura semelhante aos canais  $K_v$  com seis domínios transmembrana, embora algumas famílias possuam subunidades com um domínio extra (DU; GAMPER, 2013). A família dos canais  $K_{CA}$  incluem os subtipos BKCa (canal de potássio ativado por cálcio de condutância alta), IKCa (canal de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária) e SKCa (canal de potássio ativado por cálcio de condutância baixa) e todos parecem estar expressos em neurônios sensoriais. Os canais BKCa são ativados por mudanças no potencial de membrana (despolarização) e/ou aumento nas concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$ , já os subtipos SKCa e IKCa não são dependentes de voltagem e são ativados por baixas concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Devido a sua alta sensibilidade ao  $Ca^{2+}$ , SKCa desempenha um papel importante na regulação das vias de sinalização que envolvem esse íon e, em células excitáveis como os neurônios, induzem uma repolarização ou uma hiperpolarização que fecha canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes ou diminui a sua probabilidade de ativação, diminuindo assim a sua concentração intracelular (GUEGUINOU et al., 2014 ; WAXMAN; ZAMPONI, 2014).

A diminuição da expressão de canais BKCa em neurônios do GRD em ratos após indução de neuropatia periférica já foi demonstrada. Além disso, o bloqueio desses canais no corno dorsal da medula espinhal por um antagonista reduziu o limiar nociceptivo mecânico em animais neuropáticos e controles, enquanto a abertura desses canais reduziu alodinia e hiperalgesia nos animais neuropáticos (CHEN et al., 2009).

Os canais de  $K^+$  com domínio de dois poros ( $K_{2P}$ ) são formados por dímeros de subunidades com quatro domínios transmembrana e não possuem um sensor de voltagem bem definido. Foram identificados 15 canais  $K_{2P}$  em mamíferos, e eles apresentam duas funções importantes nos neurônios sensoriais: ajudam a manter o potencial de repouso negativo da membrana e também podem responder a estímulos mecânicos, químicos e de temperatura, desempenhando um papel de receptores sensoriais primários em terminais periféricos de fibras aferentes (PLANT, 2012; DU; GAMPER, 2013).

No GRD são expressos subtipos de  $K_{2P}$ , que incluem TASK-1-3 (canal de  $K^+$  com domínio de dois poros sensível ao ácido), TREK-1-2 (canal de  $K^+$  com domínio de dois poros com retificação interna), TRAAK (canal de  $K^+$  com domínio de dois poros estimulado por ácido araquidônico), TWIK-1-2 (canal de  $K^+$  com domínio de dois poros com retificação interna fraca) e TRESK (canal de  $K^+$  com domínio de dois poros com retificação interna associada ao canal de  $K^+$  da medula espinhal). Evidências sugerem que TREK1-2, TRAAK são canais responsivos a estímulos mecânicos e térmicos e TASK-1 e 3 são sensíveis à acidificação. Esses canais são inibidos pelos estímulos e não ativados, como ocorre com

outros canais iônicos sensoriais, tais como TRP e P2X, e essa inibição resulta na despolarização da membrana e pode gerar potenciais de ação (MAINGRET et al., 1999; MAINGRET et al., 2000; BENARROCH, 2005; KANG; CHOE; KIM, 2005; HONORE, 2007; NOEL et al., 2009; DU; GAMPER, 2013).

O aumento da expressão de canais TRESK no GRD em ratos, utilizando injeção intratecal de adenovírus recombinante, atenuou a hipersensibilidade mecânica e térmica induzida por lesão de nervo periférico, evidenciando que a modulação da expressão desses canais no GRD pode ser utilizada no desenvolvimento de terapias para a dor (ZHOU et al., 2013).

E por fim os canais de  $K^+$  retificadores de influxo ( $K_{ir}$ ), que possuem dois domínios transmembrana e um poro, e não apresentam um sensor de voltagem bem definido. Nos mamíferos já foram identificadas sete famílias  $K_{ir}$ ,  $K_{ir}1-K_{ir}7$ . A combinação do canal  $K_{ir}6$  e subunidades regulatórias pertencentes aos receptores de sulfoniuréia (SUR) formam os canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ). Os  $K_{ATP}$  são inibidos pelo ATP intracelular, atuando como sensores metabólicos, e são responsáveis por mediar a secreção de insulina nas células betapancreáticas e o controle do tônus vascular. Além disso, estudos sugerem que os  $K_{ATP}$  podem também mediar os efeitos analgésicos periféricos da morfina, clonidina e agonistas 5-HT (OCANA et al., 1990; OCANA et al., 1993; ROBLES et al., 1996; CUNHA et al., 2010; DU et al., 2011; DU; GAMPER, 2013; SZETO et al., 2018).

Estudos demonstraram que a ativação de  $K_{ATP}$ , utilizando as drogas pinacidil e diazóxido, inibiu a hiperexcitabilidade induzida pela bradicinina em neurônios do GRD e também o comportamento nociceptivo induzido por estímulos mecânico e térmico em ratos, evidenciando que a ativação desses canais pode causar a modulação da excitabilidade dos neurônios sensoriais (DU et al., 2011). A utilização dos mesmos ativadores de  $K_{ATP}$  citados acima aumentou correntes de  $K_{ATP}$  em neurônios do GRD de ratos e a glibenclamida (promove fechamento desses canais) inibiu essas correntes em animais controle, o que não foi observado em neurônios de animais neuropáticos, demonstrando que as correntes  $K_{ATP}$  estão presentes nos neurônios aferentes primários e a lesão do nervo periférico pode diminuí-las (SARANTOPOULOS et al., 2003).

### **3 OBJETIVOS:**

#### **3.1 Objetivos Gerais:**

Estudar a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> em culturas de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos, através do indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3), como possível modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos na sensibilização dos nociceptores.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

1- Determinar o efeito direto de PGE<sub>2</sub>, em diferentes concentrações, sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos periféricos por meio de cultura de células do GRD de ratos.

2- Relacionar os diâmetros dos corpos celulares com as modificações do potencial de repouso neuronal em resposta à PGE<sub>2</sub>.

3- Avaliar se neurônios de GRD em culturas de animais tratados com injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> apresentam o potencial de membrana alterado.

4- Avaliar o envolvimento da via adenilato ciclase/AMPc/PKA sobre o potencial de repouso das células em estudo, utilizando o análogo ao AMPc, db-AMPc e o inibidor de PKA, H89.

5- Avaliar o envolvimento de canais de K<sup>+</sup> no efeito da PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso utilizando os bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>: glibenclamida (bloqueador de canais sensíveis ao ATP), tetraetilamônio (TEA, bloqueador de canais retificadores tardios) e 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canais do tipo A).

6- Avaliar o efeito da morfina sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, pesando aproximadamente 100 g, mantidas em ciclo claro-escuro de 12/12 h, recebendo ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram submetidos para análise do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo nº 078/17- ANEXO I) e realizados apenas após a sua aprovação.

Os animais foram adquiridos do biotério da Universidade Federal de Uberlândia e mantidos, até o momento da realização dos experimentos, no depositário de animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), na mesma Instituição.

### 4.2 Drogas

Para os experimentos *in vitro*, todas as drogas foram diluídas em meio de cultura Hanks/Hepes, diretamente ou a partir de soluções estoque, em uma concentração 10 vezes superior a concentração final desejada. Todos os estoques de drogas foram mantidos em freezer a -20°C até o momento do uso.

- Capsaicina (Sigma): É um agonista de receptores TRPV1, expressos em neurônios associados às fibras C, sendo assim utilizada para a seleção de neurônios sensoriais nociceptivos e funcionais nas culturas primárias. Inicialmente foi diluída em dimetilsulfóxido 1% (DMSO) e estocada na concentração de 10 mM, e posteriormente diluída em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 1 µM.
- Diazóxido (Sigma): Promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, foi diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 10 µM.
- Dibutiril-AMPc (db-APMc) (Sigma): Análogo do AMPc, foi diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 100 µM.
- DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes): É um indicador de potencial de repouso celular que penetra em células despolarizadas e se liga à membrana plasmática ou proteínas intracelulares e exibe fluorescência. Foi inicialmente diluído em DMSO 1% e

estocado na concentração de 10 mM, e posteriormente diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 5 µM.

- Glibenclamida (Sigma): Bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP. Foi inicialmente diluído em DMSO 1% e estocado na concentração de 200 mM, e posteriormente diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 5 µM.
- H89 (Tocris Biosciences Inc): Inibidor de proteína quinase A (PKA), foi diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 100 µM.
- Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) (Sigma): Mediador do processo inflamatório que possui a capacidade de sensibilizar neurônios sensoriais periféricos. A PGE<sub>2</sub> foi diluída em etanol absoluto e estocada na concentração de 1 mM e, posteriormente, diluída em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizada *in vitro* nas concentrações finais de 1, 10 e 100 nM. Para os ensaios *in vivo*, a PGE<sub>2</sub> foi diluída em salina e injetada nos animais na concentração de 100 ng por pata.
- Sulfato de morfina (Cristália): Promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP. Foi diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 10 µM.
- Tetraetilamonio- TEA (Sigma): Bloqueador de canais de potássio retificadores tardios. Foi inicialmente diluído em água e estocado na concentração de 0,5 M, e posteriormente diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 10 mM.
- 4-aminopiridina -4-AP (Sigma): Bloqueador de canais de potássio do tipo A, foi diluído em meio de cultura Hanks/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 10 mM.

#### **4.3 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal**

As culturas de GRD seguiram protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003). Os animais foram anestesiados em isofurano, eutanasiados por decapitação, e os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica removidos (16 a 18 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanolsulfônico). As células foram dissociadas enzimaticamente por

incubação a 37°C durante 75 minutos em meio Hanks/Hepes contendo 0,28 U/ml de colagenase e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur de vidro, e então cultivadas em placas de cultura cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>(37°C) com o mesmo meio de cultura DMEM e utilizadas após 24 horas.

#### 4.4 Microscopia Confocal

Após 24 horas de incubação as placas de cultura foram lavadas em meio Hanks/ Hepes e incubadas com 5 µM do indicador de potencial de repouso DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes) por 30 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. Este indicador penetra em células despolarizadas, de tal modo que o aumento da despolarização celular resulta em um influxo maior do indicador e, por consequência, da fluorescência. Por outro lado, a hiperpolarização é indicada por uma diminuição da fluorescência.

A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Inicialmente foram selecionados os parâmetros de filtro de emissão (510-574) e comprimento de onda de excitação (488 nm). A área de interesse foi selecionada nas placas de cultura utilizando um aumento de 400x, e após a seleção do campo, as imagens foram registradas durante 10 minutos em intervalos de 3 segundos, imediatamente após administração de 10 µL de PGE<sub>2</sub>, db-AMPc, H89 e morfina ou após 15 minutos da administração de 10 µL de 4-AP, TEA e Glibenclamida. Após cada teste, as placas receberam capsaicina (1 µM) e uma nova série de imagens foi registradas durante 2 minutos. Com exceção do experimento que avaliou o diâmetro dos corpos celulares do neurônios, apenas os neurônios nos quais houve uma despolarização da membrana em resposta à capsaicina foram selecionados para a análise. A sensibilidade à capsaicina permitiu a seleção de neurônios nociceptivos e que estavam funcionais nas culturas primárias.

Para a análise das imagens foi utilizado o software de domínio público ImageJ (Desenvolvido por Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Utilizando este software, inicialmente foram selecionadas as áreas correspondentes a neurônios (ROI – region of interest) nas séries temporais de imagens obtidas durante tratamento com capsaicina, o qual foi obtido ao final dos experimentos. Em seguida foram obtidos os valores médios de

fluorescência, dos mesmos neurônios selecionados, no período dos 10 minutos iniciais (série temporal de imagens antes da capsaicina). Assim, foi obtido o valor de intensidade de fluorescência ao longo do tempo para cada neurônio tratado. Em seguida os valores foram normalizados utilizando a primeira imagem de cada série, considerada F<sub>0</sub>. Deste modo, obtivemos a variação de fluorescência em relação à fluorescência basal ( $\Delta F/F_0$ ) de maneira que os resultados mostrassem a variação do potencial de repouso após os tratamentos. Para análise estatística foram considerados os valores máximos de variação de fluorescência para cada um dos neurônios avaliados.

Também foram avaliados os diâmetros dos corpos celulares dos neurônios responsivos à PGE<sub>2</sub>, calculados pelo diâmetro de Feret, essa fórmula calcula o maior diâmetro entre dois pontos da área selecionada. Foram consideradas respostas positivas os neurônios que tiveram mais de 20% de aumento de fluorescência após 10 minutos da administração de PGE<sub>2</sub> (100 nM).

#### **4.5 Avaliação do efeito da injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> no potencial de repouso de neurônios sensoriais**

Para avaliação do efeito da injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> no potencial de repouso de neurônios sensoriais, a droga foi injetada na pata traseira direita dos animais. Após 120 minutos, foi avaliada a sensibilidade mecânica das patas direita (tratada com PGE<sub>2</sub>) e das patas esquerdas (controle). O teste de sensibilidade foi realizado através do aparelho von Frey eletrônico, conforme descrito abaixo. Após o teste comportamental, os animais foram eutanasiados e os gânglios da região de L4 e L5 dos lados direito e esquerdo foram removidos. A cultura de gânglio da raiz dorsal foi realizada conforme descrito abaixo, sendo uma cultura de gânglios direitos e uma de gânglios esquerdos. Foram preparadas 4 placas da cultura dos gânglios direitos (ipsilateral ao tratamento) e 4 placas de células dos gânglios esquerdos (contralateral).

##### **4.5.1 Administração intraplantar de PGE<sub>2</sub>**

A PGE<sub>2</sub> foi injetada no tecido subcutâneo da pata traseira direita das ratas por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa, inserida no centro da porção plantar da pata, entre as cinco calosidades distais. Foram injetados 50 µL de solução contendo 100 ng de PGE<sub>2</sub> por pata.

#### **4.5.2 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico**

A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada pelo método de pressão crescente previamente descrita por Moller e colaboradores (1998). Avaliou-se a sensibilidade mecânica dos animais utilizando o teste de Von Frey eletrônico em condições basais e após 120 minutos da injeção intraplantar subcutânea de 50 µL de solução contendo 100 ng de PGE<sub>2</sub> na pata traseira direita dos animais. A pata traseira esquerda foi utilizada como controle.

O aparelho utilizado para o teste de pressão crescente (Von Frey eletrônico, Insight, Ribeirão Preto, Brasil) é composto por um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força, que é expressa em gramas. A precisão do aparelho é de 0,1 g e este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de força com a pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor.

Para a realização do teste, os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos estão posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Foram realizadas quatro medidas distintas para cada animal e calculada uma média aritmética dos valores obtidos.

Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor).

#### **4.5.3 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal**

A cultura de células dos neurônios dos gânglios da região de L4 e L5 foi realizada conforme protocolo descrito no item 4.3 desta seção, com a única diferença de que as placas foram incubadas por 60 minutos. Foram realizadas culturas distintas de gânglios obtidos da região direita e esquerda, uma vez que a PGE<sub>2</sub> foi injetada na pata traseira direita dos animais. Os gânglios da região esquerda foram utilizados como controle.

#### 4.5.4 Microscopia confocal

Após 60 minutos de incubação as placas foram lavadas em meio Hanks/ Hepes e incubadas com 5 µM do indicador de potencial de repouso DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes) por 30 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Para a análise das imagens foi utilizado o software de domínio público ImageJ (Desenvolvido por Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Utilizando este software foram selecionadas as áreas correspondentes aos neurônios (ROI – region of interest).

Para avaliar o potencial de membrana de neurônios obtidos de animais tratados *in vivo* com PGE<sub>2</sub>, foi obtida apenas a fluorescência basal de cada placa. Neste experimento foi necessária uma normalização visto que as placas estavam apresentando diferentes níveis de fluorescência emitida pelo DiBAC<sub>4</sub>(3). Esta diferença pode ser causada por diferenças no tempo de incubação ou perda de fluorescência devido à exposição à luz (*photobleaching*). Para esta normalização utilizamos a fluorescência emitida por restos de mielina, que ficam dispersos pela placa na cultura primária de GRD. Por ser formada por membrana celular totalmente despolarizada, a mielina apresenta uma fluorescência que varia apenas de acordo com a fluorescência do indicador DiBAC<sub>4</sub>(3). Foi realizada uma média da fluorescência emitida por quatro regiões de mielina e a fluorescência das células foi normalizada tomando a fluorescência da mielina como 100%.

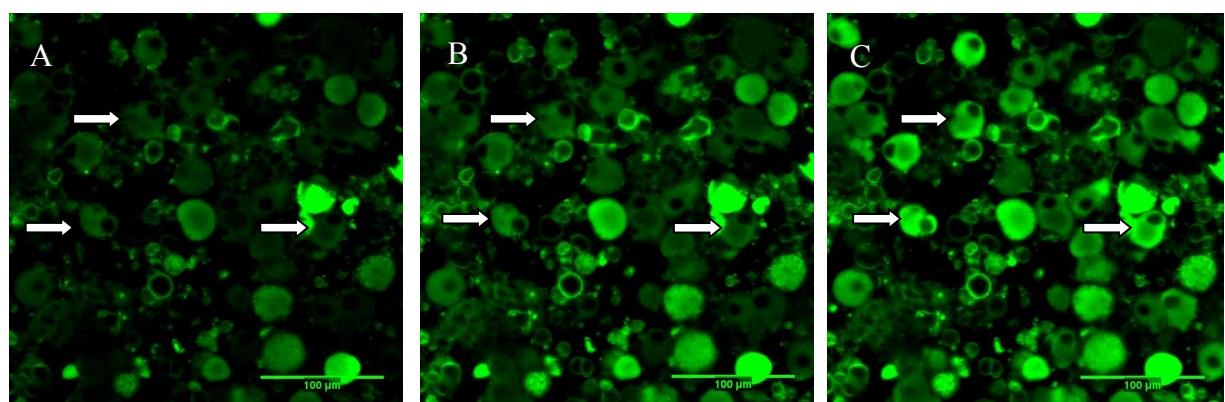
#### 4.6 Análise Estatística

As médias dos valores obtidos para cada tratamento foram comparadas através de teste t (comparação entre duas médias) ou ANOVA (mais de duas médias) seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni (quando houve diferença significativa entre os tratamentos testados). O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p<0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.

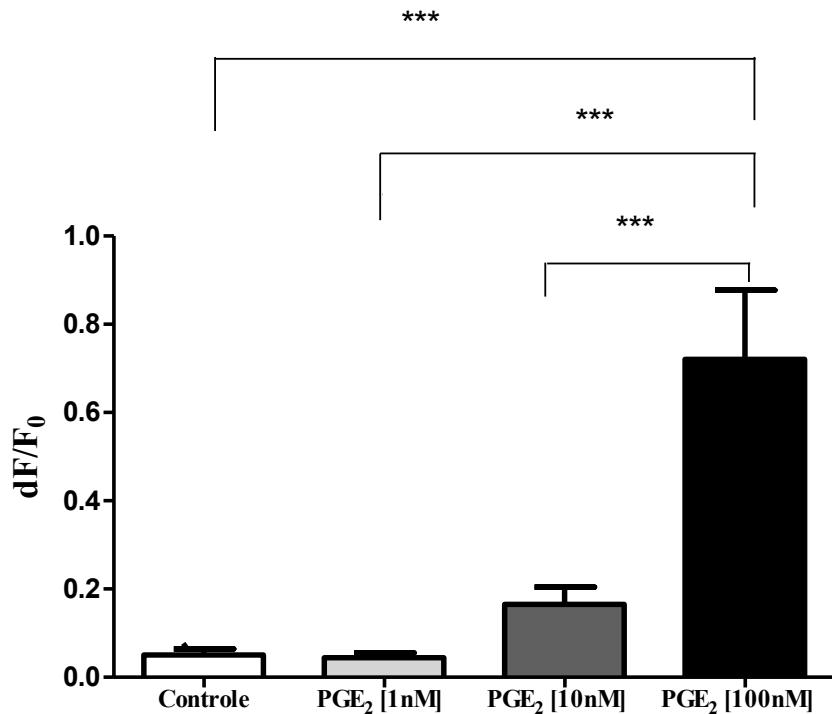
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários

O potencial de repouso de neurônios em culturas primárias de GRD foi avaliada através de microscopia confocal utilizando o indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3). A PGE<sub>2</sub> foi administrada diretamente nos neurônios em cultura nas concentrações de 1, 10 e 100 nM e um sequência de imagens foi obtida durante 10 minutos (Figuras 1A-B e Figura 2). Após administração de PGE<sub>2</sub>, foi realizada administração de capsaicina (Figura 1C). A capsaicina ativa receptores TRPV1, característicos de fibras C nociceptivas. A administração de capsaicina foi utilizada como controle positivo para permitir a seleção de neurônios nociceptivos viáveis na cultura. Deste modo, para quantificação (Figura 2) foram considerados aqueles neurônios que responderam à capsaicina.



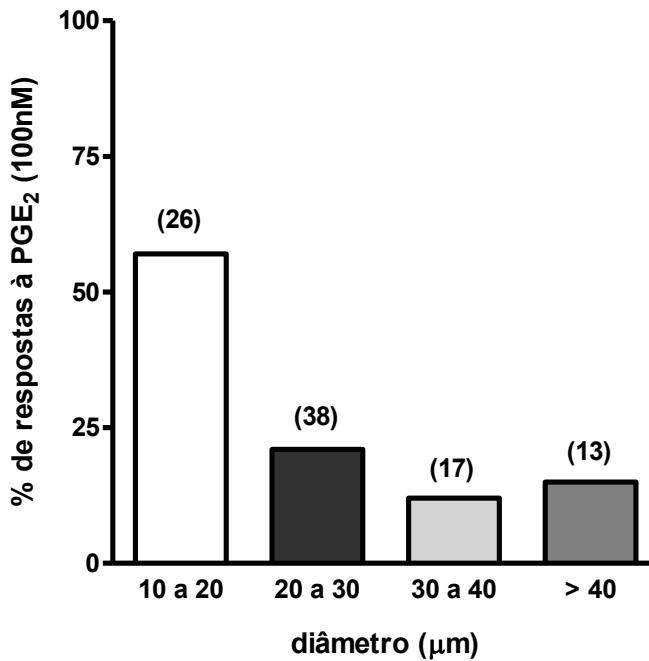
**Figura 1-** Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal. B: Após 10 minutos da administração de PGE<sub>2</sub> (100 nM). C: Após 2 minutos da administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Aumento 400x.



**Figura 2-** Efeito da PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração de PGE<sub>2</sub> (1, 10 e 100 nM). Dados mostrados como média ± E.P.M de 20 a 150 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni).

Houve diferença significativa entre a despolarização causada pela administração de PGE<sub>2</sub> 100 nM (média= 0.7204 ± 0.1566, n=31) e o controle (média =0.05043 ± 0.01414, n=150), e também entre as concentrações de 1 nM (média= 0.04436 ± 0.01103, n=20) e 100 nM e de 10 (média= 0.1650 ± 0.03929, n=37 ) e 100 nM. Os resultados evidenciam que a PGE<sub>2</sub> é capaz de despolarizar os neurônios sensitivos primários em cultura e de maneira dependente da concentração.

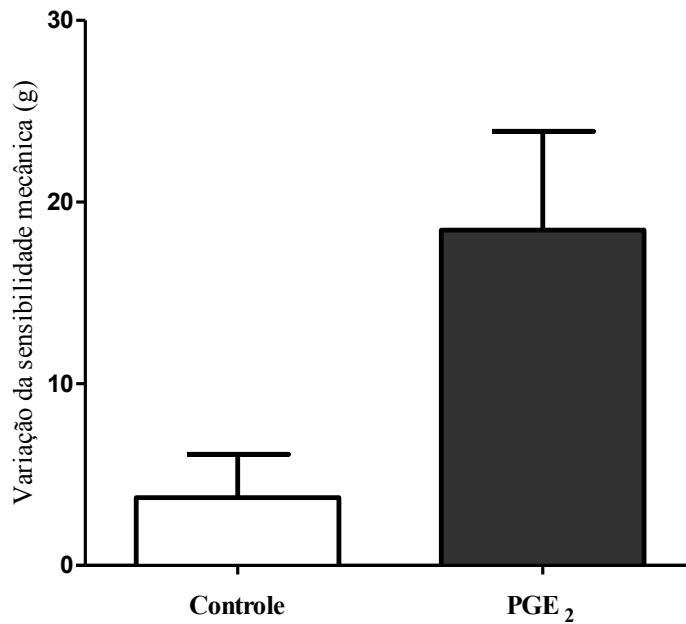
Além de avaliar respostas dos neurônios à PGE<sub>2</sub>, também foi avaliado o diâmetro do corpo celular dos neurônios responsivos a PGE<sub>2</sub> na concentração de 100 nM (Figura 3), uma vez que os nociceptores podem ser diferenciados dos demais neurônios sensitivos presentes no GRD principalmente pelo menor diâmetro do corpo celular (GOLD; DASTMALCHI, LEVINE, 1996c). Foram considerados responsivos à PGE<sub>2</sub> (100 nM) os neurônios que tiveram mais de 20% de aumento de fluorescência após 10 minutos da sua administração.



**Figura 3-** Diâmetros dos neurônios que responderam à PGE<sub>2</sub> (100 nM). O gráfico mostra a percentagem de neurônios que responderam à PGE<sub>2</sub> dentre um total de neurônios indicados entre parênteses. Foram consideradas respostas aumentos de fluorescências maiores de 20% após 10 minutos da administração de PGE<sub>2</sub>.

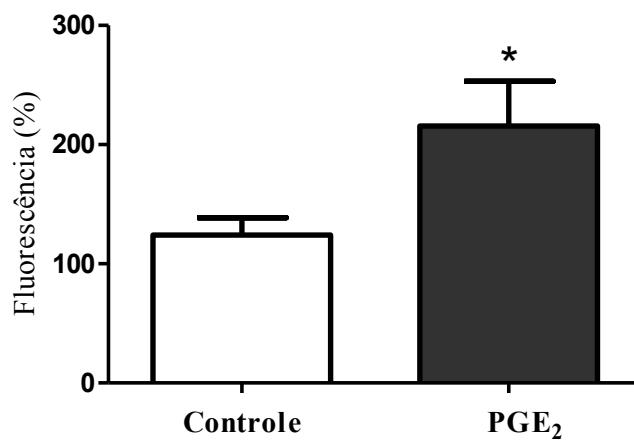
Os neurônios de diâmetro pequeno mostraram-se mais responsivos à PGE<sub>2</sub> (100 nM): 57% de neurônios de 10 a 20  $\mu\text{m}$  despolarizaram (15 de 26 neurônios testados) enquanto foram observadas: 21 % de respostas dos neurônios de 20 a 30  $\mu\text{m}$  (8 em 38 neurônios), 12% de respostas dos neurônios de 30 a 40  $\mu\text{m}$  (2 em 17 neurônios) e 12% de respostas de neurônios maiores que 40  $\mu\text{m}$  (2 em 13 neurônios).

Para avaliar se a despolarização dos neurônios por PGE<sub>2</sub> está de fato envolvida no processo de hiperalgesia, foi avaliado o potencial de membrana de neurônios obtidos dos gânglios direitos (L4 e L5) de animais sensibilizados por injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (100 ng, pata direita) comparando com neurônios obtidos dos gânglios contralaterais (L4 e L5 esquerdos). Inicialmente foi avaliada a alteração de sensibilidade mecânica nas patas traseiras direitas e esquerdas de animais tratados com PGE<sub>2</sub> (Figura 4). Observa-se um aumento de sensibilidade mecânica nas patas tratadas com PGE<sub>2</sub>, que apesar de não estatisticamente significante pelo pequeno número de animais ( $n=3$ ), é suficiente para mostrar que os animais foram sensibilizados.



**Figura 4-** Avaliação da sensibilidade mecânica (von Frey eletrônico) de ratas Wistar após 120 minutos da administração de PGE<sub>2</sub> (100 ng) na pata direita, pata esquerda utilizada como controle. Médias de 3 animais.  $p= 0,13$  (Dados avaliados por teste t pareado).

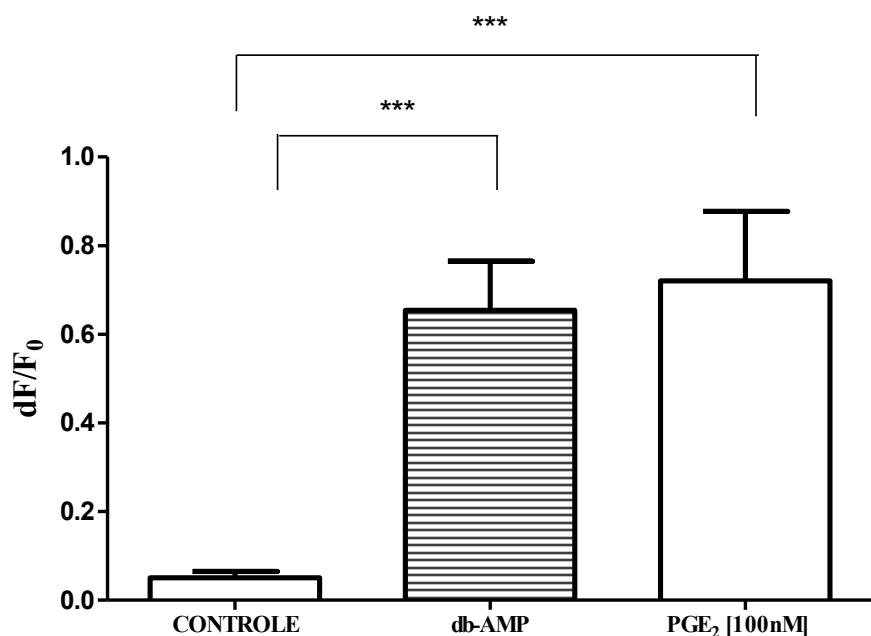
Imediatamente após avaliação da sensibilidade mecânica, foi realizada a cultura dos neurônios dos GRD da região de L4 e L5, e os resultados mostraram que o tratamento prévio dos animais com PGE<sub>2</sub> causou uma despolarização dos neurônios quando comparado aos neurônios obtidos dos gânglios contralaterais (Figura 5).



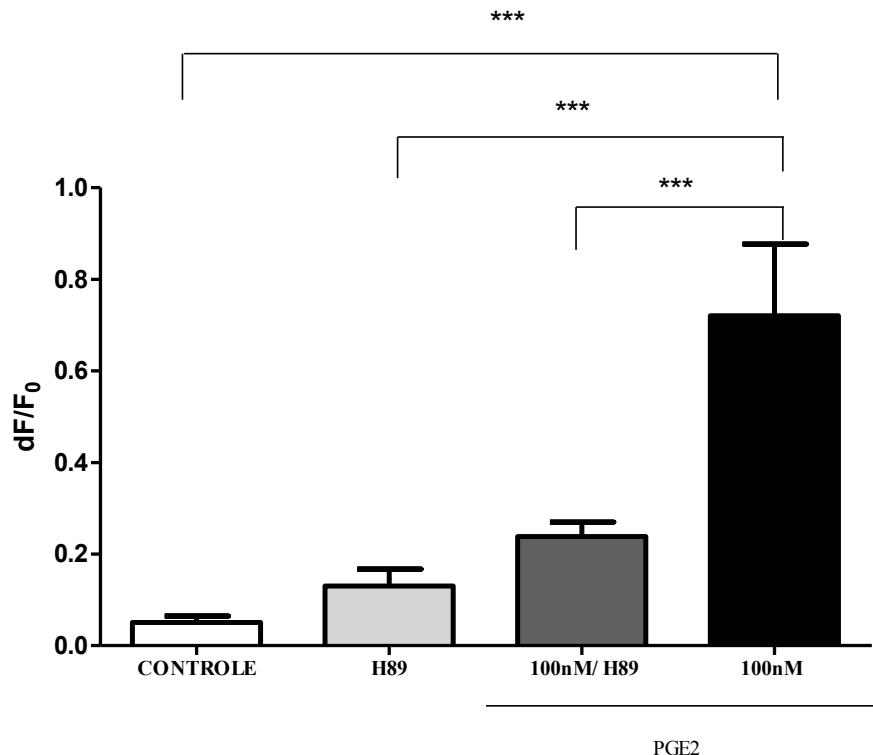
**Figura 5-** Efeito da administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. Foram realizadas culturas de neurônios ipsilaterais e contralaterais (controle) ao tratamento com PGE<sub>2</sub>. Dados mostrados como média ± E.P.M de 20 a 23 neurônios. \* $p<0,03$  (Dados avaliados por teste t pareado).

## 5.2 Papel do AMPc sobre a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> em neurônios nociceptivos primários

Estudos anteriores relatam que o efeito hipernociceptivo da PGE<sub>2</sub> deve-se à formação de AMPc e que este último atua através da ativação de PKA (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Para avaliar o efeito direto do AMPc sobre o potencial de repouso dos neurônios sensitivos primários em cultura e correlacionar a despolarização observada pela administração de PGE<sub>2</sub> com a ativação dessa via, foi utilizado um análogo a AMPc, estável e permeável à membrana celular, o dibutiril-AMPC (db-AMPc) (Figura 6) e também um antagonista de PKA, o H89, que foi administrado sozinho ou juntamente com PGE<sub>2</sub> (Figura 7). As concentrações testadas foram utilizadas com base em dados encontrados na literatura e em experimentos prévios (EVANS; VASKO; NICOL, 1999).



**Figura 6-** Efeito da ativação da via AMPc/PKA sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após administração de dibutiril-AMPC (100  $\mu$ M). Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M de 36 a 150 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni).



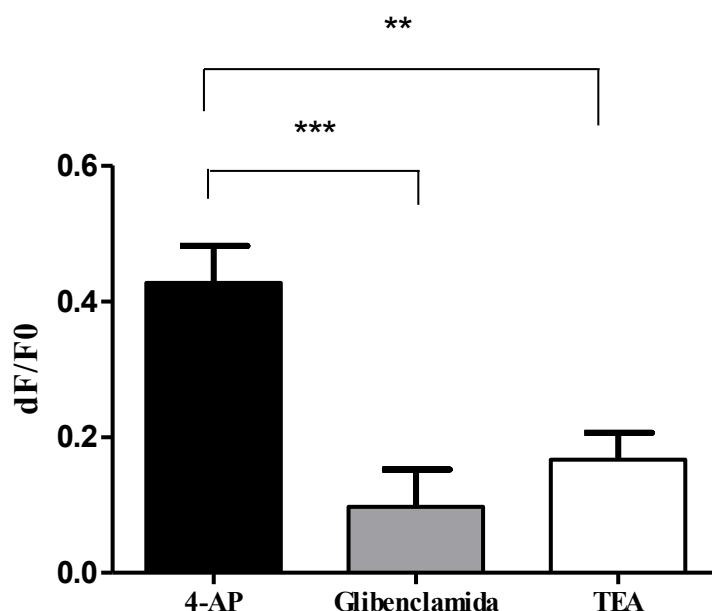
**Figura 7-** Efeito da ativação da via AMPc/PKA sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração de H89 (100  $\mu$ M), H89 e PGE<sub>2</sub> (100 nM) ou apenas PGE<sub>2</sub> (100 nM). Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M de 23 a 150 neurônios. \*\*\* $p<0,0001$  (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni).

A administração de db-AMPc (100  $\mu$ M) resultou em uma despolarização dos neurônios em cultura (média= 0.6541  $\pm$  0.1108, n =36), significativamente diferente do observado no controle (média= 0.2380  $\pm$  0.03162, n=29) e semelhante à despolarização causada por PGE<sub>2</sub> (100 nM) (Figura 6). Além disso, a PGE<sub>2</sub> teve seu efeito inibido por H89 (100  $\mu$ M) (Figura 7) (média= 0.2380  $\pm$  0.03162, n=29), corroborando com a hipótese de que a despolarização causada por PGE<sub>2</sub> ocorre mediante ativação de AMPc/PKA.

### 5.3 Envolvimento de canais de K<sup>+</sup> no efeito da PGE<sub>2</sub> sobre o potencial de repouso

Os canais de K<sup>+</sup> são os principais responsáveis pelo ajuste do potencial de repouso neuronal e já foi descrita a inibição induzida por PGE<sub>2</sub> sobre correntes de K<sup>+</sup> (EVANS; VASKO; NICOL, 1999; JIANG et al., 2003). No presente trabalho foi avaliado papel dos canais de K<sup>+</sup> na despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> na cultura de neurônios, utilizando os seguintes bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>: glibenclamida (bloqueador de canais sensíveis a

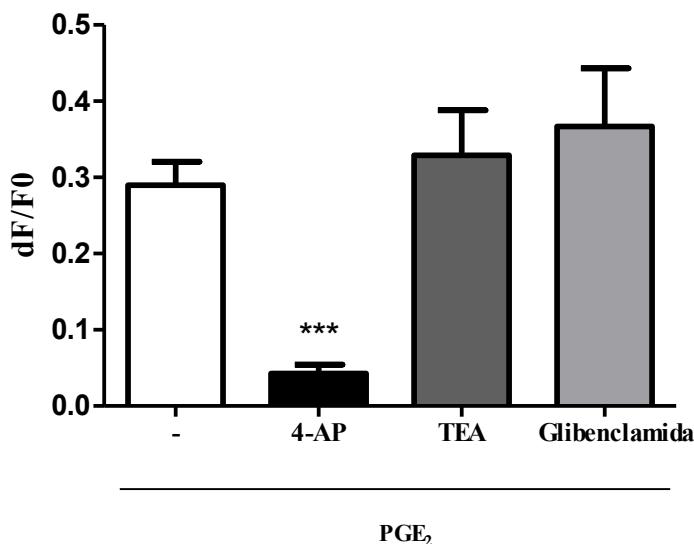
ATP), tetraetilâmônio (TEA, bloqueador de canais retificadores tardios) e 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canais do tipo A) (Figura 8).



**Figura 8-** Efeito de bloqueadores de canais de  $K^+$  sobre o potencial de repouso de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Efeito avaliado após 15 minutos da administração de 4-AP (10 mM), glibenclamida (5  $\mu$ M) ou TEA (10 mM). Dados mostrados como média  $\pm$  E. P.M de 8 a 12 neurônios. \*\*  $p<0,005$ , \*\*\* $p<0,0001$  (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni).

Os resultados mostraram que a administração de 4- AP (média=  $0.4275 \pm 0.05444$ , n=12) causou uma despolarização maior do que a induzida por glibenclamida (média=  $0.09738 \pm 0.05495$  n=8) e TEA (média=  $0.1665 \pm 0.03994$ , n=11).

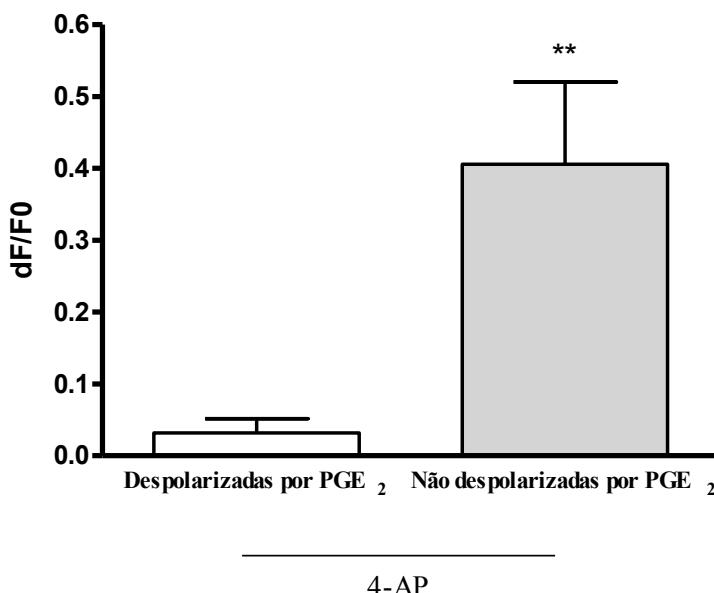
Para avaliar se os bloqueadores seletivos para os canais de  $K^+$  testados estão atuando sobre o mesmo tipo de canal que a PGE<sub>2</sub>, foi administrado PGE<sub>2</sub> (100 nM) após 15 minutos da administração de 4-AP (10 mM), TEA (10 mM) ou glibenclamida (5  $\mu$ M) (Figura 9).



**Figura 9-** Efeito da PGE<sub>2</sub> (100 nM) na presença dos bloqueadores seletivos para canais de K<sup>+</sup>: 4-AP (10 mM), TEA (10 mM) ou glibenclamida (5 μM) foram administrados 15 minutos antes de PGE<sub>2</sub>. Dados mostrados como média e E.P.M de 5 a 11 neurônios. \*\*\*p<0,0001 (Dados avaliados por Anova e pós-teste de Bonferroni).

A administração dos bloqueadores 15 minutos antes de PGE<sub>2</sub> (100nM) mostrou que a PGE<sub>2</sub> não altera a fluorescência de neurônios despolarizados por 4-AP (média= 0.04282 ± 0.01148 , n=11) , mas é capaz de despolarizar os neurônios na presença de TEA ( média= 0.3289 ± 0.05918, n=7) e glibenclamida ( média= 0.3668 ± 0.07651, n=5) (Figura 9). Esses resultados indicam que a PGE<sub>2</sub> atua sobre os mesmos canais bloqueados por 4-AP, os canais de tipo A.

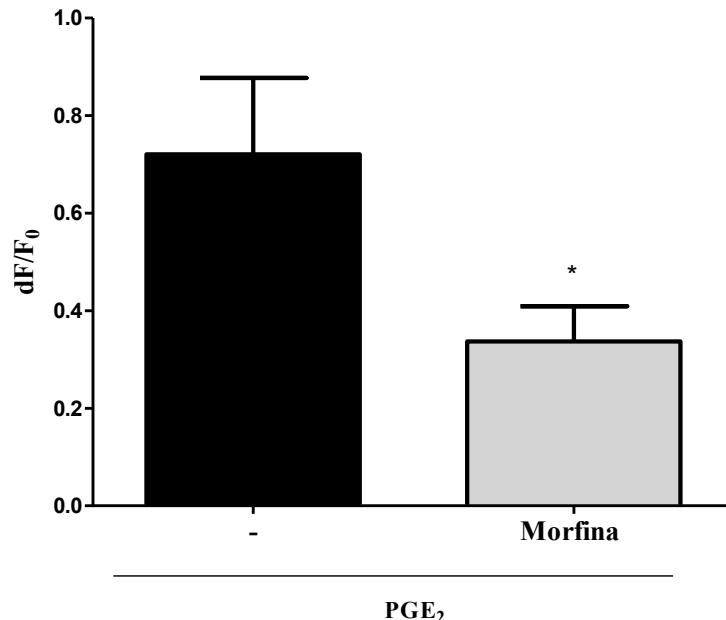
Além disso, quando administrado 15 minutos após PGE<sub>2</sub> (100 nM), 4-AP não alterou o potencial dos neurônios que foram despolarizados por PGE<sub>2</sub> ( média= 0.4060 ± 0.1144, n=5) (Figura 10), corroborando com os resultados anteriores.



**Figura 10-** Efeito de 4-AP após administração de PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> (100 nM) foi administrada 15 minutos antes de 4-AP (10 mM). O gráfico mostra separadamente o efeito de 4-AP sobre as células que foram despolarizadas pela administração de PGE<sub>2</sub> (6 células) e que não foram despolarizadas por PGE<sub>2</sub> (5 células) em duas placas diferentes. Os dados estão sendo mostrados como média ± E.P.M. \*\* p < 0,005 (Dados avaliados por teste t).

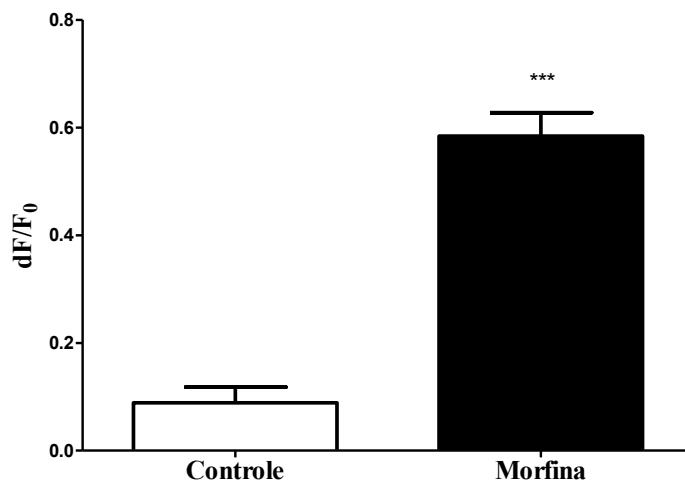
#### 5.4 Efeito da morfina sobre o potencial de repouso de neurônios sensitivos primários

Estudos indicam que o efeito analgésico induzido pela administração periférica de morfina depende da abertura de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (CUNHA et al., 2010). Os experimentos realizados neste trabalho indicaram que a PGE<sub>2</sub> induz o fechamento de outro tipo de canal de K<sup>+</sup>, os canais tipo A sensíveis a 4-AP. Primeiramente foram realizados experimentos para avaliar o efeito da morfina sobre a despolarização induzida pela PGE<sub>2</sub> (100 nM) (Figura 11).



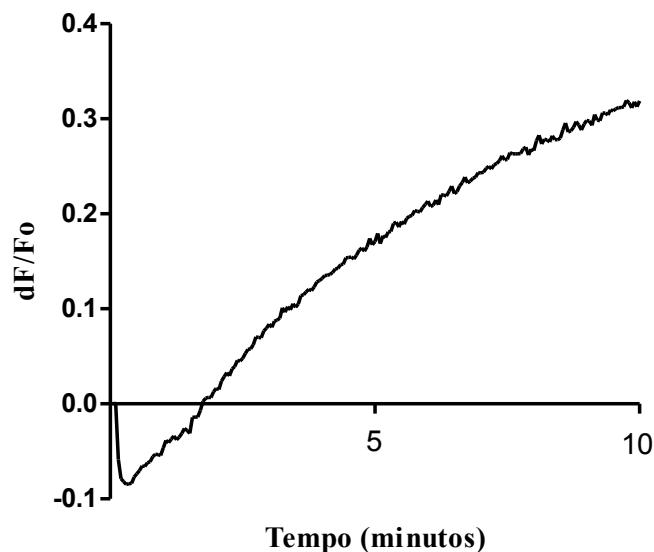
**Figura 11-** Efeito da morfina sobre a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> (100 nM). O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após a administração da morfina juntamente com PGE<sub>2</sub> (100 nM) ou apenas PGE<sub>2</sub> (100 nM). Dados mostrados como média ± E.P.M de 31 a 49 neurônios. \*p< 0,05 significativamente diferente entre PGE<sub>2</sub> 100 nM e Morfina/PGE<sub>2</sub> 100 nM (Dados avaliados por teste t).

Os resultados mostraram que a morfina (10  $\mu$ M), quando administrada juntamente com a PGE<sub>2</sub> (100 nM) (média=  $0.3370 \pm 0.07248$ , n=49), é capaz de inibir a despolarização causada por ela (média = $0.7204 \pm 0.1566$ , n=31). Também foi avaliado efeito direto da morfina sobre o potencial de repouso dos neurônios sensitivos (Figura 12).



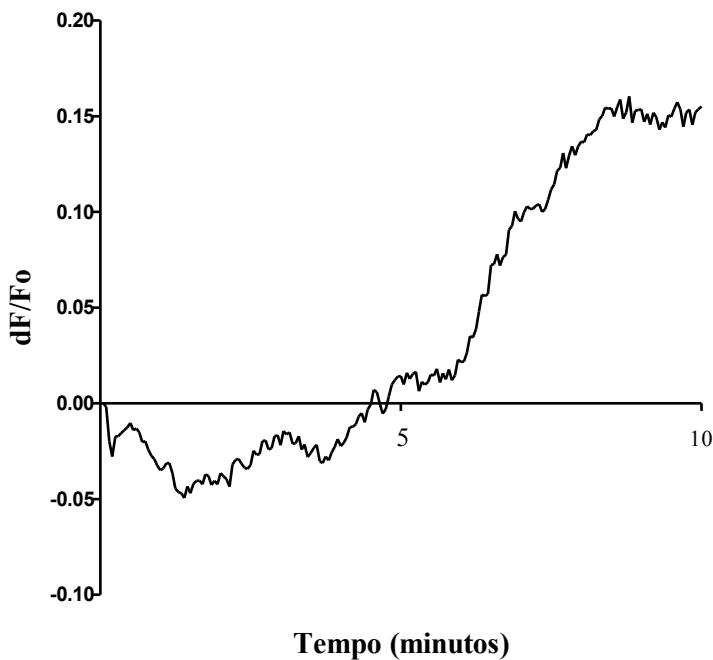
**Figura 12-** Efeito da morfina sobre o potencial de repouso nos neurônios sensitivos periféricos. O efeito foi avaliado durante 10 minutos imediatamente após administração da morfina. Dados mostrados como média ± E.P.M de 8 a 26 neurônios. \*p< 0,0001 significativamente diferente entre controle e Morfina (10  $\mu$ M) (Dados avaliados por teste t).

Os resultados mostraram que a morfina causou uma despolarização (média=  $0.5845 \pm 0.04319$ , n=26) significantemente diferente do controle (média=  $0.08866 \pm 0.02939$ , n=8). Este resultado a princípio não era esperado, uma vez que a morfina, como citado anteriormente, atua na abertura de canais de  $K^+$ . Contudo, análise da resposta a morfina durante os 10 minutos nos quais foram feitas as imagens (Figura 13) mostrou que existe um período inicial onde ocorre hiperpolarização dos neurônios, seguido então da despolarização deste. A morfina poderia induzir a abertura dos canais de  $K^+$  e esse evento é seguido pela abertura de outros canais, como resposta, ocasionando o resultado encontrado.



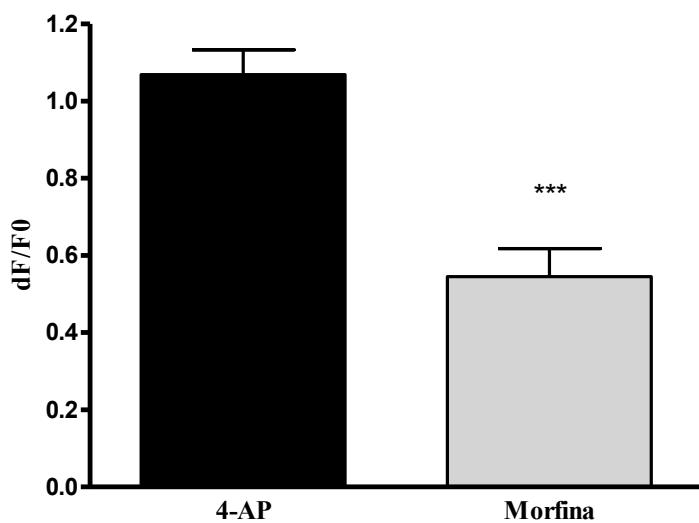
**Figura 13-** Efeito da morfina (10  $\mu M$ ) sobre o potencial de repouso de neurônio sensitivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.

Após a observação desse efeito da morfina, foi realizado um experimento utilizando diaxózido (10  $\mu M$ ), que promove a abertura de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, assim como a morfina (Figura 14), e o resultado encontrado foi semelhante: uma hiperpolarização inicial acompanhada de uma despolarização subsequente.



**Figura 14-** Efeito diazóxido (10  $\mu\text{M}$ ) sobre o potencial de repouso de neurônio sensitivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.

Os resultados mostrados anteriormente indicam que a PGE<sub>2</sub> induz o fechamento de canais de K<sup>+</sup> do tipo A sensíveis a 4-AP (Figuras 9 e 10). Além disso, a morfina foi capaz de reverter a despolarização causada pela PGE<sub>2</sub> (Figura 11). Decidiu-se, então, verificar se a morfina seria capaz de alterar o potencial de repouso de neurônios despolarizados por 4-AP (Figura 15).



**Figura 15-** Efeito da morfina em células despolarizadas por 4-AP. O efeito foi avaliado após 15 minutos da administração de 4-AP (10 mM) e, nas mesmas células a fluorescência observada após 15 minutos da administração da morfina (10  $\mu\text{M}$ ), na presença de 4-AP. \*\*\*  $p < 0,0001$  significativamente diferente do grupo 4-AP (Dados avaliados por teste t).

Os resultados mostraram que a morfina (média =  $0.5451 \pm 0.07280$ ), conseguiu reverter, de maneira significativa, a despolarização causada pela 4-AP (média=  $1.068 \pm 0.06460$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliada a capacidade da PGE<sub>2</sub> de sensibilizar neurônios sensoriais primários em cultura, fato que já foi abordado em experimentos comportamentais e por meio de técnicas de eletrofisiologia, com o intuito de estabelecer um protocolo de estudo *in vitro* da sensibilização neuronal periférica utilizando microscopia de fluorescência e também uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo.

Os modelos de experimentação animal constituem uma importante ferramenta na pesquisa científica, prática que deve ser pautada em princípios bioéticos para diminuir a dor e o sofrimento imposto a eles (FRANCO et al., 2014). O conceito dos três Rs, *reduction*, *refinement* e *replacement*, para o uso de animais em pesquisa científica foi definido por Russel e Burch, em 1959, no livro: “The Principle of Humane Experimental Technique”, e tem como objetivo a redução do número de animais, o refinamento dos métodos e a reposição ou troca destes métodos por ensaios substitutos ou alternativos *in vitro* (CRUZ; BARBOSA; PINTO, 2004). No Brasil a pesquisa científica com animais segue as diretrizes da lei 11.794/08, a chamada Lei Arouca, que determina, dentre outros, a redução do número de animais para o mínimo indispensável para que o trabalho seja conclusivo (BRASIL, 2008). Baseado nestes princípios, o presente trabalho propõe um modelo de estudo da sensibilização neuronal utilizando cultura de células do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos, com o objetivo de reduzir o número de animais utilizados nos experimentos e proporcionar avanços no conhecimento da sensibilização periférica dos neurônios.

A técnica de avaliação do potencial de membrana por uso do indicador fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3) em culturas de GRD foi utilizada em estudos anteriores (BRITO et al., 2006; CUNHA et al., 2010), tendo permitido um melhor entendimento do mecanismo de ação de substâncias analgésicas. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que PGE<sub>2</sub> induz alteração no potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários em cultura (KASAI; MIZUMURA, 2001). Este tipo de técnica, entretanto, demanda equipamentos e treinamento delicados e específicos, sendo ainda demorada, visto que permite o registro de apenas um neurônio de cada vez. A avaliação de variações no potencial de repouso através de fluorescência permite o registro de muitos neurônios simultaneamente e a experiência prévia com a técnica mostrou que esta é uma forma rápida e com boa reprodutibilidade. Deste modo, decidimos avaliar inicialmente se esta técnica permitira avaliar a sensibilização neuronal induzida por PGE<sub>2</sub> em neurônios nociceptivos primários. Os resultados mostraram que a

administração de PGE<sub>2</sub> despolarizou os neurônios em cultura (Figura 2). A concentração de 100 nM apresentou uma despolarização maior quando comparada com o controle e com as demais concentrações testadas (1 e 10 nM).

Utilizando métodos eletrofisiológicos, Gold e colaboradores (1996c) demonstraram que a PGE<sub>2</sub> induz uma sensibilização de maneira dependente da concentração, e que a sensibilização está associada a uma diminuição do limiar de potencial de ação e um aumento no número de potenciais de ação. Já o trabalho de Kasai e Mizumura (2001), relata que a amplitude de despolarização não altera com a concentração de PGE<sub>2</sub> administrada, mas a porcentagem de neurônios despolarizados varia de maneira proporcional à concentração. Esta variação na porcentagem de neurônios despolarizados não foi observada no presente estudo, visto que a concentração de 10 nM de PGE<sub>2</sub> induz uma tendência a despolarização que não foi estatisticamente diferente do controle e da menor concentração testada (1 nM) e a concentração de 100 nM induziu despolarização de maneira significativa.

Nos testes iniciais foram considerados para análise apenas os neurônios responderam à posterior administração de capsaicina. A capsaicina é um agonista de receptores TRPV1, expressos seletivamente em neurônios associados às fibras do tipo C (CATERINA et al., 2000), que são as principais fibras envolvidas na hiperalgesia inflamatória. Para avaliar se realmente este tipo de neurônio é o principal alvo da ação da PGE<sub>2</sub>, foi avaliado o diâmetro dos neurônios que respondem a PGE<sub>2</sub> (100 nM) (Figura 3), e observou-se que os neurônios de menor diâmetro mostraram-se mais responsivos (10 a 20 µm (57%), 20 a 30 µm (21%), 30 a 40 µm (12%), >40 µm 2/13 (15%)). Esse resultado era esperado, uma vez que os nociceptores podem ser diferenciados dos demais neurônios sensitivos presentes no GRD principalmente pelo menor diâmetro do corpo celular, que dá origem a axônios amielinizados (fibras C), com baixa velocidade de condução. Gold e colaboradores (1996c) verificaram uma alta correlação entre o diâmetro do corpo celular, a imunoreatividade para substância P e CGRP, a presença de inflexão na fase de queda do potencial de ação e a sensibilização por PGE<sub>2</sub> em culturas de neurônios do GRD. Portanto, a despolarização induzida por PGE<sub>2</sub> observada neste estudo parece ser uma resposta de neurônios com características de fibras C nociceptivas.

Além de avaliar o efeito direto da PGE<sub>2</sub> nos neurônios sensoriais em cultura, o presente trabalho também avaliou o efeito da administração *in vivo* da droga sobre os neurônios do GDR. Como já descrito na literatura (FERREIRA et al., 1978; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; SACHS et al., 2009), a administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> provocou um aumento na sensibilidade mecânica nos animais (Figura 4). Neste teste a pata e os gânglios contralaterais (esquerdos) dos animais foram utilizados como controle. Este

aumento de sensibilidade não foi significativo provavelmente por dois motivos: o pequeno número de animais utilizados (apenas três) e o tempo de registro da sensibilidade mecânica (duas horas após a PGE<sub>2</sub>). Este teste, entretanto foi utilizado com a intenção de confirmar o efeito da PGE<sub>2</sub> para a posterior análise dos neurônios em cultura. A retirada apenas dos gânglios nos níveis de L4 e L5 de três animais permitiram o preparo de quatro placas ipsilaterais e mesmo número de placas de gânglios contralaterais ao tratamento. Conforme descrito anteriormente, o pequeno número de animais utilizado é uma das vantagens dos ensaios realizados com culturas primárias de GRD. A avaliação dos neurônios em cultura demonstrou que os neurônios obtidos dos gânglios que inervavam a pata tratada apresentavam o potencial de repouso alterado em relação aos neurônios obtidos dos gânglios contralaterais (Figura 5). Este resultado evidencia que a avaliação da despolarização neuronal utilizando o indicador de fluorescência DiBAC<sub>4</sub>(3) está relacionada com o processo de hiperalgesia mecânico induzido por PGE<sub>2</sub> *in vivo*.

A ação da PGE<sub>2</sub> está associada à ativação da via adenilato ciclase/AMPc/PKA. (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Em estudos eletrofisiológicos de neurônios isolados do GRD foi demonstrado que a ativação de PKA pela PGE<sub>2</sub> leva a inibição de correntes de K<sup>+</sup> e também um aumento das correntes de Na<sup>+</sup>, pela fosforilação de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (Na<sup>+</sup>TTX-R), dois mecanismos importantes para a excitabilidade neuronal (ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD; SHUSTER; LEVINE, 1996b; EVANS; VASKO; NICOL, 1999).

Neste sentido, o presente estudo propôs correlacionar a despolarização observada nos neurônios em cultura em resposta à PGE<sub>2</sub> com a ativação da via adenilato ciclase/AMPc/PKA, e para isso foi testado um análogo ao AMPc, o dibutiril-AMPc (db-AMPc) e o inibidor de PKA, H89. O db-AMPc (100 µM) provocou uma despolarização significativamente diferente com relação ao controle e semelhante ao observado após a administração de PGE<sub>2</sub> 100 nM (Figura 6). O H89 (100 µM) foi administrado juntamente com PGE<sub>2</sub> (Figura 7) e inibiu o efeito de sensibilização ocasionado por ela nos neurônios em cultura. O efeito inibitório de H89 na sensibilização neuronal já havia sido demonstrado em um experimento comportamental, no qual a administração de H89 reverteu a hiperalgesia evocada por injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Os resultados do presente trabalho sugerem que a despolarização dos neurônios sensoriais em cultura por PGE<sub>2</sub> é dependente da ativação da via AMPc/PKA.

Dados da literatura sugerem que a ativação de PKA por PGE<sub>2</sub> leva a uma supressão de correntes de K<sup>+</sup> em neurônios sensoriais em cultura (EVANS; VASKO; NICOL, 1999;

JIANG et al., 2003). Os canais de K<sup>+</sup> são importantes reguladores do potencial de repouso da membrana, repolarização e frequência de potenciais de ação nos neurônios e em outras células eletricamente excitáveis (WAXMAN; ZAMPONI, 2014). A identificação de canais de K<sup>+</sup> específicos nos neurônios nociceptivos que respondam a um mediador inflamatório, como a PGE<sub>2</sub>, é de grande interesse como alvo terapêutico no tratamento da dor periférica.

Neste sentido, Evans e colaboradores (1999) demonstraram, em um estudo eletrofisiológico de neurônios sensoriais isolados de embrião de rato, que um análogo de AMPc (cpt-cAMP) ou PGE<sub>2</sub> provocaram uma supressão de correntes de K<sup>+</sup>, sendo esse efeito dependente da ativação de PKA. Neste estudo os autores concluem que a PGE<sub>2</sub> está atuando sobre canais de K<sup>+</sup> retificadores tardios, que são os canais bloqueados por tetraetilamônio (TEA).

Em outro trabalho, Jiang e colaboradores (2003) avaliaram o efeito de PGE<sub>2</sub> em neurônios sensoriais de camundongos nocautes para o canal Kv1.1, um tipo de canal de K<sup>+</sup> retificador tardio, e observaram que a PGE<sub>2</sub> continuou a inibir correntes de K<sup>+</sup> nesses neurônios. Além de mostrar que este subtipo de canal não é necessário para o efeito da PGE<sub>2</sub>, os autores relatam que nos neurônios sensíveis a capsaicina cultivados a partir de animais adultos a PGE<sub>2</sub> continua a ter efeito após administração do TEA, divergindo do que foi encontrado no trabalho Evans e colaboradores (1999).

As modificações de correntes de K<sup>+</sup> também foram descritas em modelos de dor neuropática. A exposição de neurônios isolados do GRD a IL-1 $\beta$ , cujos níveis são elevados após a constrição crônica do nervo ciático, promoveu um aumento da excitabilidade e uma diminuição profunda de correntes de K<sup>+</sup>, e modificações menos expressivas na função de canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN) e correntes de canais de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+</sup> ativados por tensão. A IL-1 $\beta$ , é uma interleucina inflamatória, e os resultados reforçam a impotância da modulação dos canais de K<sup>+</sup> na ação de mediadores inflamatórios em neurônios do GRD (STEMKOWSKI et al., 2015).

No presente trabalho foram utilizados os seguintes bloqueadores de canais de K<sup>+</sup>: glibenclamida (bloqueador de canais sensíveis a ATP), tetraetilamônio (TEA, bloqueador de canais retificadores tardios) e 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canais do tipo A). Dentre estes bloqueadores, apenas a administração de 4-AP foi capaz de despolarizar os neurônios em cultura de maneira significativa (Figura 8). Além disso, o efeito da PGE<sub>2</sub> não é verificado quando as células foram previamente despolarizadas pela ação da 4-AP (Figura 9), sendo que 4-AP também não atuou sobre células previamente despolarizadas por PGE<sub>2</sub> (Figura 10). Esses resultados indicam que a PGE<sub>2</sub> atua sobre os mesmos canais bloqueados por 4-AP, os canais responsáveis por correntes do tipo A. Reforçando esta hipótese, verificamos que a

PGE<sub>2</sub> continua capaz de despolarizar neurônios na presença dos bloqueadores TEA e glibenclamida, indicando que os canais retificadores tardios e os canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP não estão envolvidos na despolarização induzida por PGE<sub>2</sub>.

Correntes do tipo A, sensíveis a 4-AP, já haviam sido observadas em neurônios do GRD com características de nociceptores (WINKELMAN et al., 2005). Os canais do tipo A são um grupo de canais de K<sup>+</sup> voltagem dependentes, que são ativados de maneira transiente e inativados rapidamente, e nos mamíferos foram identificados cinco canais tipo A: Kv1.4, Kv3.4, Kv4.1 e Kv4.3 que podem ser ativados em baixas ou altas tensões (com exceção de Kv3.4 os demais são ativados em baixas tensões) (CHIEN et al., 2007).

Rasband e colaboradores (2001) demonstraram que a expressão de Kv1.4 é reduzida em neurônios do GRD em modelo animal de dor neuropática, e a expressão desse subtipo de canal de K<sup>+</sup> foi detectada em neurônios de pequeno diâmetro, característica das fibras Aδ e fibras C (RASBAND et al., 2001). Chien e colaboradores (2007) demonstraram, também em modelo de indução de dor neuropática, redução nos níveis de Kv3.4 e Kv4.3 em neurônios do GRD, e que a supressão desses subtipos de canais de K<sup>+</sup>, utilizando injeção intratecal de oligonucleotídeos antisense, provocou hipersensibilidade nos animais.

Yoshida e Matsumoto (2005) verificaram que a administração de 4-AP em neurônios resistentes à tetrodotoxina (TTX) do gânglio trigeminal leva a uma diminuição do potencial de repouso e que esta diminuição aumenta a excitabilidade do neurônio. A inibição de correntes do tipo A também foi observada por Cao e colaboradores (2010), em modelo de indução de neuropatia diabética e posterior análise eletrofisiológica de neurônios do GRD, nos quais também foi detectada uma diminuição significativa do mRNA canais do tipo A.

Além disso, como citado anteriormente, a ação da PGE<sub>2</sub> nos neurônios ocorre mediante ativação de PKA e PKC (MORIYAMA et al.; 2005; SACHS et al., 2009; KAWABATA, 2011), e foi descrito que estas quinases podem diminuir correntes do tipo A em dentritos de neurônios do hipocampo (HOFFMAN; JOHNSTON, 1998).

Os resultados encontrados no presente trabalho, juntamente com os dados da literatura, indicam que canais do tipo A são provável alvo para a ação da PGE<sub>2</sub>. Esse achado é importante, uma vez que, como citado anteriormente, esses canais podem ser possíveis alvos terapêuticos no tratamento da dor.

A analgesia periférica induzida pela morfina ocorre pela ativação de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, e já foi demonstrada que a administração periférica de morfina inibe a hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub> em experimentos comportamentais e também a

despolarização causada por esse mediador inflamatório em cultura de neurônios do GRD (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; CUNHA et al., 2010),

Os resultados do presente trabalho sugerem que a PGE<sub>2</sub> inibe canais de K<sup>+</sup> diferentes daqueles abertos por morfina. Então, para avaliar o efeito da morfina na despolarização causada pela PGE<sub>2</sub>, ambas foram administradas nos neurônios em cultura (Figura 11), sendo que a morfina inibiu o efeito da PGE<sub>2</sub> 100 nM. Porém, quando administrada sozinha, ela causa a despolarização neuronal (Figura 12), resultado que a princípio não era esperado, uma vez que a morfina, como citado anteriormente, atua na abertura de canais de K<sup>+</sup>. Contudo, análise da resposta a morfina durante os 10 minutos nos quais foram feitas as imagens mostrou que existe uma período inicial onde ocorre hiperpolarização dos neurônios, seguido então da despolarização deste (Figura 13). A morfina poderia induzir a abertura dos canais de K<sup>+</sup> e esse evento é seguido por uma modulação de outros canais, como resposta, ocasionado o resultado encontrado.

Para melhor compreensão deste resultado, foi utilizada uma outra droga que promove a abertura de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, o diaxóido, e o efeito observado foi semelhante àquele obtido por administração de morfina (Figura 14), ratificando a idéia de existe uma resposta subsequente ao efeito da morfina/diaxózido, que leva à despolarização.

Os resultados mostraram que a PGE<sub>2</sub> induz o fechamento de canais de K<sup>+</sup> sensíveis a 4-AP, e que a morfina foi capaz de inibir a depolarização causada pela PGE<sub>2</sub>. Nesse sentido, achou-se pertinente verificar se a morfina seria capaz de alterar o potencial de repouso de neurônios despolarizados por 4-AP (Figura 15). Os resultados mostraram que a morfina causa hiperpolarização em neurônios na presença de 4-AP, novamente sugerindo que PGE<sub>2</sub> e morfina atuam sobre canais de K<sup>+</sup> distintos.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de sensibilizar neurônios sensoriais com características de nociceptores e sugerem que a ativação da via de sinalização AMPc/PKA é um etapa importante neste processo. Os resultados são condizentes com trabalhos encontrados na literatura que avaliam sensibilização de neurônios sensoriais periféricos por PGE<sub>2</sub>, mas que utilizam outras metodologia. Dede modo, o modelo *in vitro* proposto poderá contribuir para o entendimento do processo de sensibilização de nociceptores de maneira eficaz e utilizando menor número de animais. Além disso, foi evidenciado que a despolarização causada por PGE<sub>2</sub> parece ser dependente da inibição de correntes de K<sup>+</sup> do tipo A, fato de extrema relevância, uma vez que a identificação de canais envolvidos no processo de sensibilização de nociceptores possibilita o desenvolvimento futuro de alvos terapêuticos no tratamento da dor.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo permitem concluir que:

1. A PGE<sub>2</sub> causa a despolarização da membrana de neurônios sensoriais do GRD de ratos em cultura de maneira dependente da concentração;
2. A resposta à PGE<sub>2</sub> ocorreu predominantemente em neurônios de menor diâmetro, sugerindo que a sensibilização ocorre principalmente em neurônio sensoriais nociceptivos;
3. O efeito da PGE<sub>2</sub> nos neurônios sensoriais em cultura é dependente da ativação da via de sinalização AMPc/PKA;
4. Os resultados encontrados são condizentes com o descrito na literatura até o presente momento, de modo que o estudo da sensibilização de neurônios sensoriais periféricos por meio da utilização da sonda fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3) pode ser uma alternativa aos ensaios comportamentais, que utilizam um número maior de animais, e também uma alternativa aos ensaios *in vitro* que utilizam técnicas de eletrofisiologia;
5. A despolarização causada por PGE<sub>2</sub> nos neurônios sensoriais em cultura é dependente da inibição de correntes de K<sup>+</sup> do tipo A;
6. A identificação de canais iônicos envolvidos na sensibilização de neurônios sensoriais periféricos é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos que levam à dor e também para o desenvolvimento de novas drogas para o seu tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APKARIAN, A.V.; BUSHNELL, M.C.; TREED, R.D.; ZUBIETA, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v.9 , p.463-84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p. 267-284, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; GLAZER, J.M.; TSURUDA, P.R.; BASBAUM, A.I.; STUCKY, C.L.; JORDT, S.E.; JULIUS, D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v. 448, p. 204-208, 2007.
- BENARROCH, E. Canales iónicos em nociceptores. Desarrollo reciente. **American Academy of Neurology**, v. 84, p. 31-42, 2005.
- BRASIL. Lei 11.794, de oito de outubro de 2008. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 15 de novembro de 2017.
- BRITO, G.A.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.L.; LOTUFO, C.M.; FERREIRA, S.H.; RIBEIRO, R.A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/cGMP/PKG/ ATP-sensitive K channel pathway. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1175-8, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04991.x>
- CAO, X.H.; BYUM, H.S.; CHEN, S.R.; CAI, Y.Q.; PAN, H.J. Reduction in Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel Activity in Primary Sensory Neurons in Painful Diabetic Neuropathy: Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, p. 1460–1475, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06863.x>
- CAO, X.H.; CHEN, S.R.; LI, L.; PAN, H.L. Nerve injury increases brain-derived neurotrophic factor levels to suppress BK channel activity in primary sensory neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 121, p. 944-953, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07736.x>
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997. <https://doi.org/10.1038/39807>
- CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p.306-313, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>
- CHEN, S.R.; CAI, Y.Q.; PAN, H.L. Plasticity and emerging role of BKca channels in nociceptive control in neuropathic pain. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, p.352-362, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06138.x>

CHENG, X.; JI, Z.; TSALKOVA, T.; MEI, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 40, p.651–662, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x>

CHIEN, L.Y.; CHENG, J.K.; CHU, D.; CHENG, C.F.; TSAUR, M.L. Reduced Expression of A-Type Potassium Channels in Primary Sensory Neurons Induces Mechanical Hypersensitivity. **Neurobiology of Disease. The Journal of Neuroscience**, v. 27, p.9855-9865, 2007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-07.2007>

CLARK, P.; ROWLAND, S.E.; DENIS, D.; MATHIEU, M.C.; STOCCHIO, R.; POIRIER, H. MF498 [N-{{4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-methylbenzyl}sulfonyl}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a selective E prostanoïd receptor 4 antagonist, relieves joint inflammation and pain in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.325, p.425–434, 2008. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134510>

COLUCCI, J.; BOYD, M.; BERTHELETTE, C.; CHIASSON, J.F.; WANG, Z.; DUCHARME, Y. Discovery of 4-[1-[(1-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-1H-indol-7-yl]carbonyl)amino]cyclopropylbenzoic acid (MF-766), a highly potent and selective EP<sub>4</sub> antagonist for treating inflammatory pain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p. 3760-3763, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.065>

CRUZ, A.S.; BARBOSA, M.L.; PINTO, T.J.A. Testes in vitro como alternativa aos testes in vivo de Draize. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, p. 1-9, 2004.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**. v.104, p. 765, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12502.x>

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP- on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.127, p.671-678, 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702601>

CUNHA, T.M.; CAMPOS, D.R.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kγ/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **PNAS**, v.107, p.4442- 4447, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914733107>

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY,P.T.; OVEREND, P.; HARRIES, M.H.; LATCHEAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v.405, p.183-187, 2000. <https://doi.org/10.1038/35012076>

DELLAROZA, M.S.G.; FURUYA, R.K.; CABRERA, M.A.S.; MATSUO, T.; TRELHA, C.; YAMADA, K.N.; PACOLA, L. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, p. 36-41, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000100018>

DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal of Pharmacology**, v.149, p.611-23, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706923>

DJOUHRI, L.; LAWSON, S. N. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v.46(2), p.131-145, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.015>

DOYLE, D.A.; CABRAL, J.M.; PFUETZNER, R.A.; KUO, A.L.; GULBIS, J.M.; COHEN, S.L.; CHAIT, B.T.; MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. **Science**, v.280, p.69–77, 1998. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>

DU, X.; WANG, C.; ZHANG,H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. **Molecular Pain** , v. 7, p. 35, 2011. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-35>

DU,X.; GAMPER, N. Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 621-640, 2013. <https://doi.org/10.2174/1570159X113119990042>

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, p. 3760-3772, 2010. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>

ENGLAND, S., BEVAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE $\mu$  modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP—protein kinase A cascade. **Journal of Physiology** ,v. 495, p. 429-440, 1996. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021604>

EVANS, A.R.; VASKO, M.R.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE $\mu$ -induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **Journal of Physiology** , v. 516.1, p. 163-178, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.163aa.x>

FEDULOVA, S.A.; VASILYEV, D.V.; VESELOVSKY. Voltage-operated potassium currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons: ontogenetic aspects. **Neuroscience**, v. 85, p. 497-508, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00600-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00600-3)

FEIN, ALAN. **Nociceptores: As Células que sentem dor**. Ribeirão Preto: Dor On Line, 2011. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>> Acesso em: 30 ago. 2017.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, M.S.A. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin e 2. **Prostaglandins**, v. 16, p: 31-37, 1978. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(78\)90199-5](https://doi.org/10.1016/0090-6980(78)90199-5)

FERREIRA S.H.; NAKAMURA, M. II—Prostaglandin hyperalgesia: The peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, v.18, p.191–200, 1979. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(79\)90104-7](https://doi.org/10.1016/0090-6980(79)90104-7)

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698-700, 1988. <https://doi.org/10.1038/334698a0>

FITZGERALD, E.M.; OKUSE, K.; WOOD, J.N.; DOLPHIN, A.C.; MOSS, S.J. cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin resistant voltage dependent sodium channel SNS. **The Journal of Physiology**, v. 516, p.433-446, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0433v.x>

FRANCO, A.L.; NOGUEIRA, M.N.M.; SOUSA, N.G.K.; FROTA, M.F.; FERNANDES, M.S.; SERRA, M.C. Pesquisa em animais: uma reflexão bioética. **Acta Bioethica**, v. 20, p.247-253, 2014. <https://doi.org/10.4067/S1726-569X2014000200012>

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294, p. 1871-1875, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>

GOLD, M.S.; REICHLING, D.B.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, 1108-1112, 1996a. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1108>

GOLD, M.S.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Characterization of six voltage-gated K<sup>+</sup> currents in adult rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 75, p. 2629-2646, 1996b. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.75.6.2629>

GOLD, M.S.; DASTMALCHI, S.; LEVINE, J.D. Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat *in vitro*. **Neuroscience**, v. 71, p. 265-275, 1996c. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00433-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00433-5)

GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons *in vitro*. **Journal of Neuroscience**, v.18, p.10345-10355, 1998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-24-10345.1998>

GUEGUINOU, M.; CHANTOME, A.; FROMONT, G.; BOUGNOUX, P.; VANDIER, C.; CARTEREAU. K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels: the complex thought. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, p. 2322-2333, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.019>

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12<sup>º</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

GUTMAN, G.A.; CHANDY, K. G; GRISSMER, S.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L.A.; ROBERTSON, G.A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M.C.; STUHMER, W.; WANG, X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p.473-508, 2005. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>

HAEGGSTROM, J.Z.; RINALDO-MATTHIS, A.; WHEELOCK, C.E.; WETTERHOLM, A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. **Biochemical and**

**Biophysical Research Communication**, v. 396, p.135-139, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.140>

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v.23, p.144-50, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02154-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02154-8)

HATAE, N.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostaglandin receptors: advances in the study of EP3 receptor signaling. **The Journal of Biochemistry**, v.131, p. 781-784, 2002.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003165>

HOFFMAN, D.A.; D. JOHNSTON. Downregulation of transient K<sup>+</sup> channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. **Journal of Neuroscience**, v.18, p.3521-3528, 1998.<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03521.1998>

HONORE, E. The neuronal background K2P channels: focus on TREK-1. **Nature Reviews Neuroscience**., v. 8, p. 251-261, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrn2117>

ISHIKAWA, K.; TANAKA, M.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. **Muscle Nerve**, v. 22, p. 502-507, 1999.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199904\)22:4<502::AID-MUS12>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199904)22:4<502::AID-MUS12>3.0.CO;2-K)

JENKINSON. Potassium channels-multiplicity and challenges. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 63-71, 2006.

JIANG, X.; ZHANG, Y.H.; CLARK, J.D.; TEMPEL B.L.; NICOL G.D. Prostaglandin E2 inhibits the potassium current in sensory neurons from hyperalgesic Kv1.1 knockout mice. **Neuroscience**, v. 119, 65, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00073-3)

KANG, D.; CHOE, C.; KIM, D. Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK. **The Journal of Physiology**, v. 564, p. 103-116, 2005.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081059>

KASAI, M.; MIZUMURA, K. Effects of PGE2 on neuron from rat dorsal root ganglia in intact and adjuvant-inflamed rats: role of NGF and PGE2-induced depolarization. **Neuroscience Research**, v. 41, p. 345-353, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(01\)00291-7](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00291-7)

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and Pain-Na Update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 1170-1173, 2011. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1170>

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A delta- or A alpha/beta-fibres. **Exp Physiol**, v. 87, p. 239-244 2002.  
<https://doi.org/10.1113/eph8702350>

LEGLER, D.F.; BRUCKNER, M.; UETZ-VON ALLMEN, E.; KRAUSE,P Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chance s. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.42, p. 198-201, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.015>

LINHART, O.; OBREJA, O.; KRESS, M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v. 118, p. 69-74, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00960-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00960-0)

LIN, C.R.; AMAYA, F.; BARRETT, L.; WANG, H.; TAKADA, J.; SAMAD, T.A. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p. 1096–1103, 2006.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.106.105569>

LINLEY, J.E.; ROSE, K.; OOI, L. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, v. 459, p. 657–669, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0784-6>

MAINCRET, F.; PATEL, A.J.; LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M.; HONORE, E. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 26691-26696, 1999.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26691>

MAINCRET, F.; LAURITZEN, I.; PATEL, A.J.; HEURTEAUX, C.; REYES, R.; LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M.; HONORE, E. TREK-1 is a heat-activated background K<sup>+</sup> channel. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 2483-2491, 2000. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2483>

MALMBERG, A. B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A.I. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC gamma. **Science**, v. 278-283, 1997.  
<https://doi.org/10.1126/science.278.5336.279>

MCMAHON, STEPHEN; BENNETT, DAVID; BEVAN, STUART. Inflammatory mediators and modulators of pain. **Wall and Melzack's textbook of pain**. Churchill Livingstone : Elsevier. p. 49 - 72, 2006.

MELLO, R.D.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanism of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8-16, 2008. <https://doi.org/10.1093/bja/aen088>

MIKI, T.; MATSUNAMI, M.; NAKAMURA, S.; OKADA, H.; MATSUYA, H.; KAWABATA, A. ONO-8130, a selective prostanoid EP<sub>1</sub> receptor antagonist, relieves bladder pain in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. **Pain**, v. 150, p.1373–1381, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.019>

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, p. 4-47, 1998.

MORIYAMA, T.; HIGASHI, T.; TOGASHI, K.; IIDA, T.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; TOMINAGA, T.; NARUMIYA, S.; TOMINAGA, M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Molecular Pain**, v. 1:3, p. 1-13 , 2005. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-1-3>

MURASE, A.; OKUMURA, T.; SAKAKIBARA, A.; TONAI-KACHI, H.; NAKAO, K.; TAKADA, J. Effect of prostanoid EP<sub>4</sub> receptor antagonist, CJ-042,794, in rat models of pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, p. 116-121, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.054>

NAKAO, K.; MURASE, A.; OHSHIRO, H.; OKUMURA, T.; TANIGUCHI, K.; MURATA, Y. CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p.686-694, 2007. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.122010>

NICOL, G.D.; VASKO, M.R.; EVANS, A.R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons.v. **The American Physiological Society**. p. 167-176, 1997.

NOE, J.; ZIMMERMANN, K.; BUSSEROLLES, J.; DEVAL, E.; ALLOUI, A.; DIOCHOT, S.; GUY, N.; BORSOTTO, M.; REEH, P.; ESCHALIER, A.; LAZDUNSKO, M. The mechano-activated K $\beta$  channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 1308-1318, 2009.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.57>

OCANA, M.; POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L.; BAEYENS, J.M., An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 377–378, 1990. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90466-J](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90466-J)

OCANA, M.; BAEYENS, J.M. Differential effects of K $+$  channel blockers on antinociception induced by alpha 2-adrenoceptor, GABAB and kappa-opioid receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p.1049–1054, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13919.x>

OLIVEIRA, L.M. DORES. In: Lente, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap 8, p. 183-201. 2008.

PARK, S.Y.; CHOI, J.Y.; KIM, R.U.; LEE, Y.S.; CHO, H.J.; KIM, D.S.; Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. **Mol Cells**, v. 16, p. 256-259, 2003.

PARK, J.Y.; PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v. 240, p. 119, 229, 2006.

PEIER, A.M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A.C.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; STORY, G.M.; EARLEY, T.J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v.108,p. 705-715, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)

PERGOLIZZI, J.; AHLBECK, K.; ALDINGTON, D.; ALON, E.; COLUZZI, F.; DAHAN, A.; HUYGEN, F.; KOCOT-KEPSKA, M.; MANGAS, A.C.; MAVROCORDATOS, P.; MORLION, B.; MULLER-SCHWEFE, G.; NICOLAU, A.; HERNANDEZ, C.P.; SICHERE, P.; SCHAFER, M.; VARRASSI, G. The development of chronic pain: physiological CHANGE necessitates a multidisciplinary approach to treatment. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, p. 1127-1135, 2013.

PLANT, L.D. A Role for K2P Channels in the Operation of Somatosensory Nociceptors. **Frontiers Molecular Neuroscience**, v. 5, p. 1- 11, 2012.

<https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00021>

PLONER, M.; SORG, C.; GROSS, J. Brain Rhythms of Pain. Trends In Cognitive Sciences. **Cell Press**, v. 21, p. 100-110, 2017.

RAOUF, R.; QUICK, K.; WOOD, J.N. Pain as a channelopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, p. 3745–3752, 2010. <https://doi.org/10.1172/JCI43158>

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004.

RASBAND, M.N.; PARK, E.W.; VANDERAH, T.W.; JOSEPHINE,L.; PORRECA,F.; TRIMMER, J.S. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. **PNAS**, v. 98, p. 13373-13378, 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.231376298>

REID, G.; FLONTA, M.L. Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. **Nature**, p. 413-480, 2001. <https://doi.org/10.1038/35097164>

REINOL, H.; AHAMASI, S.; DEPNER, U.B.; LAYH, B.; HEINDL, C.; HAMZA, M.; PAHL, A.; BRUNE, K.; NARUMIYA, S.; MULLER, U.; ZEILHOFER, H.U. Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. **The Journal of Clinical Investigation** , v. 115, p. 673-679, 2005.  
<https://doi.org/10.1172/JCI23618>

RICCIOTTI, R.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, p.986-1000, 2011.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**,v. 57, p. 94-105, 2007.  
<https://doi.org/10.1590/S0034-70942007000100011>

ROBLES, L.; BARRIOS, M.; POZO, E.; DORDAL, A.; BAEYENS, J.M. Effects of K+ channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5- HT1A receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 295, p 181-188, 1996. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00643-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00643-5)

ROZA, C.; LAIRD, J.M.; SOUSLOVA, V.; WOOD, J.N.; CERVERO, F. The tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. **The Journal of Physiology**, v. 550, p. 921-926, 2003.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046110>

SACHS, D., F.Q. CUNHA, S. POOLE; S.H. FERREIRA S.H. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain** , v. 96, p. 89, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(01\)00433-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(01)00433-X)

SACHS, D.; VILLARREAL, C.; CUNHA, F.; PARADA, C.; FERREIRA, S.H. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **British Journal of Pharmacology** , v. 156, p.826-34., 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00093.x>

SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. **Journal of Pharmacological Science**, v 112, p. 1-5, 2010. <https://doi.org/10.1254/jphs.09R03CP>

SARANTOPOULOS, C.; McCALLUM, B.; SAPUNAR, D.; KWOK, W.M.; HOGAN, Q. ATPsensitive potassium channels in rat primary afferent neurons:the effect of neuropathic injury and gabapentin. **Neuroscience Letters**, v. 343, p. 185-189, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00383-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00383-5)

SCULPTOREANU, A.; YOSHIMURA, N.; GROAT, W.C. KW-7158 [(2S)-(-)-3,3,3-Trifluoro-2-hydroxy-2-methyl-N- (5,5,10-trioxo-4,10-dihydrothieno[3,2 c][1]benzothiepin-9-yl)propanamide] Enhances A-Type K<sub>+</sub> Currents in Neurons of the Dorsal Root Ganglion of the Adult Rat. **The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 310, p. 159-168, 2004. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065409>

SEKIGUCHI, F.; AOKI, Y.; NAKAGAWA, M.; KANAOKA, D.; NISHIMOTO, Y.; TSUBOTA-MATSUNAMI, M.; YAMANAKA, R.; YOSHIDA, S.; KAWABATA, A. AKAP-dependent sensitization of Ca<sub>v</sub>3.2 channels via the EP4receptor/cAMP pathway mediates PGE<sub>2</sub>-induced mechanical hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, p. 734–745, 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02174.x>

SHIEH, C.C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium Channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 557-593, 2000.

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

STEMKOWSKI, P.L.; NOH, M.; CHEN, Y.; SMITH, P. Increased excitability of medium-sized dorsal root ganglion neurons by prolonged interleukin-1 $\beta$  exposure is K<sub>+</sub> channel dependent and reversible. **The Journal of Physiology**, v. 593, p 3739–3755, 2015.  
<https://doi.org/10.1113/JP270905>

ST-JACQUES; MA, W. Peripheral prostaglandin E2 prolongs the sensitization of nociceptive dorsal root ganglion neurons possibly by facilitating the synthesis and anterograde axonal trafficking of EP4 receptors. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 354-366, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.05.028>

SZETO, V.; CHEN, N.H.; SUN, H.; FENG, Z. The role of K<sub>ATP</sub> channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. **Acta Pharmacologica**, v. 39, p. 638-694, 2018.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2018.10>

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531-543, 1998.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80564-4)

VYDYANATHAN, A.; WU, Z.; CHEN, S.; PAN, H. A-Type Voltage-Gated K<sub>+</sub> Currents Influence Firing Properties of Isolectin B<sub>4</sub>-Positive But Not Isolectin B<sub>4</sub>-Negative Primary Sensory Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, p.3401-3409, 2005.  
<https://doi.org/10.1152/jn.01267.2004>

YAO, C.; SAKATA, D.; ESAKI, Y.; LI, Y.; MATSUOKA, T.; KUROIWA, K. Prostaglandin E(2)-EP4 signaling promotes immune inflammation through T(H)1 cell differentiation and T(H)17 cell expansion. **Nature Medicine**, v.15, p.633–640, 2009. <https://doi.org/10.1038/nm.1968>

YANG, E.K.; TAKIMOTO, K.; HAYASHI, Y.; GROAT, W.C.; YOSHIMURA, N. Altered expression of potassium channel subunit mRNA and alpha-dendrotoxin sensitivity of potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons after axotomy. **Neuroscience**, v. 123, p. 867-874, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.11.014>

YOSHIDA, S.; MATSUMOTO, S. Effects of  $\alpha$ -Dendrotoxin on  $K^+$  Currents and Action Potentials in Tetrodotoxin-Resistant Adult Rat Trigeminal Ganglion Neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p.437-445, 2005. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084988>

WANG, C.; LI, G.W.; HUANG, L.Y. Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. **Molecular Pain**, v. 10, p.3-22, 2007.

WAXMAN, S.G.; ZAMPONI, G.W. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. **Nature Neuroscience**, v. 17, p.153-163, 2014. <https://doi.org/10.1038/nn.3602>

WINKELMAN, D.L.B; BECK, C.L.; YPEY, D.L.; O'LEARY, M.E. Inhibition of the A-Type  $K_+$  Channels of Dorsal Root Ganglion Neurons by the Long-Duration Anesthetic Butamben. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 314, 2005. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087759>

ZHOU, J. YANG, C.; ZHONG, J.; WANG, H. Intrathecal *TRESK* gene recombinant adenovirus attenuates spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. **NeuroReport**, v. 24, p. 131-136, 2013. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32835d8431>

## ANEXO I: Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoiP) 3423;  
e-mail:[ceua@prop.ufu.br](mailto:ceua@prop.ufu.br); [www.comissoes.propo.ufu.br](http://www.comissoes.propo.ufu.br)

### ANALISE FINAL Nº 175/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 078/17

Projeto Pesquisa: "Avaliação do potencial de repouso neuronal em cultura celular de gângios da raiz dorsal como método para a avaliação da sensibilização neuronal por prostaglandina E2 (PGE2)".

Pesquisador Responsável: Celina Monteiro da Cruz Lotufo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

OBS. 2: Como os animais serão eutanasiados por Isoflurano, seguida por decapitação para exangueação, é solicitado que o responsável do projeto faça os testes de reflexo palpebral; teste de retirada de membros e teste de respiração costô-abdominal, anteriormente à decapitação.

Uberlândia, 04 de outubro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão  
Coordenador da CEUA/UFU  
Portaria nº 885/17