

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ALEXIA OLIVEIRA BISPO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA COMUNICAÇÃO
GLUTAMATÉRGICA ENTRE NOCICEPTORES E CÉLULAS SATÉLITES DE
GÂNGLIOS SENSORIAIS DE RATO**

Uberlândia

2023

ALEXIA OLIVEIRA BISPO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA COMUNICAÇÃO
GLUTAMATÉRGICA ENTRE NOCICEPTORES E CÉLULAS SATÉLITES DE
GÂNGLIOS SENSORIAIS DE RATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Instituto de Ciências biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em biomedicina

Área de concentração: Fisiologia Geral

Orientador: Prof^a Dr^a Celina Monteiro da Cruz
Lotufo

Uberlândia

2023

ALEXIA OLIVEIRA BISPO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA COMUNICAÇÃO
GLUTAMATÉRGICA ENTRE NOCICEPTORES E CÉLULAS SATÉLITES DE
GÂNGLIOS SENSORIAIS DE RATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Instituto de Ciências biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em biomedicina

Área de concentração: Fisiologia Geral

Uberlândia, junho de 2023.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU)

Dr^a Débora de Oliveira Santos (UFU)

Prof^o Dr^o Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe pelo apoio e incentivo que serviu de alicerce para a conquista de meus objetivos. Sua presença e amor incondicional na minha vida sempre. Este Trabalho de Conclusão de Curso é a prova de que seu esforço pela minha educação não foram em vão e valeram a pena.

À Profª Drª Celina Monteiro da Cruz Lotufo por todo aprendizado que me proporcionou durante essa caminhada de introdução a pesquisa. Espero poder compartilhar com a senhora no decorrer da minha trajetória acadêmica.

Ao meu companheiro que me acalentou nos momentos difíceis e me deu forças para continuar em momentos em que achei que não fosse possível.

Aos meus amigos da graduação que estiveram junto a mim com incentivos e gargalhadas para que essa trajetória fosse partilhada da melhor maneira possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento que permitiu a realização desse projeto.

À Universidade Federal de Uberlândia pela realização de mais um sonho.

“A ciência progride quando as observações nos forçam a mudar as nossas ideias preconcebidas.”

- Vera Rubin.

RESUMO

Introdução: As interações entre células gliais satélites (CGSs) e neurônios nociceptivos nos gânglios da raiz dorsal (GRD) afetam a excitabilidade neuronal durante a transmissão do sinal doloroso. Estudos anteriores mostraram que os neurônios liberam glutamato, que ativa as CGSs. Estas, por sua vez, interferem na ativação neural promovendo despolarização da membrana. **Objetivos:** Avaliar o papel do óxido nítrico (NO) e do L-NAME na despolarização de neurônios aferentes primários resultantes da ativação de receptores NMDA em células satélites gliais. **Métodos:** Foi avaliado o efeito de um doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (NPS, 10 μ M, 100 μ M e 1 mM), bem como o efeito do L-NAME (100 μ M), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintetase. Alterações no potencial de repouso foram avaliadas por microscopia confocal através do uso do indicador fluorescente DiBAC4(3), cuja movimentação na membrana devido à despolarização resulta em aumento de fluorescência. Foi avaliado o efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase nos gânglios da raiz dorsal, através da injeção intratecal de L-NAME, em testes comportamentais nos quais a participação do glutamato no gânglio da raiz dorsal já é conhecida. Sendo estes os testes da capsaicina e de hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina, ambos na pata de ratos. **Resultados:** A administração do doador do NO na concentração de 1 mM induziu despolarização neuronal significativa ($0,18 \pm 0,02$), quando comparado com o veículo ($-0,03 \pm 0,005$) enquanto não houve efeito com as concentrações menores. A administração do inibidor da NOS inibiu a despolarização neuronal induzida por NMDA ($-0,07 \pm 0,03$) quando comparado ao grupo NMDA ($0,15 \pm 0,04$). Foi possível observar um aumento significativo na fluorescência quando a capsaicina foi adicionada ao meio com L-NAME ($0,60 \pm 0,06$) em comparação ao veículo ($-0,02 \pm 0,03$). Nos testes comportamentais, não foi observado efeito em nenhuma das concentrações de L-NAME comparado ao veículo. **Conclusões:** Os resultados obtidos indicam que o NO pode causar despolarização nos neurônios nociceptivos o que corrobora com a hipótese de que este mediador pode participar da comunicação entre neurônios e CGSs. O NO também parece estar envolvido na comunicação glutamatérgica no GRD.

Palavras-chave: Dor, Glia, Óxido Nítrico, Glutamato.

ABSTRACT

Introduction: Interactions between satellite glial cells (SGCs) and nociceptive neurons in dorsal root ganglia (DRG) affect neuronal excitability during pain signal transmission. Previous studies have shown that neurons release glutamate, which activates CGSs. These, in turn, interfere with neural activation by promoting membrane depolarization. **Objectives:** To evaluate the role of nitric oxide (NO) and L-NAME in the depolarization of primary afferent neurons resulting from the activation of NMDA receptors in glial satellite cells. **Methods:** The effect of a nitric oxide donor, sodium nitroprusside (NPS, 10 μ M, 100 μ M and 1 mM) was evaluated, as well as the effect of L-NAME (100 μ M), a non-specific inhibitor of the enzyme nitric oxide synthetase. Changes in resting potential were assessed by confocal microscopy using the fluorescent indicator DiBAC4(3), whose movement on the membrane due to depolarization results in increased fluorescence. The effect of blocking nitric oxide synthase in the dorsal root ganglia was tested through the intrathecal injection of L-NAME using behavioral tests in which the participation of glutamate in the dorsal root ganglia was verified in earlier studies. The behavioral tests were the capsaicin test and mechanical hyperalgesia induced by the injection of carrageenan, both in rat paws. **Results:** The administration of the NO donor at a concentration of 1 mM induced a significant neuronal depolarization (0.18 ± 0.02) when compared to the vehicle (-0.03 ± 0.005), while there was no effect with the lower concentrations. The Administration of the NOS inhibitor inhibited NMDA-induced neuronal depolarization (-0.07 ± 0.03) when compared to the NMDA group (0.15 ± 0.04). It was possible to observe a significant increase in fluorescence when capsaicin was added to the medium with L-NAME (0.60 ± 0.06) compared to the vehicle (-0.02 ± 0.03). In behavioral tests, no effect was observed at any of the L-NAME concentrations compared to vehicle administration. **Conclusions:** Results indicate that NO can depolarize nociceptive neurons, which corroborates the hypothesis that this mediator participates in the communication between neurons and SGCs. NO also appears to be involved in glutamatergic communication in DRG.

Keywords: Pain, Glia, Nitric Oxide, Glutamate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Via de transmissão da dor	13
Figura 2: Relação entre CGS e nociceptores	15
Figura 3: Variação da fluorescência induzida por Nitroprussiato de Sódio em células do GRD	23
Figura 4: Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre o potencial de repouso de neurônios sensoriais primários	24
Figura 5: Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre a ação da Capsaicina em neurônios aferentes primários	25
Figura 6: Efeito da inibição da NOS sobre a despolarização induzida por NMDA em neurônios nociceptivos	26
Figura 7: Teste de nocicepção induzida por capsaicina.	27
Figura 8: Teste de hiperalgesia induzida por carragenina.	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CGS	Célula Glial Satélite
DiBAC4(3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
iGluRs	Receptores Ionotrópicos de Glutamato
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
L-NAME	L-N ^G -Nitro arginine methyl ester
LNRP	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Neuronal Óxido Nítrico Sintase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NPS	Nitroprussiato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Via de transmissão da dor	12
2.2 Gânglio da Raiz Dorsal	13
2.3 Células Gliais Satélites	14
2.4 Comunicação glutamatérgica	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Aspectos éticos.....	19
4.2 Animais	19
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	19
4.3.1 Coleta de gânglios da raiz dorsal.....	19
4.3.2 Cultura celular primária	19
4.3.3 Microscopia Confocal	20
4.3.4 Diluições e grupos	20
4.4 Experimentos <i>in vivo</i>	21
4.4.1 Teste de nocicepção induzido por capsaicina	21
4.4.2 Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina.....	21
4.5 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Experimentos <i>in vitro</i>	23
5.2.1 Teste de nocicepção induzido por capsaicina	26
.....	27
5.2.2 Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina.....	27
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A dor tem um papel fisiológico protetor, funcionando como um sinal de alerta de ameaça à integridade física do organismo, mas pode se tornar uma doença em si mesma quando persiste e é recorrente há mais de 3 meses, ao se tornar crônica e desprovida de qualquer função biológica (RAJA *et al.*, 2020). Múltiplos mecanismos moleculares e celulares atuam isoladamente ou em combinação com os sistemas nervoso central e periférico para produzir diferentes formas de dor (YAKSH *et al.*, 2018). Os nociceptores são neurônios aferentes primários que são ativados por estímulos dolorosos. Os corpos celulares desses neurônios se localizam nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) ou nos gânglios trigeminiais (GT). Os neurônios localizados dentro do GRD são responsáveis pela transdução e modulação sensorial da periferia para posterior transmissão do sinal aos centros superiores, onde ocorre a percepção da dor (ESPOSITO *et al.*, 2019).

Em gânglios sensoriais, as células gliais satélites (CGS), estabelecem uma relação privilegiada com os corpos neuronais circundantes (AVRAHAM *et al.*, 2020). Ativação de CGSs em uma unidade do soma-CGS (soma de um neurônio GRD com seu envelope CGSs) podem influenciar outras somas de neurônios próximos dentro do gânglio, tendo sido verificada a ocorrência de despolarização (MANDGE *et al.*, 2019; HANANI; VERKHRATSKY, 2021; WANG *et al.*, 2021). As interações entre CGS e neurônios e suas consequências na excitabilidade neuronal são uma das pesquisas mais recentes que enfocam o campo da dor, pois nos últimos dez anos o número de artigos sobre o papel que essas células desempenham na atividade neuronal tem aumentado significativamente (RUIZ-SOTO, 2020).

Os receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) são canais iônicos glutamatérgicos amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC) que desempenham papéis importantes na transmissão sináptica excitatória (AHMED *et al.*, 2020). Há um envolvimento específico de NMDAr, sugerindo então que a ativação de NMDAr no GRD desempenha um papel importante na hiperalgesia inflamatória periférica (FERRARI *et al.*, 2014). Experimentos *in vitro* mostraram que a sensibilização induzida por NMDA de neurônios GRD cultivados depende da ativação de células satélite e dessas mesmas subunidades NMDAr. Assim, sugerindo que a sensibilização do nociceptor inflamatório mecânico é dependente da liberação de glutamato no GRD e posteriormente da ativação do NMDAr nas células gliais satélites, apoiando a ideia de que a hiperalgesia periférica é um evento modulado por um sistema glutamatérgico no GRD (LEIGUARDA *et al.*, 2020).

Há estudos que demonstram que CGSs expressam NMDAr funcional bem como indicam que a magnitude da resposta NMDA de CGSs e neurônios GRD é modulada pelas

interações entre estas células (FERNÁNDEZ-MONTOYA *et al.*, 2017). No SNC, a estimulação de um neurônio glutamatérgico leva a liberação do seu respectivo neurotransmissor, que se liga aos seus receptores de tipo NMDA. Com a ativação do NMDAr, o cálcio é então capaz de entrar no citoplasma do neurônio pós-sináptico resultando ativação enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e na síntese do Óxido Nítrico (NO). Assim o NO sintetizado deixa o neurônio pós-sináptico por difusão direta pela membrana da célula. O NO desempenha um papel como mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando para o neurônio pré-sináptico onde ativa a enzima guanilato ciclase. A guanilato ciclase catalisa a reação que produz guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc, por sua vez, desencadeia o processo que resulta na liberação do glutamato e o ciclo se repete (PARK *et al.*, 2020; PÉREZ-NERI *et al.*, 2020). Há dados, sobre estudos realizados nas patas traseiras de ratos wistar, que sugerem que a ativação de nNOS (neuronal NO sintase) e a via da l-arginina / NO / GMPc é importante para a via periférica sensação de dor e esta via contribui para o efeito antinociceptivo da cetamina (substância amplamente utilizada para pré-medicação, analgesia pós-operatória, sedação e indução e manutenção da anestesia geral) (SNEDDON, 2018; GOMES *et al.*, 2020).

O óxido nítrico é um provável mensageiro entre neurônios e CGS, já que foi observado que o NO liberado pelos neurônios, após lesão nervosa, atua sobre as CGS provocando o aumento da expressão da guanilato ciclase, que catalisa formação da guanosina-monofosfato cíclico (FELDMAN-GORIACHNIK; HANANI, 2021). Estudos mostraram que o NO desempenha um papel importante na propagação de sinais de neurônios para CGSs em GRD, que podem sinalizar de volta para os neurônios e aumentar sua excitabilidade. Outros autores verificaram que o NO induz mudanças que parecem contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal, sendo provável que seja um fator importante na hiperalgesia em modelo do estudo de dor inflamatória (BELZER; HANANI, 2019).

Diante da emergência dos casos que envolvem a dor sobre a população mundial, a compreensão da modulação da mesma em nível periférico pode permitir o desenvolvimento de fármacos de ação analgésica que não atuem no SNC e, desta forma, tenham menor chance de indução de efeitos adversos. Experimentos ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa mostram que a ativação de receptores NMDA em células satélites induz despolarização dos neurônios em culturas de GRD de ratos. Deste modo, estudar os efeitos do NO na comunicação glutamatérgica entre nociceptores e células satélites de gânglios sensoriais se faz de suma importância para compreender os mecanismos da dor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Via de transmissão da dor

A fisiopatologia da dor é uma divisão dentro dos estudos das bases fisiológicas das sensações. Dentre muitos estímulos que o cérebro recebe, existe uma categoria especial que nos causa sensações desagradáveis: a dor. Ao longo dos anos, a definição de dor sofreu inúmeras alterações, o que se faz cabível por se tratar de um campo amplamente complexo, que envolve além dos aspectos fisiológicos e patológicos, também abrange as experiências individuais e até mesmo culturais. Sendo assim, a definição atual de dor estabelecida pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) consiste na dor ser uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos (RAJA *et al.*, 2020). A dor faz parte do cotidiano e, quando não está presente, constitui fator relevante na disfunção fisiológica, com sérias consequências para a segurança do indivíduo. O tema dor é, portanto, de grande interesse tanto na elucidação de sua etiologia quanto nos procedimentos que visam ao seu controle.

A via de transmissão da dor está relacionada com a nocicepção que é um fenômeno pelo qual ocorre a codificação dos estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, resultando em dor. Esses estímulos são detectados na periferia por terminações nervosas chamadas nociceptores, que, quando ativadas, enviam informações de agressão ao SNC (PATEL, 2010). Os nociceptores são terminações nervosas aferentes primárias que convertem uma variedade de estímulos (químicos ou mecânicos) em impulsos nervosos que as estruturas do SNC interpretam para produzir a sensação de dor. As terminações nervosas dos neurônios aferentes primários nociceptivos expressam receptores e canais iônicos que são ativados ao sofrerem determinado nível de estímulos. Esses receptores e canais realizam então a transdução dos estímulos em um potencial de ação, por meio da despolarização de canais iônicos que, quando alcançam o limiar de excitabilidade, desencadeiam a abertura dos canais sódio dependentes de voltagem, propagando assim o impulso (MACHADO, 2006).

Existem classificações que se referem a constituição da terminação nervosa desse nociceptor, sendo dois tipos de fibras nervosas: nervos de pequeno diâmetro, não mielinizados, que conduzem lentamente o impulso nervoso, designados fibras C, e nervos de maior diâmetro, ligeiramente mielinizados, que conduzem impulsos nervosos mais rapidamente designados fibras A δ . Os nociceptores de fibra C respondem de forma polimodal aos estímulos térmicos, mecânicos e químicos; e os nociceptores de fibra A δ são de dois subtipos e respondem aos estímulos mecânicos e mecanotérmicos (GUYTON; HALL, 2006).

Tais fibras nervosas aferentes primárias possuem corpos celulares localizados nos GRD ou nos GT. Os neurônios nociceptivos primários que se encontram no GRD realizam sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal (Figura 1). A informação nociceptiva é transmitida para centros superiores através dos tratos espinotalâmicos e espinoreticulares contralaterais, que estão localizados na substância branca anterolateral da medula espinal. Os axônios mediais e laterais do trato espinotalâmico terminam respectivamente nos núcleos medial e lateral do tálamo e, a partir deste ponto projetam-se para os córtices somatossensoriais primário e secundário, a ínsula, o córtex cingulado anterior e o córtex pré-frontal. Estas áreas desempenham vários papéis na percepção da dor (STEEDS, 2009).

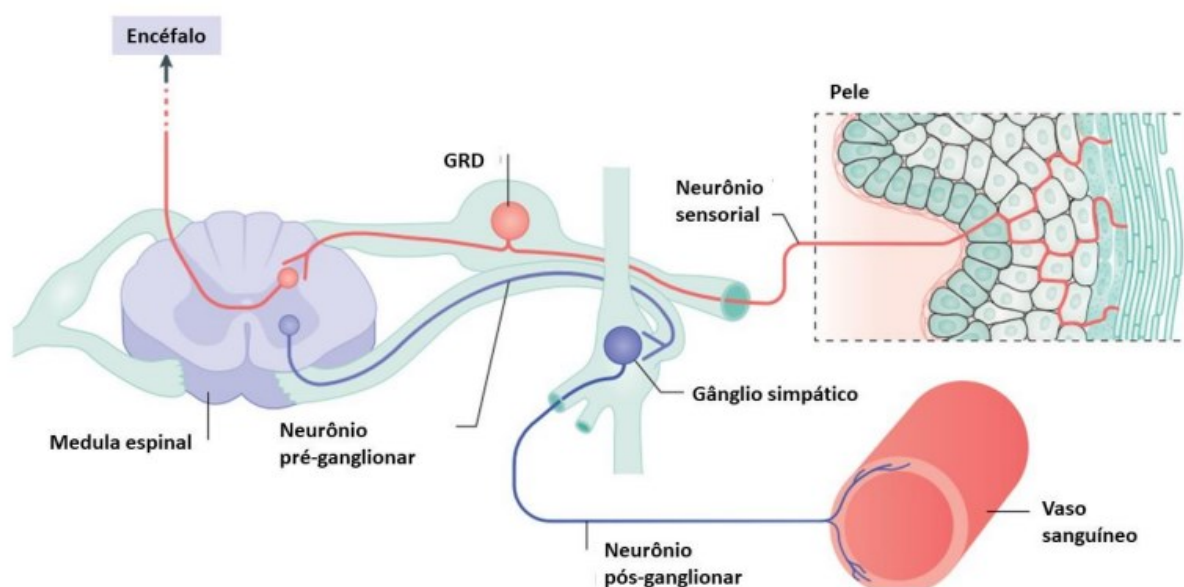


Figura 1: Via de transmissão da dor. Posição dos gânglios da raiz dorsal (GRD) nas vias sensoriais que levam da pele ao cérebro. Um gânglio simpático paravertebral também é indicado. Adaptado de Hanani e Spray (2020).

2.2 Gânglio da Raiz Dorsal

O GRD é uma estrutura crítica na transdução e modulação sensorial, incluindo a transmissão da dor. O GRD se encontra localizado dentro da bainha dural com apenas uma fina camada de líquido cefalorraquidiano (LCR), é uma estrutura bilateral encontrada em todos os níveis vertebrais situados nos forames intervertebrais, exceto os GRD sacrais, localizados dentro do canal vertebral, e os GRD coccígeos, que estão intradurais (DEVOR, 1999). O GRD é um alargamento da raiz dorsal que abriga os somas (corpos celulares) de neurônios sensoriais primários e conta com até 15.000 neurônios presentes. Os neurônios do GRD são de natureza

pseudounipolar; um único axônio se projeta do corpo celular e se bifurca na junção em T única. A porção periférica do axônio estende-se até as terminações dos receptores na periferia e é responsável pela sinalização aferente. A porção central do axônio se estende até o SNC e mostra arborizações axonais consideráveis na medula espinhal, terminando em sinapses ipsilaterais ou neurônios contralaterais de ampla faixa dinâmica, redes de interneurônios inibitórios e outros alvos no corno dorsal (LEIJNSE; D'HERDE, 2016). Os axônios dos neurônios sensoriais primários facilitam a comunicação sináptica com os neurônios na substância cinzenta espinhal; esses sinais são então modificados por neurônios de segunda e terceira ordem e por interneurônios inibitórios (WILTSE, 2000). Os neurônios sensoriais primários do GRD envolvidos na dor são principalmente do tipo C e A δ (POPE *et al.*, 2013).

Os neurônios GRD têm propriedades de membrana especializadas e são separados uns dos outros dentro dos gânglios. Quase todos os seus neurônios GRD sofrem excitação subliminar durante a ativação de outros corpos celulares, sendo esse processo chamado de "despolarização cruzada" do GRD. Até 90% dos neurônios GRD despolarizam quando a estimulação é aplicada aos axônios de neurônios GRD vizinhos que compartilham o mesmo gânglio (UTZSCHNEIDER *et al.*, 1992). O GRD é uma estrutura crítica na transdução e modulação sensorial, incluindo a transmissão da dor e a manutenção de estados de dor neuropática persistentes. Características únicas, como organização somática seletiva, características de membrana e localização acessível e consistente tornam o GRD um alvo ideal para neuromodulação. Visto que a estimulação GRD recruta diretamente o soma de neurônios sensoriais primários, é diferenciado de estimulação da medula espinhal, estimulação nervosa periférica e outras opções de neuromodulação (ESPOSITO *et al.*, 2019).

2.3 Células Gliais Satélites

As células gliais, antes consideradas células de suporte de neurônios, agora são reconhecidas como participantes ativas na formação e função dos circuitos cerebrais normais (ALLEN; BARRES, 2009). As células gliais satélite (CGSs) são células gliais proeminentes no sistema nervoso periférico (SNP). Estas são encontradas não apenas na glia sensorial (GRDs e GTs), mas também nos gânglios simpáticos e parassimpáticos. CGSs são caracterizadas por finas bainhas celulares que circundam os neurônios individuais. Surpreendentemente, a lacuna do espaço extracelular entre a bainha de CGS e a membrana plasmática neuronal associada mede apenas 20 nm, permitindo interações próximas e sinalização eficaz entre neurônios e CGSs (Figura 2) (LEE; KIM, 2020).

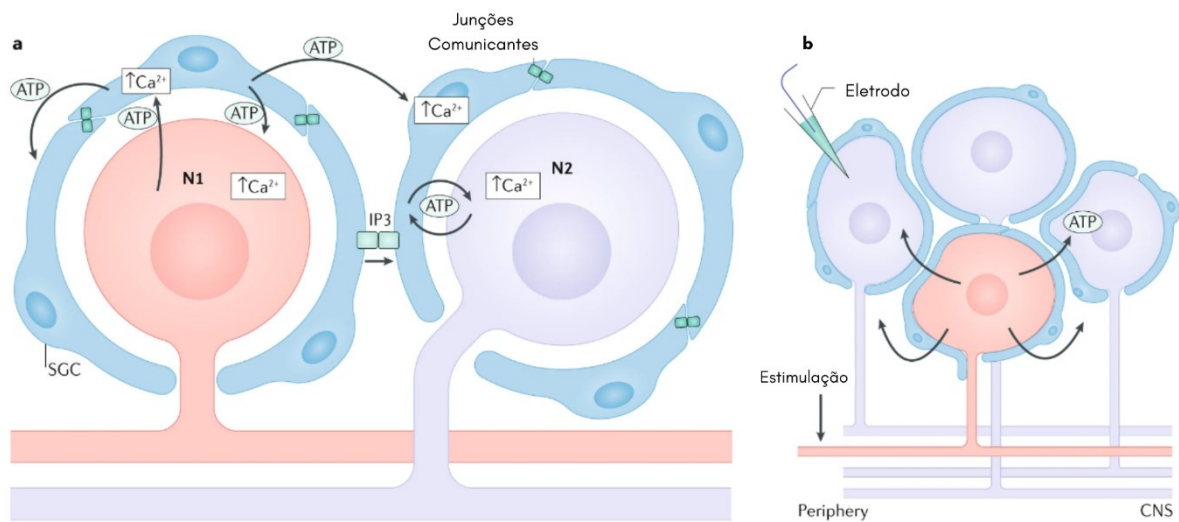


Figura 2: Relação entre CGS e nociceptores. a. Complexidade da comunicação entre CGS e nociceptores. O axônio do neurônio 1 (N1) é lesado, o que induz o disparo de potenciais de ação no corpo celular. Isso causa a liberação de ATP do neurônio, que atua nas CGSs elevando o Ca^{2+} intracelular, que por sua vez as induz a liberar ATP (e outros fatores, incluindo citocinas). O aumento das junções comunicantes entre as CGSs facilita a disseminação do IP3 dentro das CGSs acopladas, o que aumenta o cálcio intracelular nessas células. A combinação do aumento da sensibilidade ao ATP e o aumento do acoplamento por junções comunicantes promoverão a propagação de ondas de cálcio, resultando na excitação de N2. b. Despolarização cruzada no GRD. Adaptado de Hanani e Spray (2020).

As células da glia desempenham papéis importantes na função do SNC nos estados de saúde e doença e mantêm comunicação bidirecional com os neurônios. As células da glia expressam receptores para substâncias liberadas pelos neurônios, principalmente o ATP, atuando nos receptores purinérgicos (FIELDS; BURNSTOCK, 2006). As células da glia também liberam substâncias bioativas, incluindo ATP, glutamato e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β (Interleucina 1 beta) e fractalcina, que permitem que elas se comuniquem entre si e com neurônios adjacentes (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). A maioria dos estudos sobre dor e tratamentos para ela se concentraram nos neurônios, mas foi proposto que as CGS participam da geração e manutenção da dor e podem servir como alvos mais adequados para a terapia da dor. Essa visão foi apoiada por estudos de modelos de dor em animais, mostrando que a microglia espinhal e os astrócitos são essenciais para a hiperalgesia (WATKINS; MAIER, 2003).

As ideias sobre a glia do SNC e a dor levaram à pesquisa sobre o possível papel das CGSs nos gânglios sensoriais na dor. Verificou-se que o dano ou inflamação do nervo ativa

CGSs em gânglios sensoriais. Isso incluiu regulação positiva da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) do marcador de astrócitos, aumento da força de acoplamento entre CGSs, regulação negativa dos canais Kir4.1 em CGSs e aumento da sensibilidade das CGSs ao mediador da dor ATP (WARWICK; HANANI, 2013; TANG *et al.*, 2010; VIT *et al.*, 2008). As CGSs ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF e fractalcina, que podem atuar nos neurônios e aumentar sua excitabilidade e disparo (SOUZA *et al.*, 2013).

Estudos indicam que diferentes síndromes de dor compartilham uma cadeia de eventos bastante semelhante que conecta as alterações nas CGSs à dor. Essencialmente, a lesão do nervo leva à liberação de óxido nítrico, que induz a ativação do CGS. As CGSs, por sua vez, liberam compostos que levam à hiperexcitabilidade neuronal e à dor. As ondas de cálcio intracelular desempenham um papel importante neste esquema (BELZER; HANANI, 2019).

A compreensão das funções das CGSs e sua estreita interação com os neurônios é crucial. Esse contato desempenha um papel fundamental no controle da homeostase neuronal, porém, ainda há muito a ser descoberto nessa área. Embora haja mais informações sobre as alterações que ocorrem nas CGSs dos gânglios sensoriais após lesões nervosas, assim como seu envolvimento na dor, ainda há muito que ser descoberto. No entanto, surgem dados promissores sobre o seu papel na regulação da transmissão sináptica nestes gânglios (HANANI; SPRAY, 2020).

2.4 Comunicação glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e o neurotransmissor mais abundante no cérebro. Ele é armazenado dentro de vesículas nos terminais axônicos e liberado por exocitose com o influxo de cátions de cálcio. Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grandes grupos: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos podem ser de três tipos: NMDA, ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). (ZHOU; DANBOLT, 2014). A neurotransmissão mediada pelos iGluRs (receptores ionotrópicos de glutamato) é rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons (principalmente Na⁺ e Ca²⁺) e, conseqüentemente, o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica (BOWIE, 2008).

Os receptores NMDA se localizam na membrana pós-sináptica de sinapses excitatórias e exibem maior permeabilidade ao Ca²⁺ do que os receptores AMPA e KA, característica que lhes confere um papel mais ativo em mecanismos neurotóxicos. Os receptores NMDA são formados pela combinação de uma subunidade NR1 com um dos 4 subtipos da subunidade NR2 (NR2A-D) e em alguns casos, com uma subunidade NR3. Quando a membrana pós-sináptica

está em seu potencial de repouso, os canais NMDA encontram-se bloqueados por um íon magnésio (Mg^{2+}) que impede que ocorra o influxo de Ca^{2+} para o terminal pós-sináptico. No entanto, sob despolarização pós-sináptica, os íons Mg^{2+} são expulsos dos canais NMDA, o que permite o influxo de Ca^{2+} a favor de seu gradiente de concentração (PINHEIRO; MULLE, 2008).

A presença contínua de estímulos nociceptivos desencadeia um aumento na atividade neuronal no corno dorsal da medula espinhal, levando à sensibilização das fibras C. Durante a inflamação, o número de receptores NMDA nas fibras nervosas periféricas aumenta, o que pode contribuir para a sensibilização periférica em casos de lesões teciduais (PETRENKO *et al.*, 2003). A transmissão glutamatérgica no sistema nervoso periférico tem sido sugerida, dado que os neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro, muitos dos quais são nociceptivos, expressam glutamato e receptores de glutamato. A ativação desses neurônios leva à liberação de glutamato em seus terminais central e periférico e por conseguinte à nocicepção (DENG *et al.*, 2019).

Os NMDAr localizados nas membranas sinápticas da medula espinhal desempenham um papel importante na dor neuropática e na dor pós-operatória devido à plasticidade neuronal e sensibilização central. Os NMDAr também são expressos em estruturas no GRD, sugerindo um papel potencial dos NMDAr no processamento da dor na periferia (BLEAKMAN *et al.*, 2006). Tal estrutura apontado por estudo são as CGSs que possuem NMDAr, deste modo é possível que esses mediadores neuronais também participem da despolarização cruzada entre o nociceptor e as CGSs (FERRARI *et al.*, 2014). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as células satélites ativadas por glutamato influenciam a excitabilidade neuronal e contribuem para a transmissão de estímulos dolorosos não está totalmente esclarecido.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o envolvimento do óxido nítrico (NO) na comunicação glutamatérgica entre neurônios e células satélites gliais nos gânglios da raiz dorsal de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

1) Será avaliado o efeito na despolarização de neurônios aferentes primários resultantes da ativação de receptores NMDA (250 μ M) em células satélites gliais em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.

1.1) Avaliar o efeito do L-NAME (100 μ M), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintetase, sobre a despolarização induzida por administração de NMDA em culturas de GRD.

1.2) Avaliar o efeito do Nitroprussiato de Sódio, um doador de óxido nítrico sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários. Será feita uma curva-dose resposta utilizando inicialmente as concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1 mM.

2) Será avaliado o efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase nos gânglios da raiz dorsal, através da injeção intratecal de L-NAME, em testes comportamentais nos quais a participação do glutamato no gânglio da raiz dorsal já é conhecida. No caso, serão utilizados os testes da capsaicina e de hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina, ambos na pata de ratos.

2.1) Avaliar o efeito da administração de veículo ou L-NAME (100 μ M e 1 mM, em 10 μ l, via intratecal) 15 minutos antes da administração de capsaicina na pata de ratos.

2.2) Avaliar o efeito da administração de veículo ou L-NAME (100 μ M e 1 mM, em 10 μ l, via intratecal) após 2h45min da administração de carragenina na pata dos animais, sendo este tempo 15 minutos antes da avaliação da sensibilização mecânica induzida por carragenina.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo é aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo nº 23117.086099/2022-31.

4.2 Animais

Os animais utilizados para as culturas celulares foram ratas Wistar possuindo 80-100 g de massa corporal inicial e por volta de 5 semanas de idade. Para os experimentos comportamentais de hiperalgesia inflamatória foram utilizados ratos Wistar machos de 180 a 200 g. Os animais foram acomodados no biotério central da Rede de Biotérios de Roedores – REBIR – da UFU, climatizado em 25 °C (temperatura ambiente) e ciclo de luminosidade controlada em 12h claro e 12h escuro com livre acesso à água e à ração.

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Coleta de gânglios da raiz dorsal

Os gânglios da raiz dorsal foram colhidos das regiões torácica e lombar (em torno de 12 a 14 gânglios por animal). Para isso, primeiramente os animais foram anestesiados em ambiente fechado com o anestésico geral Isoflurano 5% por via inalatória através do sistema de anestesia inalatória da Bonther, em seguida foram decapitados e colocados em posição vertical para a exsanguinação. Com a retirada da pele do dorso do animal, exposição da coluna vertebral e secções das vértebras, os gânglios foram coletados e colocados em placas de cultura em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES.

4.3.2 Cultura celular primária

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

As células foram dissociadas enzimaticamente por incubação a 37°C durante 60 minutos em solução Hanks/Hepes contendo 0,28 U/ml de colagenase e depois por 20 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de penicilina/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 estufa de cultura com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C por 72h.

4.3.3 Microscopia Confocal

Após 72 horas, as culturas foram incubadas com indicador fluorescente para avaliação de potencial de membrana (DiBAC4(3), 10 μ M), este indicador permaneceu na solução de trabalho durante todo o experimento, pois o movimento da molécula através da membrana, devido ao seu gradiente eletroquímico, indica as variações do potencial de membrana (YAMADA *et al.*, 2001). Posteriormente foram levadas para o microscópio confocal onde foram administradas as substâncias a serem testadas, Nitroprussiato de Sódio, L-NAME, NMDA, veículo (solução Hanks/HEPES). A administração das drogas se deu através da adição de 10 μ l de uma solução com 10X a concentração final desejada em um volume de 90 μ l de solução na placa de cultura. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de 5 minutos de duração obtidas através da microscopia confocal. As imagens foram registradas e analisadas utilizando o software de imagens livre e gratuito ImageJ (NIH).

4.3.4 Diluições e grupos

Os reagentes utilizados neste trabalho são respectivamente: Nitroprussiato de Sódio, L-NAME, NMDA, veículo e a solução Hanks/HEPES utilizada para o acondicionamento das culturas celulares durante a performance dos experimentos. A disposição dos grupos ocorreu segundo os tipos de tratamento e as quantidades de placas para cada tratamento. O efeito do NO sobre o potencial de repouso de neurônios foi avaliado através da utilização do doador Nitroprussiato de Sódio (NPS). Durante a aquisição de imagens da cultura, foram adicionadas com as seguintes soluções: veículo (solução Hanks/Hepes), NPS 10 μ M, 100 μ M e 1 mM (PARK *et al.*, 2014). A quantidade de células neuronais observadas está contida na tabela 1. Os efeitos sobre o potencial de membrana foram avaliados durante 5 minutos.

Tabela 1 – Quantidade de células para avaliação do efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre o potencial de repouso de neurônios sensoriais primários

Tratamento	Veículo	NPS 10 μ M	NPS 100 μ M	NPS 1mM	Capsaicina
Número de Células	34	27	44	42	147

Fonte: De autoria própria.

Os ensaios para avaliar os efeitos da inibição da NOS foram realizados através da incubação por 5 minutos com veículo (Hanks/Hepes) ou L-NAME (100 μ M) previamente à administração de NMDA 250 mM junto com o co-agonista glicina (10 μ M). A dose de L-NAME utilizada foi determinada de acordo com experimentos de outros autores (ARORA *et al.*, 2007; FELDMAN-GORIACHNIK; HANANI, 2021). A quantidade de células neuronais

observadas está contida na tabela 2.

Tabela 2 - Quantidade de células para avaliação do efeito da inibição da NOS sobre a despolarização induzida por NMDA em neurônios nociceptivos.

Tratamento	Veículo	NMDA	Capsaicina	KCl	L-NAME	L-NAME+ NMDA	L-NAME+ Capsaicina	L-NAME+ KCl
Número de Células	34	37	37	37	36	36	26	40

Fonte: De autoria própria.

Ao final de cada experimento foi realizado um controle positivo pela administração de capsaicina (10 μ M) em uma série de imagens de 3 minutos. capsaicina. A capsaicina foi administrada como um controle positivo, visto que ativa receptores TRPV1, que são receptores para calor característicos da fibras C nociceptivas (JULIUS, 2013). O receptor TRPV1 é um canal permeável a sódio e cálcio e produz despolarização neuronal intensa. Este controle permite a identificação dos neurônios nociceptivos viáveis na cultura.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Teste de nociceção induzido por capsaicina

O teste da capsaicina foi proposto por Sakurada et al. (1992), para o estudo de compostos que atuam sobre a dor neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. Foi demonstrado que a capsaicina induz a nociceção durante um período de 5 minutos, começando imediatamente após a injeção e desaparecendo completamente aos 10 minutos. Assim, foi realizada uma injeção intraplantar subcutânea de 50 μ l contendo 10 μ g de capsaicina na pata traseira direita de dois grupos experimentais de animais tratados e grupo controle. Ocorreu a administração da injeção intraplantar subcutânea de de 50 μ L contendo 10 μ g de capsaicina após 15 minutos da injeção intratecal de L-NAME 100 μ M, L-NAME 1 mM ou veículo (5 μ L de salina estéril) de acordo com o grupo experimental. Cada grupo experimental contou com 6-7 animais. Nos três grupos experimentais os ratos foram observados por 5 minutos e registrado o número de vezes que o animal produziu uma resposta caracterizada como nociceptiva, sendo a sacudida (“flinch”) ou lambida na pata afetada.

4.4.2 Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina

A sensibilidade mecânica por meio de um anestesiómetro eletrônico (Von Frey eletrônico Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é

realizado por meio de uma ponteira Universal Tips10mL (T-300, Axygen) adaptada ao aparelho. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar de sensibilidade mecânica, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida antes e após o experimento, em gramas. O LNRP foi avaliado antes e após 3 horas da administração intraplantar de carragenina (pata direita traseira utilizando uma seringa BD Ultra-fine II; 100 µg/ 50 µL). A injeção intratecal de veículo (10 µL de salina), L-NAME 100 µM, L-NAME 1 mM (50 µg/ 10 µL) foi realizada duas horas e quarenta e cinco minutos após a injeção de carragenina, ou seja, 15 minutos antes da avaliação do LNRP. Cada grupo experimental contou com 5-6 animais. Para redução do stress, os ratos foram habituados ao equipamento 1 dia antes da execução dos experimentos.

4.5 Análise estatística

Para os testes *in vitro* foram avaliadas as variações máximas de fluorescência em cada neurônio ou célula glial testada. Para os testes *in vivo* os resultados foram por média e erro padrão, resultantes da análise do índice de dor da contagem manual de flinch ou lambidas. Para ambos os testes foram comparadas as médias dos valores obtidos através dos testes t, para duas médias comparadas, ou por ANOVA, para mais de duas médias comparadas. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos *in vitro*

Com o intuito de verificar o efeito do NO sobre a despolarização de neurônios nociceptivos primários em culturas de gânglio da raiz dorsal de ratos, foram realizados experimentos utilizando o doador Nitroprussiato de Sódio (NPS) nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 1 mM. Na imagem representada pela **Figura 3** obtida através de microscopia confocal é possível observar um aumento de fluorescência em decorrência da concentração de 1 mM de NPS. O gráfico apresentado na **Figura 4** mostra que administração do doador do NO na concentração de 1 mM induziu despolarização neuronal significativa ($0,18 \pm 0,02$), quando comparado com o veículo ($-0,03 \pm 0,005$) enquanto não houve efeito com as concentrações menores.

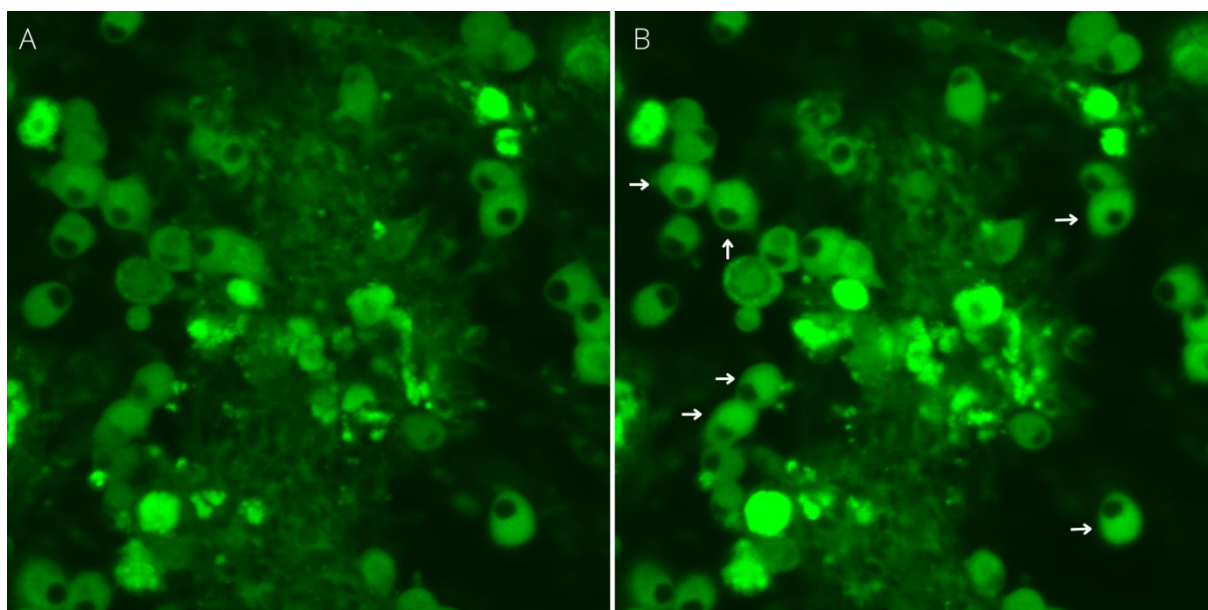


Figura 3: Variação da fluorescência induzida por Nitroprussiato de Sódio em células do GRD. Imagens confocais de células GRD primárias incubadas com DiBAC4(3). (A) Fluorescência basal de células GRD. (B) Aumento na fluorescência observado 5 minutos após a administração de NPS (1 mM).

Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários

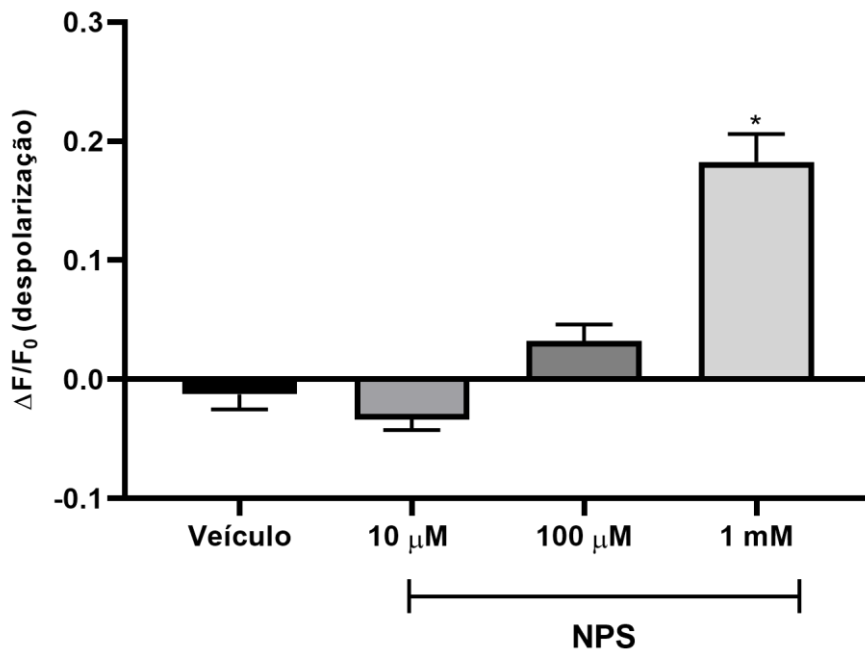


Figura 4: Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre o potencial de repouso de neurônios sensoriais primários. O potencial de repouso neuronal foi avaliado através de mudanças na fluorescência emitida pelo indicador DiBAC₄(3). Está sendo mostrada a alteração de fluorescência induzida por administração de veículo (Hanks) ou NPS (10 μM, 100 μM ou 1 mM) durante 5 minutos. Dados mostrados como média ± EPM. * p<0,0001 comparado ao grupo veículo, ANOVA seguida por teste de Dunnett's.

A **Figura 5** mostra o efeito da administração do doador de NO na despolarização induzida pela capsaicina. A capsaicina foi administrada após a administração de NPS como um controle positivo. Deste modo, a ativação por capsaicina pode ser utilizada para identificar os neurônios nociceptivos viáveis na cultura. A administração de NPS não alterou a resposta à capsaicina nos neurônios nociceptivos.

Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre a ação da Capsaicina em neurônios aferentes primários

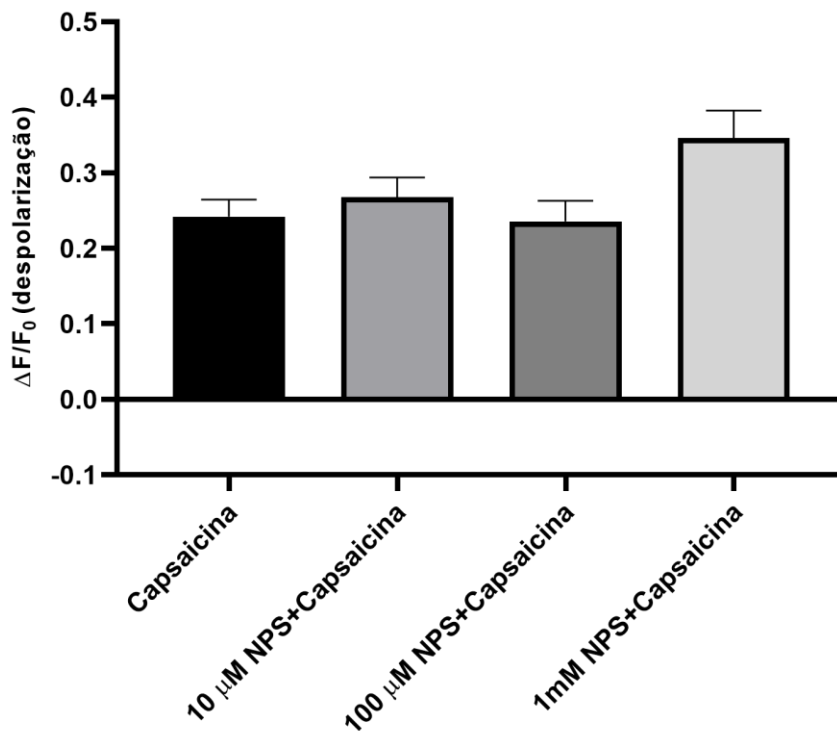


Figura 5: Efeito do Nitroprussiato de Sódio (NPS) sobre a ação da Capsaicina em neurônios aferentes primários. O potencial de repouso neuronal foi avaliado através de mudanças na fluorescência emitida pelo indicador DiBAC₄(3). Está sendo mostrada a alteração de fluorescência induzida por administração de Capsaicina (100 μM) como controle positivo para seleção dos neurônios nociceptivos previamente tratados com NPS (10 μM, 100 μM ou 1 mM) durante 5 minutos. Dados mostrados como média ± EPM. Realizado ANOVA.

Foram realizados ensaios para avaliar os efeitos de um inibidor da sintase de óxido nítrico, o L-NAME, sobre a despolarização induzida por administração de NMDA em neurônios nociceptivos primários em culturas de gânglios da raiz dorsal de ratos. No gráfico apresentado na **Figura 6** é possível observar que a administração do inibidor da NOS produziu inibição da despolarização neuronal induzida por NMDA (-0.07 ± 0.03) quando comparado ao grupo NMDA (0.15 ± 0.04). Foi possível observar um aumento significativo na fluorescência quando a capsaicina foi adicionada ao meio com L-NAME (0.60 ± 0.06) em comparação ao veículo (-0.02 ± 0.03), ou seja, o L-NAME não reduziu a despolarização induzida por capsaicina. De forma semelhante, a presença do L-NAME não reduziu o efeito do KCl (30 mM) (0.22 ± 0.01) em comparação ao veículo (-0.02 ± 0.03). Embora a análise do gráfico sugira que os efeitos da capsaicina e do KCl sejam maiores na presença do L-NAME, temos que considerar

que ambas as substâncias utilizadas como controle positivo foram administradas depois da administração de NMDA. Considerando que o NMDA induziu uma despolarização nas células que não estavam tratadas com L-NAME, estas células apresentavam uma fluorescência basal maior que aquelas não tratadas com o inibidor de NOS.

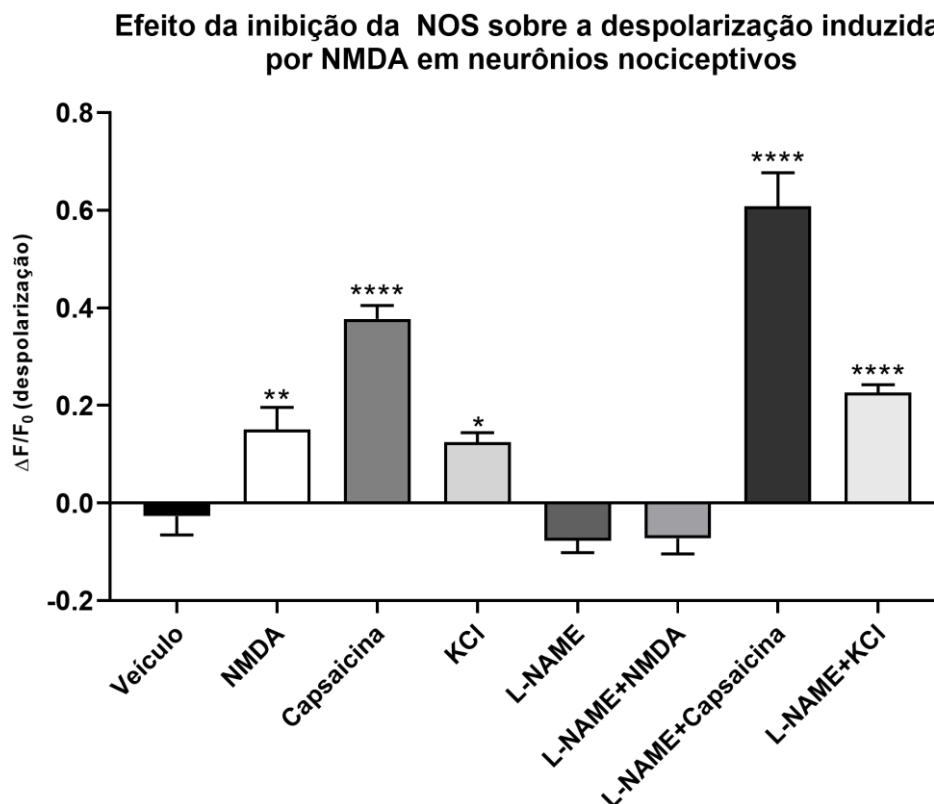


Figura 6: Efeito da inibição da NOS sobre a despolarização induzida por NMDA em neurônios nociceptivos. Variações na fluorescência emitida pelo indicador DiBAC₄(3) em neurônios nociceptivos foram avaliadas utilizando administração sequencial de veículo (Hanks) ou L-NAME (100 μM), seguida da administração de NMDA (250 μM), capsaicina (100 μM) e por fim KCl (30 mM). Dados mostrados como média ± EPM * p<0,001 comparado ao grupo veículo, ANOVA seguida por teste de Dunnett 's.

5.2 Experimentos *in vivo*

5.2.1 Teste de nociceção induzido por capsaicina

A capsaicina induz a nociceção através da estimulação dos neurônios nociceptivos. Deste modo, o intuito desse teste foi de avaliar o impacto da administração do L-NAME acerca das respostas nociceptivas produzidas pelos animais. O L-NAME (100 μM ou 1 mM em 10 μl de salina) foi administrado por via intratecal 15 minutos antes da injeção intraplantar de capsaicina. Importante salientar que substâncias injetadas por via intratecal conseguem atuar

tanto no nível da medula espinhal quanto nos gânglios da raiz dorsal. Não houve diferença significativa no número de reações nociceptivas entre os grupos de animais estudados, como mostrado na **Figura 7**, ou seja, o L-NAME não afetou a nociceção induzida por capsaicina.

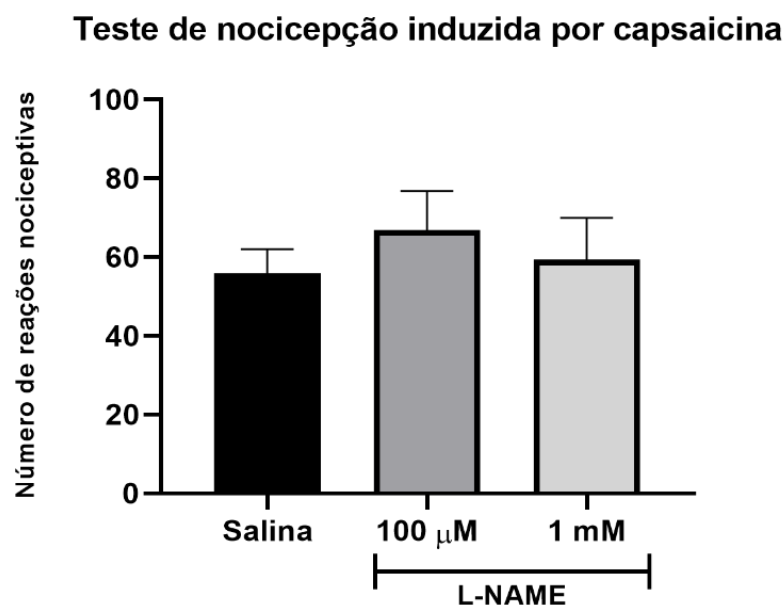


Figura 7: Teste de nociceção induzida por capsaicina. As reações nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos após administração de capsaicina (10 µg em 50 µl, intraplantar). L-NAME ou veículo (salina) foi administrado por via intratecal (em 10 µl) 15 minutos antes da administração de capsaicina. Está sendo mostrada a média e EPM. Realizado ANOVA.

5.2.2 Teste de hiperalgesia inflamatória induzido por carragenina

Foram realizados ensaios para avaliar o impacto da administração do L-NAME acerca do limiar hipernociceptivo produzido pelos animais. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado em quatro momentos: basal, 1h30 depois da administração de intraplantar de carragenina (10 µg em 50 µl), 3h e 4h30. L-NAME (100 µM ou 1 mM em 10 µl) de salina foi administrado por via intratecal (em 10 µl) 2h45 minutos depois da administração de carragenina. Não houve diferença significativa no limiar de sensibilidade mecânica entre os grupos de animais estudados, como mostrado na **Figura 8**, ou seja, o L-NAME não afetou a hiperalgesia induzida pela carragenina.

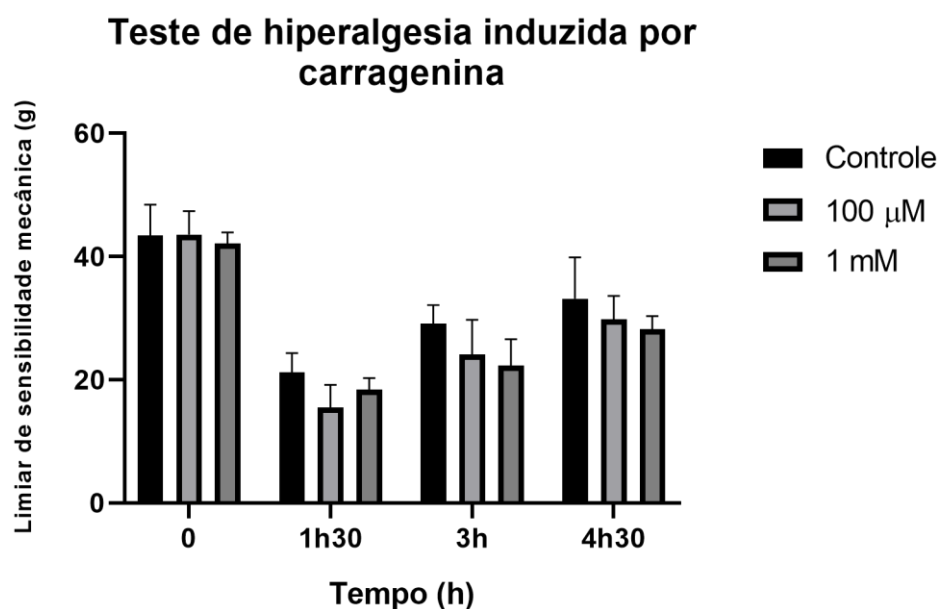


Figura 8: Teste de hiperalgesia induzida por carragenina. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado em quatro momentos: basal, 1h30 depois da administração de carragenina (10 μ g em 50 μ l, intraplantar), 3h e 4h30. L-NAME ou veículo (salina) foi administrado por via intratecal (em 10 μ l) 2h45 minutos depois da administração de carragenina. Está sendo mostrada a média e EPM. Realizado ANOVA.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado o envolvimento do NO na comunicação glutamatérgica entre neurônios aferentes primários e células satélites gliais nos gânglios da raiz dorsal de ratos em cultura e em testes comportamentais, com o intuito de estabelecer uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo. Neurônios e CSG em gânglios sensoriais mantêm comunicações bidirecionais que parecem ser mediadas por mensageiros químicos. Trabalhos nos últimos anos estabeleceram que as interações neurônio-CSG fazem parte desse processamento, em particular após lesão nervosa, mas os mecanismos subjacentes são ainda pouco compreendidos (FELDMAN-GORIACHNIK; HANANI, 2021). Estudo anterior do nosso grupo sugere a participação de NMDAr presentes em CSGs no processamento da dor nos GRDs (FERRARI *et al.*, 2014). Neste estudo foi verificado que o bloqueio de receptores do tipo NMDA nos gânglios da raiz dorsal de ratos inibe a hiperalgisia inflamatória. Além disso, verificou-se que a administração de NMDA em culturas de gânglios da raiz dorsal causa um aumento de $[Ca^{2+}]_i$ em CSGs e não em neurônios, sugerindo uma importante participação destas células no processamento da hiperalgisia inflamatória. Posteriormente, em resultados ainda não publicados, observamos que o bloqueio de NMDAr nos gânglios da raiz dorsal inibe também a dor aguda em modelos que envolvem a ativação de fibras do tipo C. Os dados indicam que durante a transmissão do sinal nociceptivo ocorre uma liberação de glutamato nos GRDs o qual ativa as CSGs e esta ativação possivelmente amplifique o sinal nociceptivo. Esta hipótese foi reforçada quando observamos que a administração de NMDA em culturas de GRD de ratos induz uma despolarização do potencial de repouso de neurônios nociceptivos (Figura 5). Lembrando que a ativação de receptores NMDA se dá nas CSGs, podemos inferir que esta despolarização neuronal ocorre de forma indireta.

Considerando a morfologia do GRD, temos que os corpos celulares dos neurônios estão recobertos por células satélites gliais que isolam um neurônio de seus vizinhos. Deste modo, se nossa hipótese estiver correta e os neurônios ativados liberarem glutamato através de seus corpos celulares, este glutamato irá ativar receptores NMDA nas células satélites que o cobrem. Esta ativação induz aumento de $[Ca^{2+}]_i$ nas CSGs e este íon pode atravessar junções comunicantes presentes nas junções entre células satélites que recobrem neurônios vizinhos, assim como mostrado na Figura 2. Estas CSGs ativadas, por sua vez, irão modular a atividade neuronal dos neurônios vizinhos através da indução de despolarização. Esta despolarização cruzada foi observada por outros autores há muito tempo (AMIR; DEVOR, 1996). Neste estudo observou-se que ativação de um neurônio provocava uma despolarização de neurônios vizinhos, mas não estabeleceu o mecanismo responsável por este processo. Deste modo, este trabalho

anterior corrobora com a ideia de uma amplificação do sinal nos gânglios sensoriais e, em conjunto com os nossos resultados, indica uma participação do glutamato e de NMDAr gliais neste tipo de processamento. Por outro lado, falta ainda identificar o mediador envolvido na despolarização neuronal induzida após ativação das células gliais. No presente estudo, pretendemos avaliar a possível participação do NO neste processo.

Em estudos anteriores foi verificado que o NO induz mudanças que parecem contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal, sendo provável que seja um fator importante na hiperalgesia em modelo do estudo de dor inflamatória (BELZER; HANANI, 2019). O conhecimento do papel do NO em diferentes tipos de dor foi derivada principalmente de experimentos em animais que visaram a observação da expressão das isoformas do NOS em relação a um estímulo nociceptivo. A ideia de que a nNOS contribui para o papel do NO na nocicepção é apoiada pela observação de que sua expressão é rapidamente regulada em neurônios do corno dorsal da medula espinhal após estimulação nociva (MICLESCU; GORDH, 2009). Com base em nossa análise experimental observa-se a administração de um doador de NO, o NPS, causou despolarização nos neurônios nociceptivos do GRD de ratos, o que reforça a possibilidade de participação do NO na regulação da excitabilidade neuronal. Este resultado está em concordância com o resultado obtido por outros autores que também observaram despolarização neuronal após administração do doador de NO (BELZER; HANANI, 2019).

Para avaliar o possível efeito do NO produzido nos GRD, avaliamos tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o efeito da administração de um inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME na despolarização induzida por NMDA em culturas primárias de GRD e em modelo de nocicepção e hiperalgesia inflamatória. A administração do inibidor da NOS, L-NAME, inibiu a despolarização neuronal induzida por NMDA, indicando assim uma interferência do NO na comunicação glutamatérgica. Deste modo é possível que o NO desempenhe um papel como mensageiro retrógrado no SNP, através das CGSs. Um papel semelhante foi anteriormente verificado no sistema nervoso central, onde a ativação de receptores NMDA resulta em liberação de NO por astrócitos (PARK *et al.*, 2020; PÉREZ-NERI *et al.*, 2020).

Outro resultado obtido que nos chama a atenção é o aumento da despolarização neuronal induzida pela capsaicina quando já havia sido previamente adicionado o L-NAME na cultura. Deste modo ao invés do efeito do inibidor da NOS, L-NAME, ser de analgesia, esse resultado sugere que houve um aumento da nocicepção. No entanto, precisamos considerar que a capsaicina foi administrada após a administração de L-NAME e de NMDA. Portanto, os neurônios nociceptivos, na ausência de L-NAME, haviam sido previamente despolarizados pelo NMDA, o que pode interferir na resposta à capsaicina. Deste modo, novos experimentos

deverão ser conduzidos, utilizando apenas o L-NAME e a capsaicina, para determinar o efeito do NO na ativação de receptores TRPV1 para capsaicina. Os mecanismos envolvidos na nocicepção, bem como os efeitos antinociceptivos do NO ainda não estão totalmente caracterizados e trabalho considerável é necessário para elucidar o seu papel na transmissão nociceptiva. É importante ressaltar que NO tem um duplo papel na regulação dos processos de dor, ou seja, pode mediar a nocicepção ou induzir um efeito antinociceptivo (CURY *et al.*, 2011). Já foi descrito anteriormente que a injeção subcutânea de NO em humanos induziu dor (HOLTHUSEN; ARNDT, 1994), indicando um papel pronociceptivo para a atuação do NO na periferia. Contudo estudos também demonstram que o NO tem uma ação analgésica na periferia sendo observado em humanos e animais (VENTURA *et al.*, 2004; HAMZA *et al.*, 2010). No entanto, tal resultado observado pode estar relacionado com os níveis basais de NO (LÓPEZ-FIGUEROA *et al.*, 2001). O NO é um mediador amplamente utilizado na comunicação celular e em mecanismos de transdução intracelulares, seus efeitos dependem da concentração, do local de produção e da isoforma de NOS ativada (NOMURA; KITAMURA, 1993).

Para avaliar a possível participação do NO produzido nos gânglios da raiz dorsal na nocicepção, utilizamos a administração intratecal do inibidor da NOS, o L-NAME, em dois testes comportamentais nos quais a participação da comunicação glutamatérgica era conhecida. O primeiro teste se tratou nocicepção induzida por capsaicina e o segundo teste realizado foi o teste de hiperalgesia induzido por carragenina, ambos em pata de ratos. Observamos na Figura 6 e na Figura 7 que a administração de L-NAME, nas concentrações testadas não alterou as reações nociceptivas no teste da capsaicina e não afetou o limiar de sensibilidade mecânica na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina. Era esperado notar alguma diferença pois há dados na literatura que demonstram que a hiperalgesia induzida por carragenina induz um aumento de NO na medula espinhal de ratos (RIVOT *et al.*, 2003). É encontrado na literatura que moléculas administradas por via intratecal, que consiste na administração de drogas no espaço subaracnóide, podem transpassar para os gânglios da raiz dorsal. Deste modo, drogas injetadas por via intratecal atingem os neurônios presentes na medula, mas também alcançam os neurônios aferentes primários nos gânglios da raiz dorsal (FERRARI *et al.*, 2007). No entanto o fato de não ter sido possível observar modificações mostra que tal passagem possa não ter sido tão efetiva, necessitando de mais testes intraganglionares, possibilitando que seja analisado o efeito da inibição da NOS restrita ao GRD.

Em resumo, nossos resultados indicam a participação do NO na despolarização promovida através da ativação de receptores NMDA em CSGs. Entretanto, mais experimentos são necessários para determinar o papel deste mediador na dor e na hiperalgesia.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo permitem concluir que:

- A ativação de NMDAr em células satélites gliais produz despolarização neuronal em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.
- O L-NAME (100 μ M), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintetase, inibe a despolarização induzida por administração de NMDA em culturas de GRD.
- O Nitroprussiato de Sódio (1 mM), um doador de óxido nítrico, induz despolarização de neurônios nociceptivos primários no GRD.
- A administração de L-NAME por via intratecal, nas doses testadas, não afetou a nocicepção induzida por capsaicina e a hiperalgesia mecânica induzida por injeção de carragenina, ambos na pata de ratos.

REFERÊNCIAS

- AHMED H, HAIDER A, AMETAMEY SM. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor modulators: a patent review (2015-present). *Expert Opin Ther Pat*. 2020 Oct;30(10):743-767. doi: 10.1080/13543776.2020.1811234. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32926646.
- ALLEN NJ, BARRES BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009 Feb 5;457(7230):675-7. doi: 10.1038/457675a. PMID: 19194443.
- AMIR R, DEVOR M. Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci*. 1996 Aug 1;16(15):4733-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-15-04733.1996. PMID: 8764660; PMCID: PMC6579034.
- ARORA DK, COSGRAVE AS, HOWARD MR, BUBB V, QUINN JP, THIPPESWAMY T. Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *J Mol Neurosci*. 2007;32(2):97-107. doi: 10.1007/s12031-007-0014-7. PMID: 17873293
- AVRAHAM O, DENG PY, JONES S, KURUVILLA R, SEMENKOVICH CF, KLYACHKO VA, CAVALLI V. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun*. 2020 Sep 29;11(1):4891. doi: 10.1038/s41467-020-18642-y. PMID: 32994417; PMCID: PMC7524726
- BELZER V, HANANI M. Nitric oxide as a messenger between neurons and satellite glial cells in dorsal root ganglia. *Glia*. 2019 Jul;67(7):1296-1307. doi: 10.1002/glia.23603. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30801760.
- BLEAKMAN D, ALT A, NISENBAUM ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*. 2006 Oct;17(5):592-604. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.10.008. Epub 2006 Oct 28. PMID: 17110139.
- BOWIE D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008 Apr;7(2):129-43. doi: 10.2174/187152708784083821. PMID: 18537642; PMCID: PMC2662616.
- CURY Y, PICOLO G, GUTIERREZ VP, FERREIRA SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide*. 2011 Oct 30;25(3):243-54. doi: 10.1016/j.niox.2011.06.004. Epub 2011 Jun 24. PMID: 21723953.

DENG M, CHEN SR, PAN HL. Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. *Cell Mol Life Sci.* 2019 May;76(10):1889-1899. doi: 10.1007/s00018-019-03047-y. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30788514; PMCID: PMC6482077.

DEVOR M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain.* 1999 Aug;Suppl 6:S27-S35. doi: 10.1016/S0304-3959(99)00135-9. PMID: 10491970.

ESPOSITO MF, MALAYIL R, HANES M, DEER T. Unique characteristics of the dorsal root ganglion as a target for neuromodulation. *Pain Med.* 2019;20(Suppl 1):S23–30. doi: 10.1093/pm/pnz012.

FELDMAN-GORIACHNIK R, HANANI M. How do neurons in sensory ganglia communicate with satellite glial cells? *Brain Res.* 2021 Jun 1;1760:147384. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147384. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33631206.

FERNÁNDEZ-MONTOYA J, AVENDAÑO C, NEGREDO P. The Glutamatergic System in Primary Somatosensory Neurons and Its Involvement in Sensory Input-Dependent Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 27;19(1):69. doi: 10.3390/ijms19010069. PMID: 29280965; PMCID: PMC5796019.

FERRARI LF, CUNHA FQ, PARADA CA, FERREIRA SH. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. *J Neurosci Methods.* 2007 Jan 30;159(2):236-43. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.025. Epub 2006 Sep 14. PMID: 16973217.

FERRARI LF, LOTUFO CM, ARALDI D, RODRIGUES MA, MACEDO LP, FERREIRA SH, PARADA CA. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 23;111(51):18363-8. doi: 10.1073/pnas.1420601111. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25489099; PMCID: PMC4280647.

FIELDS RD, BURNSTOCK G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jun;7(6):423-36. doi: 10.1038/nrn1928. PMID: 16715052; PMCID: PMC2062484.

GOMES FIF, CUNHA FQ, CUNHA TM. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. *Biochem Pharmacol.* 2020 Jun;176:113862. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113862. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32081790.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11. ed.. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2006.

HAMZA M, WANG XM, WU T, BRAHIM JS, ROWAN JS, DIONNE RA. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. *Mol Pain*. 2010 Sep 15;6:55. doi: 10.1186/1744-8069-6-55. PMID: 20843331; PMCID: PMC2949722.

HANANI M, VERKHRATSKY A. Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res*. 2021 Oct;46(10):2525-2537. doi: 10.1007/s11064-021-03255-8. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33523395.

HANANI, M., SPRAY, D.C. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 21, 485–498 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>

HOLTHUSEN H, ARNDT JO. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci Lett*. 1994 Jan 3;165(1-2):71-4. doi: 10.1016/0304-3940(94)90712-9. PMID: 8015741.

JULIUS D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013;29:355-84. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833. PMID: 24099085.

LEE JH, KIM W. The Role of Satellite Glial Cells, Astrocytes, and Microglia in Oxaliplatin-Induced Neuropathic Pain. *Biomedicines*. 2020 Sep 2;8(9):324. doi: 10.3390/biomedicines8090324. PMID: 32887259; PMCID: PMC7554902.

LEIGUARDA C, MCCARTHY CJ, CASADEI M, LUNDGREN KH, CORONEL MF, TRIGOSSO-VENARIO H, SEAL RP, SEROOGY KB, BRUMOVSKY PR. Transcript Expression of Vesicular Glutamate Transporters in Rat Dorsal Root Ganglion and Spinal Cord Neurons: Impact of Spinal Blockade during Hindpaw Inflammation. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Sep 2;11(17):2602-2614. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00272. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32697906.

LEIJNSE JN, D'HERDE K. Revisiting the segmental organization of the human spinal cord. *J Anat*. 2016 Sep;229(3):384-93. doi: 10.1111/joa.12493. Epub 2016 May 12. PMID: 27173936; PMCID: PMC4974552.

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

LÓPEZ-FIGUEROA MO, CAAMAÑO C, MARIN R, GUERRA B, ALONSO R, MORANO MI, AKIL H, WATSON SJ. Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Sep 26;1540(3):253-64. doi: 10.1016/s0167-4889(01)00138-0. PMID: 11583820.

MACHADO, A. B. M., HAERTHEL, L. M. *Neuroanatomia funcional*. 3rd ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 276-278

MANDGE D, SHUKLA PR, BHATNAGAR A, MANCHANDA R. Computational Model for Cross-Depolarization in DRG Neurons via Satellite Glial Cells using [K]_o: Role of Kir4.1 Channels and Extracellular Leakage. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2019 Jul;2019:2320-2323. doi: 10.1109/EMBC.2019.8857153. PMID: 31946364

MICLESCU A, GORDH T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009 Oct;53(9):1107-20. doi: 10.1111/j.1399-6576.2009.02054.x. Epub 2009 Aug 21. PMID: 19702699.

NOMURA Y, KITAMURA Y. Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci Res*. 1993 Nov;18(2):103-7. doi: 10.1016/0168-0102(93)90013-g. PMID: 7510374.

PARK AR, LEE HI, SEMJID D, KIM DK, CHUN SW. Dual effect of exogenous nitric oxide on neuronal excitability in rat substantia gelatinosa neurons. *Neural Plast*. 2014;2014:628531. doi: 10.1155/2014/628531. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24511395; PMCID: PMC3910459.

PATEL NB. Physiology of pain. Guide to pain management in low-resource settings. Kopf A, PatelNB eds. *International Association for the Study of Pain*. Seattle 2010:13-17.

PÉREZ-NERI I, RAMÍREZ-BERMÚDEZ J, OJEDA-LÓPEZ C, MONTES S, SOTO-HERNÁNDEZ JL, RÍOS C. Glutamine and citrulline concentrations reflect nitric oxide synthesis in the human nervous system. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020 Mar;35(2):96-104. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2017.07.013. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28867511.

PETRENKO AB, YAMAKURA T, BABA H, SHIMOJI K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003 Oct;97(4):1108-1116. doi: 10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55. PMID: 14500166.

PINHEIRO PS, MULLE C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jun;9(6):423-36. doi: 10.1038/nrn2379. Epub 2008 May 9. PMID: 18464791.

POPE JE, DEER TR, KRAMER J. A systematic review: current and future directions of dorsal root ganglion therapeutics to treat chronic pain. *Pain Med*. 2013 Oct;14(10):1477-96. doi: 10.1111/pme.12171. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23802747.

RAJA SN, CARR DB, COHEN M, FINNERUP NB, FLOR H, GIBSON S, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;23. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001939.

RIVOT JP, MONTAGNE-CLAVEL J, BESSON JM. Subcutaneous formalin and intraplantar carrageenan increase nitric oxide release as measured by in vivo voltammetry in the spinal cord. *Eur J Pain*. 2002;6(1):25-34. doi: 10.1053/eujp.2001.0268. PMID: 11888225.

ROZANSKI GM, LI Q, STANLEY EF. Transglial transmission at the dorsal root ganglion sandwich synapse: glial cell to postsynaptic neuron communication. *Eur J Neurosci*. 2013 Apr;37(8):1221-8. doi: 10.1111/ejn.12132. Epub 2013 Jan 25. PMID: 23351144.

RUIZ-SOTO M, RIANCHO J, TAPIA O, LAFARGA M, BERCIANO MT. Satellite Glial Cells of the Dorsal Root Ganglion: A New "Guest/Physiopathological Target" in ALS. *Front Aging Neurosci*. 2020 Nov 9;12:595751. doi: 10.3389/fnagi.2020.595751. PMID: 33240079; PMCID: PMC7680735.

SAKURADA, T., KATSUMATA, K., TAN-NO, K., SAKURADA, S., KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, v. 31, n. 12, p. 1279–85, dez. 1992. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(92\)90057-V](https://doi.org/10.1016/0028-3908(92)90057-V)

SNEDDON, L. U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 33(1), 63–73. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00022.2017>

SOUZA GR, TALBOT J, LOTUFO CM, CUNHA FQ, CUNHA TM, FERREIRA SH. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proc Natl*

Acad Sci U S A. 2013 Jul 2;110(27):11193-8. doi: 10.1073/pnas.1307445110. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23776243; PMCID: PMC3704031.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. *Surgery*, [s.l.], v. 27, n. 12, p. 507–511, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.10.013>

TANG X, SCHMIDT TM, PEREZ-LEIGHTON CE, KOFUJI P. Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is responsible for the native inward potassium conductance of satellite glial cells in sensory ganglia. *Neuroscience*. 2010 Mar 17;166(2):397-407. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.005. Epub 2010 Jan 14. PMID: 20074622; PMCID: PMC2823846.

UTZSCHNEIDER D, KOCSIS J, DEVOR M. Mutual excitation among dorsal root ganglion neurons in the rat. *Neurosci Lett*. 1992 Oct 26;146(1):53-6. doi: 10.1016/0304-3940(92)90170-c. PMID: 1475049.

VENTURA-MARTÍNEZ R, DÉCIGA-CAMPOS M, DÍAZ-REVAL MI, GONZÁLEZ-TRUJANO ME, LÓPEZ-MUÑOZ FJ. Peripheral involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the indomethacin-induced antinociception in rat. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 25;503(1-3):43-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.09.018. PMID: 15496294.

VERKHRATSKY A, NEDERGAARD M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):239-389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016. PMID: 29351512; PMCID: PMC6050349.

WANG, D., LU, J., XU, X., YUAN, Y., ZHANG, Y., XU, J., CHEN, H., LIU, J., SHEN, Y., & ZHANG, H. (2021). Satellite Glial Cells Give Rise to Nociceptive Sensory Neurons. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(3), 999–1013. <https://doi.org/10.1007/S12015-020-10102-W>

WARWICK RA, HANANI M. The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *Eur J Pain*. 2013 Apr;17(4):571-80. doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00219.x. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23065831.

WATKINS LR, MAIER SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Dec;2(12):973-85. doi: 10.1038/nrd1251. PMID: 14654796.

WILTSE LL. Anatomy of the extradural compartments of the lumbar spinal canal. Peridural membrane and circumneural sheath. *Radiol Clin North Am*. 2000 Nov;38(6):1177-206. doi: 10.1016/s0033-8389(08)70003-4. PMID: 11131629.

YAKSH TL, WOLLER SA, RAMACHANDRAN R, SORKIN LS. The search for novel analgesics: targets and mechanisms. *F1000Prime Rep*. 2018 May 26;7:56. doi: 10.12703/P7-56.

YAMADA, A. et al. Usefulness and limitation of DiBAC4(3), a voltage-sensitive fluorescent dye, for the measurement of membrane potentials regulated by recombinant large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in HEK293 cells. *Japanese Journal of Pharmacology*, Nagoya, v. 86, n. 3, p. 342–350, 2001.

ZHOU Y, DANBOLT NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24578174; PMCID: PMC4133642.