

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUIZ FERNANDO FERRARI

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE
GLUTAMATO TIPO NMDA PRÉ-
SINÁPTICOS NA SENSIBILIZAÇÃO DOS
NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS**

RIBEIRÃO PRETO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ FERNANDO FERRARI

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE
GLUTAMATO TIPO NMDA PRÉ-
SINÁPTICOS NA SENSIBILIZAÇÃO DOS
NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira.

Co-Orientadores: Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada e Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.

RIBEIRÃO PRETO

2008

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrari, Luiz Fernando

Participação dos receptores de glutamato tipo NMDA pré-sinápticos na sensibilização dos neurônios aferentes primários./ Luiz Fernando Ferrari; orientador Sérgio Henrique Ferreira; co-orientadores Fernando de Queiroz Cunha, Carlos Amílcar Parada.

___Ribeirão Preto, 2008.

160 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: 1. receptores N-metil-D-aspartato; 2. neurônio aferente primário; 3. gânglio da raiz dorsal; 4. células satélites; 5. injeção intraganglionar; 6. glutamato; 7. hipernocicepção retrógrada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Fernando Ferrari

Participação dos receptores de glutamato tipo NMDA pré-sinápticos na sensibilização dos neurônios aferentes primários.

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação.

Aprovada em ___ / ___ / 2008.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

FMRP/USP

Assinatura _____

Profa. Dra. Leda de Oliveira Menescal

FMRP/USP

Assinatura _____

Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

FOP/UNICAMP

Assinatura _____

Profa. Dra. Yara Cury

Instituto Butantã

Assinatura _____

Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

FMRP/USP

Assinatura _____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Às pessoas de minha família, que me acompanharam neste período, expresso minha gratidão pela paciência e compreensão... Em especial agradeço à minha mãe, Vanda Peres da Cruz, e a meu pai, o professor José Osvaldo Ferrari, pois, de uma maneira ou de outra, são os responsáveis pela concretização deste trabalho.

Aos meus padrinhos Maurício e Lúcia, que sempre me ouviram e estiveram ao meu lado, mesmo de longe, acompanhando essa jornada.

À minha querida Érika Bulos, que tanto tem me ensinado e mostrado quais são as coisas mais importantes na vida...

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Sérgio Henrique Ferreira**, por ter me dado a oportunidade de conhecer o verdadeiro sentido da palavra CIÊNCIA, e pelos preciosos ensinamentos durante todos esses anos de Pós Graduação. Agradeço-o por ter acreditado em mim.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, pela co-orientação e acompanhamento de meu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada**, grande e fraterno amigo, pelas discussões, conversas e apoio não somente profissional, mas também pessoal. Sua participação na elaboração deste trabalho foi fundamental.

À **Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo**, a quem devo agradecer em dobro, tanto pela grande amizade quanto pela participação direta neste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado**, pelas ótimas conversas e discussões, que muito me ensinaram. É uma honra tê-lo como parte da banca de avaliação de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Leda de Oliveira Menescal**, que desde o Mestrado me acompanhou, mostrando o lado jovial e gratificante da pesquisa, explicitado em suas conversas sempre agradáveis. Fico extremamente honrado com sua presença na banca avaliadora de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Yara Cury**, pelo carinho e atenção com que avaliou este trabalho. É uma honra tê-la presente na banca de avaliação de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli**, pela amizade e pelo exemplo de responsabilidade. Sua participação na banca de avaliação desta Tese é uma honra para mim.

A todos os **Professores do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP**, pela convivência e os sempre valiosos ensinamentos.

Aos **Professores e funcionários membros da Comissão de Pós Graduação da FMRP-USP**, obrigado pela agradável convivência nestes anos todos em que fui representante discente (**Prof. Dr. Júlio Marchini, Profa. Dra. Ângela Cruz, Prof. Dr. Carlos Carlotti, Prof. Dr. Amilton Barreira, Profa. Dra. Ísis Kettelhut, Profa. Dra. Maria Cristina Salgado, Profa. Dra. Marisa Pinhata, Prof. Dr. Ademilson Espencer, Sílvia, Jesiane, Márcia, Rosângela, Cláudia, Samuel, André** – se esqueci de alguém, por favor, me perdoem).

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP **Sônia Maria Stefanelli**, **Fátima Helena Petean** (as nossas “mãezonas” na PG) e **José Waldik Ramón** (nosso caro “Ratão”), pela amizade, pelas conversas e assistência técnica-científica.

À **Celina Monteiro da Cruz Lotufo**, grande amiga que foi esquecida nos agradecimentos em minha Dissertação de Mestrado, motivo pelo qual faço essa *mea culpa*, agradecendo-a novamente.

À querida amiga **Dionéia Araldi**, que tantas vezes emprestou-me seu ombro e me ajudou a seguir em frente.

Ao meu amigo **Marcos Rodrigues**, sua esposa e minha amiga **Edilene** e as filhas **Ana**, **Lúcia** e **Júlia**. Conviver com sua família me trouxe mais para perto da minha.

Aos amigos da **Associação dos Pós Graduandos da USP de Ribeirão Preto** (nossa querida APG das chapas “Ativa”, “Resistência” e (porque não dizer?) “Persistência”) e companheiros de representação discente (queridos **Patrícia Monteiro**, **Carlos Giovani**, **Marcos “Zana” Rodrigues**, **Helena Vassinom**, **Dawit**, **Eduardo**, **Marcelo**, **Rodrigo**, **Vanessa**, **Maira**, **Fernanda**, sem esquecer dos longínquos **Maria Regina**, **Daniel Badauê**, **Ricardo Menani**, **Renato** e **Jalile** – a “velha guarda”), garanto a vocês que foi um dos melhores grupos em que participei... guardarei vocês em meu coração...

Aos **amigos do DOL**, Dor OnLine, pelas discussões, muitas vezes acalorada, sobre Ciência. Deixo um grande abraço para os companheiros **Ramón** e **Fabíola Mestriner**, pelas risadas e ajuda nas cobranças do material para a edição em cada final de mês.

Às secretárias-amigas **Valéria** e **Vanessa Rinhel**, por ajudar-me a passar por cima dos percalços burocráticos encontrados.

À **Maria Inês** e **Eliana Beatriz**, pelo cuidado com os animais no biotério do Departamento.

Aos técnicos do Laboratório de Dor e Inflamação **Ieda Regina dos Santos Schivo**, **Sérgio Roberto Rosa**, **Ana Kátia dos Santos**, **Giuliana Bertozzi** e **Fabíola L. A. C. Mestriner**, o meu MUITO OBRIGADO e um forte abraço, pelas pessoas que são, pelos ensinamentos sobre protocolos, ajuda nos experimentos e agradável convívio.

Aos técnicos dos demais laboratórios do Departamento **Marquinhos** e **Paulo**, **Afonso**, **José Carlos**, **Eleni** e a divertida **Diva**, pela ajuda eventual e ótimas conversas.

A **todos os amigos de dentro e fora do Laboratório**, que me acompanharam nesta estrada (para não esquecer ninguém, prefiro não nomear) em alguns dias ensolarados, em outros nublados, mas sempre presentes.

À **CAPES, CNPq e FAPESP**, pelo auxílio.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e que, porventura, não foram citados, o meu **MUITO OBRIGADO!!!!!!**

E finalmente àqu'Ele que monta as peças neste tabuleiro que é a vida, e cuida para que as coisas aconteçam sempre no *momento certo*, no *lugar certo* e pelo *motivo certo*... As reticências são para mostrar que ainda existe um longo caminho pela frente...

“A ciência substitui o visível complicado pelo invisível simples”.

Jean Perrin (1870-1942)

“A ciência serve apenas para se verificarem as descobertas do instinto”.

Jean Cocteau (1889-1963)

RESUMO

FERRARI, L. F. Participação dos receptores de glutamato tipo NMDA pré-sinápticos na sensibilização dos neurônios aferentes primários. **2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.**

A sensibilização retrógrada dos neurônios aferentes primários, primeiramente descrita na última década do século passado, associava receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDARs) pré-sinápticos à diminuição do limiar de ativação dos nociceptores. Posteriormente, também foi sugerido que esse processo retrógrado estaria relacionado a um mecanismo intracelular de comunicação e integração entre os terminais opostos do neurônio aferente primário (NAP). Utilizando o teste comportamental de von Frey eletrônico e microscopia confocal, o presente trabalho investigou os mecanismos pelos quais os NMDARs pré-sinápticos induzem a sensibilização do NAP e como ocorre a comunicação entre diferentes regiões da célula neuronal. Primeiramente foi observado que os NMDARs presentes no gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos Wistar são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da hipernocicepção de origem inflamatória, a qual foi bloqueada pela administração intraganglionar (i.gl.) do antagonista seletivo para esse receptor, D-AP-5. Experimentos com o bloqueio temporário da expressão de subunidades de NMDARs (NR1, NR2a-d e NR3a-b) mostraram que NMDARs ganglionares compostos pelas subunidades NR1, NR2b, NR2d ou NR3a participam da hipernocicepção periférica. Mais ainda, observações por microscopia confocal em culturas de neurônios do GRD sugeriram que estes receptores provavelmente possuem subunidades NR3, que diminuem a susceptibilidade ao bloqueio por magnésio (Mg^{+2}) e a necessidade de despolarização prévia para funcionamento. Interessantemente, apenas NMDARs localizados nas células da glia ganglionares (células satélites) foram ativados nas culturas após adição de NMDA. Esses receptores também foram relacionados à ativação de oscilações de cálcio (Ca^{+2}) intraneuronais (conhecidas como CICR), um dos possíveis mecanismos responsáveis pela comunicação das diferentes regiões neuronais. A hipernocicepção induzida por injeção intratecal (i.t.) de NMDA foi bloqueada por antagonistas de CICR, confirmando nossa hipótese. Além disso, tanto o Ca^{+2} extracelular quanto intracelular, liberado pela ativação de receptores envolvidos com a CICR, após a ativação de NMDARs ganglionares, parecem ser importantes para a sensibilização do NAP como um todo.

Em adição à CICR, consideramos também a participação de proteínas quinases (PKCε e PKA) neste processo de comunicação intraneuronal, já que foram observadas alterações na expressão destas proteínas no GRD após estimulação inflamatória na pata de animais. A inibição, pelo D-AP-5 i.g.l., da hipernocicepção induzida por agonistas de PKCε ou de PKA, administrados na pata, somada à inibição da hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t. por inibidores dessas proteínas quinases administrados no GRD, sugere que tais mensageiros intracelulares podem ser ativados no GRD via NMDARs ganglionares e que estas proteínas podem induzir liberação de GLU e ativar estes receptores. Mais ainda, indica fortemente que estas proteínas quinases, paralelamente à CICR, estão envolvidas no mecanismo de comunicação intraneuronal estudado.

Considerando os resultados em conjunto, concluímos que os NMDARs presentes nas células satélites do GRD participam ativamente da hipernocicepção inflamatória do NAP, estimulando mecanismos que levam à integração das diferentes regiões das células neuronais. Esses mecanismos seriam dependentes da entrada de Ca^{+2} via estes receptores e da liberação de Ca^{+2} do retículo endoplasmático, ativando a CICR e, possivelmente, segundos-mensageiros intracelulares.

PALAVRAS-CHAVE: receptores N-metil-D-aspartato; neurônio aferente primário; gânglio da raiz dorsal; células satélites; injeção intraganglionar; glutamato; hipernocicepção retrógrada.

ABSTRACT

FERRARI, L. F. **Role of presynaptic glutamate receptors NMDA in the sensitization of the primary afferent neurons.** 2008. Thesis (Doctoral) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2008.

The retrograde sensitization of the primary afferent neurons, firstly described in the last decade of the past century, associated the presynaptic glutamatergic receptors N-methyl-D-aspartate (NMDARs) to the decrease in the nociceptors activation threshold. Later, it was also suggested that such process would be related to an intracellular mechanism of communication and integration between the opposite terminals of the primary afferent neuron (PAN). Using the behavioral test electronic von Frey and confocal microscopy, the present study investigated the mechanisms by which the presynaptic NMDARs induce the retrograde sensitization and how the communication between different regions of the neuronal cell occurs. Initially, it was observed that dorsal root ganglion (DRG) NMDARs of Wistar rats are essential for the development and maintenance of the inflammatory hypernociception, which was inhibited by the intraganglionar (i.gl.) administration of D-AP-5, a selective NMDAR antagonist. The temporary knock down of the expression of NMDARs subunits (NR1, NR2a-d and NR3a-b) showed that the subunits NR1, NR2b, NR2d or NR3a are involved in peripheral hypernociception. Moreover, observations of cultured DRG neurons in confocal microscopy suggested that these receptors probably have NR3 subunits in their composition. These subunits diminish the susceptibility to the magnesium (Mg^{+2}) blockade and the dependence on previous depolarization for NMDAR activation. Interestingly, only NMDARs located in ganglionar glial cells (satellite cells) were activated in the cultures after NMDA administration. These receptors were also related to the triggering of the intraneuronal calcium (Ca^{+2}) oscillations (known as CICR), one of the potential mechanisms responsible by the communication of different neuronal cell regions. The intrathecal (i.t.) NMDA-induced hypernociception was blocked by CICR antagonists, what confirmed our hypothesis. Besides, both extracellular and intracellular Ca^{+2} , released by activation of intracellular Ca^{+2} stores receptors (such as ryanodine receptors), after ganglionar NMDARs activation, seem to be important for the sensitization of the PAN.

In addition to the CICR, we also considered the involvement of proteins kinases (PKC ϵ and PKA) in this intraneuronal communication process, as it was demonstrated that an inflammatory stimulus in the rat hind paw induced changes in the expression of such proteins

in the DRG. The inhibition, by i.g.l. D-AP-5, of the hypernociception induced by intraplantar administration of PKC ϵ or PKA agonists, together with the inhibition of the i.t. NMDA-induced hypernociception by these proteins inhibitors, administrated into the DRG, suggest that such intracellular messengers may be activated in the DRG via ganglionar NMDARs and that these proteins can induce glutamate release and activation of these receptors. Furthermore, it strongly indicates that these proteins kinases, in parallel with the CICR process, are involved in the intraneuronal communication mechanism studied by us.

Considering all the results, we conclude that the NMDARs located in the DRG satellite cells intensely participate of the PAN inflammatory hypernociception, by stimulating mechanisms that lead to the integration of different regions of the neuronal cells. Such mechanisms would be dependent on Ca⁺² entrance through the NMDARs and on Ca⁺² release from the endoplasmatic reticulum, activating CICR and, possibly, intracellular second-messengers.

KEYWORDS: N-methyl-D-aspartate receptors; primary afferent neuron; dorsal root ganglion; satellite cells; intraganglionar injection; glutamate; retrograde hypernociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Detalhes do aparato confeccionado para injeção direta no gânglio da raiz dorsal (GRD).....	54
Figura 3.2: Detalhes do procedimento de injeção direta no gânglio da raiz dorsal L5 (GRD-L5).....	55
Figura 3.3: Equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico).....	57
Figura 3.4: Momento do teste de pressão crescente na pata do animal.....	57
Figura 3.5: Parâmetros utilizados para o cálculo da intensidade de hipernocicepção mecânica avaliado no teste de pressão crescente na pata de ratos – Von Frey eletrônico.....	58
Figura 4.1a: Efeito hipernociceptivo do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (painel A) ou intraganglionar (i.gl.) (painel B).....	68
Figura 4.1b: Curva tempo-resposta da hipernocicepção induzida pela administração de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) por via intraplantar (i.pl.) (□) e do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (Δ) ou intraganglionar (i.gl.) (◇).....	69
Figura 4.2: Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre a hipernocicepção induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.....	71
Figura 4.3: Efeito do pré-tratamento intratecal (i.t.) com fluorocitrato, droga inibidora do metabolismo de células da glia, sobre a hipernocicepção induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.....	73
Figura 4.4: Efeito antinociceptivo do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE ₂ (painel A) ou intratecal (i.t.) de NMDA (painel B).....	75
Figura 4.5: Efeito em função do tempo do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intratecal (i.t., painel A) ou intraganglionar (i.gl., painel B) sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	77
Figura 4.6: Efeito em função do tempo do pré-tratamento com o antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado via intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	79

Figura 4.7: Efeito da administração intraganglionar (i.gl.) do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 sobre a hipernociceção induzida pela PGE ₂ injetada na pata de ratos por via subcutânea (s.c., painel A) ou intradérmica (i.d., painel B).....	81
Figura 4.8a: Indução de hipernociceção pela administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), do agonista de receptores AMPA.....	83
Figura 4.8b: Bloqueio pela administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), do antagonista de receptores AMPA DNQX da hipernociceção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE ₂	84
Figura 4.9: Expressão de RNAm para subunidades de receptores NMDA no cerebelo (painel A) e nos gânglios das raízes dorsais L4, L5 e L6 (painel B) de ratos Wistar.....	86
Figura 4.10: PAINEL A: Hipernociceção mecânica induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE ₂ após <i>knock down</i> das subunidades estruturais de NMDARs. PAINEL B: Expressão de RNAm para as subunidades de NMDARs nos GRDs-L5 de animais <i>naïve</i> ou tratados com mismatch (MIS) ou ODN-AS por via intraganglionar (i.gl.).....	88
Figura 4.11: Bloqueio da hipernociceção, induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE ₂ , pela administração local do quelante de cálcio intracelular BAPTA.....	90
Figura 4.12: Bloqueio da hipernociceção, induzida por injeção intraplantar (i.pl.) de PGE ₂ (painel A e Painel B) ou por injeção intratecal (i.t.) de NMDA (painel C), pela administração intraganglionar (i.gl.) do antagonista de receptores rianodine dantrolene (painéis A e C) ou do quelante de Ca ⁺² BAPTA (painel B).....	92
Figura 4.13a: Imagens de cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal após administração de NMDA.....	94
Figura 4.13b: Efeito do NMDA sobre os níveis de cálcio intracelular em neurônios do gânglio da raiz dorsal (painel A) e em células da glia (painel B).....	95
Figura 4.14: Efeito da PGE ₂ sobre o Ca ⁺² intracelular em neurônios isolados do gânglio da raiz dorsal.....	97
Figura 4.15: O CaCl ₂ presente na solução tampão Hank's foi substituído pelo quelante de Ca ⁺² EGTA. A PGE ₂ (1 µM) foi adicionada às culturas e, os níveis de fluorescência devido ao influxo de Ca ⁺² , avaliados. PAINEL A: PAINEL B: Efeito do dantrolene sobre o aumento de Ca ⁺² intracelular induzido pela PGE ₂	99
Figura 4.16: Efeito do NMDA sobre neurônios do GRD em cultura.....	101
Figura 4.17a: Efeito do NMDA sobre culturas primárias de neurônios do GRD de três dias.....	103

Figura 4.17b: Efeito do NMDA sobre células satélites isoladas.....	104
Figura 4.18a: Células do GRD contém vesículas para transporte e liberação de glutamato.	106
Figura 4.18b: Marcação com anticorpos para células satélites (cor verde, painel D), para vesículas transportadoras de GLU (cor vermelha, painel E) e co-localização das duas marcações (painel F).....	106
Figura 4.19: Bloqueio, pelo antagonista de receptores rianodine dantrolene, das oscilações de Ca^{+2} induzidas pelo NMDA em cultura de células satélites isoladas.....	107
Figura 4.20: Efeito do NMDA em células satélites isoladas cultivadas em meio com Mg^{+2}	108
Figura 4.21a: Oscilações de Ca^{+2} em células satélites presentes em cultura de neurônios do GRD.....	110
Figura 4.21b: Inibição, pelo antagonista de NMDARs D-AP-5, das oscilações de Ca^{+2} em células satélites em culturas de células do GRD.....	110
Figura 4.21c: Inibição, pelo antagonista de receptores rianodine dantrolene, das oscilações de Ca^{+2} em células satélites em culturas de células do GRD.....	111
Figura 4.22: Efeito do inibidor de proteína quinase C epsilon (<i>PKCε</i> inib) (painel A) e dos inibidores da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e WIPTIDE (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E_2 (PGE_2).....	113
Figura 4.23: Efeito do inibidor de proteína quinase C epsilon (<i>PKCε</i> inib) (painel A) e dos inibidores de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e WIPTIDE (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.....	115
Figura 4.24: Efeito em função do tempo do inibidor de proteína quinase C epsilon (<i>PKCε</i> inib) (painel A), do inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e do inibidor da enzima adenilato ciclase SQ22536 (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E_2 (PGE_2).....	118
Figura 4.25: Efeito em função do tempo do inibidor de proteína quinase C epsilon (<i>PKCε</i> inib) (painel A), do inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e do inibidor da enzima adenilato ciclase SQ22536 (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.....	120

Figura 4.26: Efeito do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado no GRD (i.gl.) sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) do agonista específico de PKC ϵ ψ RACK (painel A), da subunidade catalítica de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (painel B) ou do análogo de AMPc dbAMPc (painel C).....122

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l - microlitros

$[Ca^{2+}]_i$ - concentração de Ca^{2+} intracelular

AAE - aminoácido excitatório

ADP - adenosina-difosfato

AMPA - *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ASP - aspartato

Ca^{+2} - íon cálcio

CICR - *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release* (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+})

cm - centímetro

COX - ciclooxigenase

DAG - diacilglicerol

D-AP-5 - D-2-amino-phosphonopentanoato

DMSO – dimetilsulfóxido

DNQX - 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione

NGF - Fator de Crescimento Neural

g - gramas

GLU - glutamato

GLY - glicina

GRD – gânglio da raiz dorsal

GRD-L5 - gânglio da raiz dorsal do quinto nervo lombar

i.d. – intradérmica

i.gl. - intraganglionar

i.p. –intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

i.t. - intratecal

IASP – *International Association for the Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da Dor)

IP_3 - (inositol (1,4,5)-trifosfato)

K^+ - íon potássio

Mg^{+2} – magnésio

MIS - mismatch

mm - milímetros
Na⁺ - íon sódio
ng – nanograma
NMDA – N-metil-D-aspartato
NMDARs - receptores NMDA
ODN-AS - oligodeoxinucleotídeos antisenses
PDE - fosfodiesterase
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGI₂ - prostaciclina
PGs - prostaglandinas
PIP₂ - fosfatidilinositol-bifosfato
PKA - proteína quinase dependente de AMPc
PKC - proteína quinase C
PLC - fosfolipase C
RNAm – RNA mensageiro
RyR - receptor para rianodina
s.c. – subcutânea
SNC – sistema nervoso central
SP – substância P
TTX-r – tetrodotoxina-resistente
µg - micrograma
µm - micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
1.1 AS VIAS DE DETECÇÃO E CONDUÇÃO DA INFORMAÇÃO DOLOROSA.....	26
1.1.1 Estimulação das vias nociceptivas.....	28
1.1.2 Hiperalgisia / hipernocicepção.....	29
1.2 MEDIADORES ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO DE ORIGEM INFLAMATÓRIA DOS NEURÔNIOS PERIFÉRICOS.....	30
1.2.1 Mecanismos extracelulares de hipernocicepção – envolvimento de mediadores liberados durante o processo inflamatório.....	30
1.2.2 Mecanismos intracelulares da hipernocicepção.....	32
1.3 CANAIS IÔNICOS – MECANISMOS DE ALTERAÇÃO DO LIMIAR DE DISPARO DOS NOCICEPTORES.....	34
1.3.1 Canais de sódio voltagem-dependentes.....	34
1.3.2 Canais de potássio.....	35
1.3.3 Outros canais iônicos.....	36
1.3.3.1 Cálcio e liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} (CICR).....	36
1.4 A TRANSMISSÃO SINÁPTICA.....	38
1.4.1 O glutamato como aminoácido excitatório.....	39
1.5 RECEPTORES NMDA.....	41
1.5.1 Características gerais dos NMDARs.....	41
1.5.1.1 Os NMDARs são canais catiônicos permeáveis ao cálcio.....	43
1.5.1.2 Bloqueio por magnésio.....	44

1.5.1.3 Glicina como co-agonista.....	44
1.5.1.4 Subunidades estruturais dos NMDARs.....	45
1.6 CONSIDERAÇÕES: A SENSIBILIZAÇÃO RETRÓGRADA DO NEURÔNIO AFERENTE PRIMÁRIO.....	46
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 ANIMAIS.....	50
3.2 ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS.....	50
3.2.1 Administração intraplantar (i.pl.) de drogas.....	50
3.2.1.1 Via subcutânea (s.c.).....	50
3.2.1.2 Via intradérmica (i.d.).....	50
3.2.2 Administração intratecal (i.t.) de drogas através do método direto.....	51
3.2.3 Administração de drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal (i.gl.).....	51
3.2.3.1 Preparação da cânula para injeção intraganglionar.....	51
3.2.3.2 Localização e injeção no gânglio da raiz dorsal L5.....	52
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	56
3.3.1 Teste de pressão crescente na pata de ratos – Von Frey eletrônico.....	56
3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DE RECEPTORES NMDA NOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS DOS NERVOS ESPINAIS LOMBARES.....	59

3.4.1 Retirada dos gânglios das raízes dorsais.....	59
3.4.2 Extração do RNA e preparo do cDNA.....	59
3.4.3 Reações de PCR em tempo real (<i>real time</i>-PCR).....	60
3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	61
3.5.1 Cultura de neurônios dos gânglios das raízes dorsais.....	61
3.5.2 Imunofluorescência em cortes e culturas de gânglios das raízes dorsais.....	62
3.5.3 Verificação da dinâmica de cálcio em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal por microscopia confocal.....	62
3.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	63
3.7 DROGAS E DILUENTES.....	63
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Avaliação do efeito hipernociceptivo do NMDA administrado no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) e comparação com o efeito hipernociceptivo do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (curvas dose-resposta e tempo-resposta).....	67
4.2 Efeito do pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) ou intratecal (i.t.) com indometacina sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.....	70
4.3 Efeito do pré-tratamento intratecal (i.t.) com fluorocitrato sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.....	72
4.4 Avaliação do efeito antinociceptivo em relação à dose do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂) intraplantar (i.pl.) ou pelo NMDA intratecal (i.t.).....	74
4.5 Avaliação do tempo de ação do D-AP-5 administrado por via intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).....	76

4.6 Avaliação do efeito em função do tempo do pré-tratamento intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) com D-AP-5 sobre a hipernociceção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE₂.....	78
4.7 Ativação de receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal é responsável pela manutenção da hipernociceção induzida pela PGE₂ administrada na pata de ratos por via subcutânea, mas não por via intradérmica.....	80
4.8 A administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), de AMPA induz hipernociceção mecânica na pata de ratos.....	82
4.9 Determinação das subunidades de receptores NMDA (NMDARs) presentes nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) L4, L5 e L6 de ratos.....	85
4.10 Avaliação da intensidade da hipernociceção mecânica induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE₂ após <i>knock down</i> das subunidades de NMDARs.....	87
4.11 O cálcio (Ca⁺²) intracelular local parece ser importante para o início, mas não para a manutenção, da hipernociceção induzida pela PGE₂ intraplantar (i.pl.).....	89
4.12 Liberação de cálcio (Ca⁺²) de estoques intracelulares à distância parece ser importante para a manutenção da hipernociceção induzida pela PGE₂ intraplantar (i.pl.).....	91
4.13 Verificação do efeito do NMDA sobre neurônios do gânglio da raiz dorsal <i>in vitro</i>.....	93
4.14 Efeito da PGE₂ sobre o cálcio (Ca⁺²) intracelular em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	96
4.15 A PGE₂ induz entrada de Ca⁺² extracelular e liberação de Ca⁺² de estoques intracelulares em neurônios do GRD.....	98
4.16 Efeito do NMDA (250 µM) em neurônios do GRD em cultura com tampão Hank's sem magnésio (Mg⁺²).....	100
4.17 Efeito do NMDA (250 µM) em neurônios do GRD cultivados por três dias.....	102
4.18 O corpo celular de neurônios do GRD contém vesículas para liberação de glutamato (GLU).....	105
4.19 NMDA induz oscilações de Ca⁺² em células satélites.....	107

4.20 Magnésio (Mg⁺²) não bloqueia NMDARs presentes em células satélites isoladas cultivadas.....	108
4.21 As células satélites em cultura de neurônios do GRD apresentam oscilações de Ca⁺²	109
4.22 Efeito do pré-tratamento com inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKCε) e dependente de AMPc (PKA) administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).....	112
4.23 Efeito do pré-tratamento com inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKCε) e dependente de AMPc (PKA) administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.....	114
4.24 Desenvolvimento do efeito dos inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKCε) - PKCε inhibitor - e dependente de AMPc (PKA) - H89 -, e do inibidor da enzima adenilato ciclase – SQ22536 - administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).....	116
4.25 Desenvolvimento do efeito dos inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKCε) – PKCε inhibitor - e dependente de AMPc (PKA) – H89 -, e do inibidor da enzima adenilato ciclase – SQ22536 - administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.....	119
4.26 A hipernocicepção induzida pela proteína quinase C (PKC), pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) ou pelo análogo de AMPc dbAMPc é mantida pela ativação de receptores NMDA no GRD.....	121
5 DISCUSSÃO.....	123
6 CONCLUSÕES.....	142
REFERÊNCIAS.....	143

1 INTRODUÇÃO

A *DOR* pode ser definida, em poucas palavras, como “a percepção de uma sensação nociceptiva”, uma vez que envolve uma série de aspectos tanto cognitivos quanto fisiológicos. Embora essa definição seja uma simplificação da inicialmente proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato”, deve-se considerar, em uma análise restrita, que esse fenômeno envolve a **ativação das vias nociceptivas**, ou seja, as vias fisiológicas responsáveis pela detecção de estímulos capazes de prejudicar o organismo, ou, caso persistam, prejudicá-lo. Entretanto, seu aspecto (intensidade e duração, por exemplo) final é dependente de uma série de fatores que podem alterar a maneira como esses estímulos nocivos são percebidos e interpretados: o sistema nervoso central é o responsável pela integração de aspectos emocionais, culturais e cognitivos, que, em última instância, determinarão a resposta dolorosa final. Neste sentido, a adoção da definição inicialmente citada se justifica.

1.2 AS VIAS DE DETECÇÃO E CONDUÇÃO DA INFORMAÇÃO DOLOROSA

Os estímulos ambientais internos ou externos ao organismo são detectados por estruturas receptoras localizadas por todo o corpo conhecidas como *receptores sensoriais*. Estes receptores traduzem a informação produzida pelos diferentes tipos de estímulo - de natureza mecânica, química ou térmica -, a qual será transmitida até o sistema nervoso central (SNC) por meio das fibras nervosas aferentes (ou primárias). Estas fibras aferentes estabelecem contato com os neurônios de segunda ordem (ou secundários) que, por sua vez, conduzem a informação até os centros superiores para seu processamento (BONICA, 1990).

As fibras primárias, presentes nos tecidos periféricos e normalmente associadas aos receptores sensoriais, podem estar envolvidas por uma estrutura lipídica produzida por células chamadas *células de Schwann* denominada *bainha de mielina*, que possui a propriedade de aumentar a velocidade de condução da informação ao longo da fibra nervosa. As fibras que têm como função primária a condução de estímulos a grandes velocidades, de modo que sejam interpretados imediatamente, possuem grande quantidade desse envoltório miélinico. Fibras associadas a mecanorreceptores - especializadas na condução de estímulos de origem mecânica -, são um exemplo. Essas fibras, chamadas *A-beta* ($A\beta$), são capazes de responder a

estímulos táteis, possuem largo diâmetro e conduzem o estímulo a rápidas velocidades (30 a 100 m/s).

Os estímulos indutores da sensação dolorosa (nocicepção) podem ser tanto de natureza mecânica ou térmica quanto química ou elétrica, externos ou internos ao organismo. Considerando que a sensação dolorosa é um “alarme” que indica a existência de um processo lesivo ou potencialmente lesivo ao organismo, há necessidade da presença de estruturas nervosas especializadas na sua detecção, de modo a evitar danos maiores causados por estímulos deletérios.

Fibras de diâmetros menores e com terminações livres – ou seja, não associadas a receptores sensoriais especializados - detectam esses estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Estas possuem alto limiar de ativação e são diretamente relacionadas às vias nociceptivas (AGUGGIA, 2003). Por isso, genericamente são denominadas *nociceptores*, podendo ser encontradas em dois tipos: fibras *A-delta* (A δ), de médio diâmetro, finamente mielinizadas, com velocidade de condução média, entre 12 e 30 m/s (correspondentes a 20% das fibras de dor e responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante que sentimos após estimulação nociva), e fibras *C* não-mielinizadas, de pequeno diâmetro, com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) (correspondentes a 80% das fibras condutoras da informação dolorosa e responsáveis pela dor com característica lenta e difusa) (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999). Levando em conta o critério funcional, as fibras A δ respondem à estimulação mecânica, porém podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo *C* respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, sendo classificadas, por isso, como *nociceptores polimodais*.

Tais células nervosas periféricas possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminais, no caso dos neurônios sensoriais que inervam a região orofacial. Destes gânglios saem prolongamentos em direção à medula espinal (ou tronco encefálico, no caso dos neurônios orofaciais), onde estão localizados os neurônios secundários. A ativação dos neurônios sensoriais primários leva à liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato (GLU), e peptídeos, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), nos terminais pré-sinápticos (MILLAN, 1999). Estas substâncias, chamadas *neurotransmissores* e *neuromoduladores*, atuarão em receptores pós-sinápticos, estimulando os neurônios secundários. A partir daí, os impulsos ascenderão para o encéfalo, onde a dor será analisada e interpretada.

Os neurotransmissores podem ser aminoácidos excitatórios (AAE) com função neurotransmissora (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; TRACEY et al., 1991), como o glutamato

(GLU) e o aspartato (ASP), ou neuropeptídeos com papel neuromodulador (JU et al., 1987; SMITH et al., 1993), como a substância P (SP), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a somatostatina (SOM), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros, liberados nos terminais das fibras neuronais (BONICA, 1990). Uma vez liberadas, tais substâncias interagem com receptores nos neurônios de segunda ordem, ativando mecanismos bioquímicos intracelulares que terão efeito sobre a transmissão do impulso.

A partir de sua transmissão para o neurônio secundário, a informação nociceptiva ascenderá para as áreas supraespinais através de tratos neuronais específicos (espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinocervicotalâmico, espinoparabraquial, espinoparabraquio(trigêmio)hipotalâmico, via pós-sináptica da coluna dorsal (MILLAN, 1999; BESSON; CHAOUCH, 1987; PRADO, 1999), até a convergência em populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo (núcleo ventrobasal) (MILNE et al., 1981). Nesse nível, a informação será conduzida para as áreas sensoriais do córtex cerebral e suas várias características serão integradas, ou seja, aspectos como qualidade, intensidade, localização, duração e os componentes afetivo e emocional serão interpretados, diferenciando a sensação dolorosa da percepção (NOBACK et al., 1996).

1.1.1 Estimulação das vias nociceptivas

A terminologia *nociva* se refere a algo que causa dano, provoca prejuízos. Um estímulo nocivo causa dano a um determinado tecido, ou seja, é injuriante, prejudicial. Por outro lado, o termo *nociceptivo* se refere à algo que ativa as vias sensoriais especializadas em conduzir a informação produzida pelos estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Desta forma, um estímulo nociceptivo pode ser caracterizado como um estímulo capaz de ativar essas vias. Porém, nem sempre as vias nociceptivas são ativadas somente por estímulos nocivos. Em certas situações as vias de condução nociceptivas podem ser ativadas por estímulos não-nocivos. Isso não significa que o estímulo é capaz de causar prejuízo tecidual, mas sua intensidade é suficiente para levar à ativação das vias nociceptivas. Em resumo, pode-se dizer que o *estímulo nocivo* é relacionado à *qualidade* da estimulação em si, que pode danificar o tecido, enquanto o *estímulo nociceptivo* é relacionado às fibras nervosas nociceptivas, que podem ser ativadas por qualquer tipo de estímulo, contanto que em *quantidade suficiente* para ativá-las. A nocicepção, desta forma, não é relacionada à qualidade do estímulo em si, mas, sim, aos aspectos *quantitativos* da estimulação.

Em uma analogia simplista, pode-se dizer que a dor é uma espécie de “alarme” fisiológico, que alerta o organismo que algo está errado ou que existe uma ameaça à sua integridade. Assim, a dor imediata é justamente a ativação das vias sensoriais responsáveis por detectar a presença de estímulos que são prejudiciais (nocivos) ou potencialmente prejudiciais. É um fenômeno iônico, ou seja, existe a indução de uma resposta elétrica nestas fibras sensoriais responsáveis pela detecção de estímulos de alta intensidade, com entrada do íon sódio (Na^+) por canais específicos, que conduzirá a informação ao longo das vias nociceptivas, desencadeando, finalmente, a reação (ou a percepção). Contudo, é necessário dizer que alterações metabólicas nestas células neuronais também podem induzir mudanças na maneira como essas fibras detectam e conduzem a informação dolorosa. Dependendo do tipo de alteração, tipos diferentes de fenômenos podem ser observados.

1.1.2 Hiperalgisia / hipernocicepção

Em determinadas condições, a dor é acompanhada por fenômenos paralelos, como a chamada *hiperalgisia*, por exemplo. Este fenômeno, também conhecido como *hipernocicepção*, é resultado da sensibilização das fibras neuronais sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos – aqueles capazes de ativar o sistema nociceptivo. Segundo inúmeros estudos, essa sensibilização, caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal (RIEDEL; NEECK, 2001), ocorre por ação de mediadores produzidos pelo processo inflamatório (HUANG et al., 2006; VERRI et al., 2006). Estes mediadores atuarão em seus respectivos receptores, induzindo, como resultado final, alterações metabólicas que facilitarão a produção de potenciais de ação pelos neurônios nociceptores. Em outras palavras, essas fibras poderão ser ativadas mais facilmente frente à estimulação, e, devido a essa nova condição, estímulos que antes não eram capazes de ativá-las, passam a sê-lo, ou a fazê-lo mais intensamente. Assim, o processo inflamatório pode ser, de modo geral, diretamente associado à hipernocicepção ou hiperalgisia (“dor aumentada em resposta a um estímulo que já era doloroso”). Mais ainda, diversos trabalhos têm mostrado que a atuação desses mediadores inflamatórios leva ao desenvolvimento de alterações fenotípicas nos neurônios sensoriais que contribuem para esse estado sensibilizado. Como exemplo podemos citar o aumento na expressão de alguns tipos de canais de sódio (Na^+) preferencialmente em fibras nociceptoras, considerado um dos principais focos da pesquisa dos mecanismos fisiopatológicos da dor (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998; PORRECA et al., 1999; WOOD, 2004).

Outro fenômeno observado em alguns quadros de origem inflamatória é a chamada *alodinia*. De modo semelhante à hiperalgesia, a alodinia refere-se à sensação dolorosa induzida por um estímulo que, em condições normais, seria insuficiente para provocar esta sensação. A idéia que prevalece atualmente é que a hiperalgesia / alodinia resulta da sensibilização dos neurônios sensoriais primários associada à ativação de nociceptores polimodais de alto limiar e *nociceptores dormentes*, os quais somente respondem a estímulos quando sensibilizados (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990a; MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990b). Esta classe de nociceptores, descrita em 1988 por Schaible e Schimidt (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988), não responde a estímulos mecânicos ou térmicos imediatos, mas é recrutada durante o processo inflamatório. Embora tenham sido inicialmente observados em estudos eletrofisiológicos com registros feitos em nervos de articulações de joelhos, também foram verificados em tecidos cutâneo e visceral (WILLIS; WESTLUND, 1997), sendo diretamente relacionados aos quadros hiperalgésicos.

Nesse sentido, apesar da importância da inflamação para esse fenômeno, é relevante lembrar que, em determinadas condições, a hiperalgesia / alodinia não pode ser considerada apenas consequência da ação de mediadores inflamatórios. Durante as dores de origem neuropática, por exemplo, algumas fibras normalmente capazes de responder apenas a estímulos táteis passam a responder como nociceptores, de modo que, então, estímulos inócuos passam a ser percebidos como nocivos (BONICA, 1990; KOERBER et al., 1994; KOHAMA et al., 2000). Porém, embora exista a sugestão de que essas dores são intimamente relacionadas a quadros inflamatórios (MA; EISENACH, 2002; ZHAO et al., 2000), essa discussão deverá ser retomada em outra oportunidade, já que escapa do enfoque deste estudo.

1.2 MEDIADORES ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO DE ORIGEM INFLAMATÓRIA DOS NEURÔNIOS PERIFÉRICOS

1.2.1 Mecanismos extracelulares de hipernocicepção – envolvimento de mediadores liberados durante o processo inflamatório

Um quadro indubitavelmente associado ao processo inflamatório é a sensibilização dos nociceptores (ou hipernocicepção). Segundo diversos estudos, durante o processo inflamatório ocorre liberação de uma série de mediadores, como cininas e citocinas, por exemplo, que caracterizarão o fenômeno “inflamação” devido aos eventos sequenciais estimulados por sua ação (CHENG; JI, 2008; SCHAFERS; SORKIN, 2008). Porém, apesar

da grande diversidade de mediadores inflamatórios descrita na literatura (BROUGHTON et al., 2006), atualmente é considerado que, em última instância, ocorre liberação de eicosanóides (ou prostanóides) e aminas simpatomiméticas, que sensibilizarão diretamente os neurônios nociceptores. Por isso, essas substâncias são denominadas *mediadores hipernociceptivos*. Entre esses mediadores finais mais estudados estão as *prostaglandinas* (PGs), formadas pela ação das enzimas *ciclooxigenases* (COX) (FERREIRA; VANE, 1967). Sua participação na sensibilização dos nociceptores tem sido objeto de pesquisa tanto em humanos quanto em animais, por meio de técnicas eletrofisiológicas e comportamentais, desde o século passado (CHAHL; IGGO, 1977; FERREIRA, 1983; HANDWERKER, 1976; PERL, 1976). Além disso, diversas evidências demonstraram que principalmente as PGs do tipo E₂ são responsáveis por causar hipernocicepção inflamatória.

O mecanismo de sensibilização neuronal pelas PGs foi associado tanto à indução de alterações na liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos, quanto à fosforilação de canais iônicos considerados importantes para a atividade elétrica neuronal. Nesse sentido, foi observado que, quando administradas por via intratecal, as PGs (no caso a PGE₂) sensibilizam os neurônios periféricos. Mais ainda, essa sensibilização é inibida por antagonistas de receptores para glutamato (GLU) tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), o que indica a participação desse aminoácido na hipernocicepção inflamatória induzida por esse mediador (FERREIRA; LORENZETTI, 1996).

Em adição à participação das PGs na hipernocicepção, estudos experimentais e evidências clínicas demonstraram também a existência de um componente simpático na sensibilização dos nociceptores (HANNINGTON-KIFF, 1989; LOH et al., 1980; LOH; NATHAN, 1978; NAKAMURA; FERREIRA, 1987). Por exemplo, foi observado que agonistas adrenérgicos, como noradrenalina, adrenalina, isoprenalina e dopamina, ou aminas simpatomiméticas indiretas, como a tiramina, induzem hipernocicepção mecânica de forma semelhante às PGs, inclusive com estimulação de segundos-mensageiros e vias intracelulares comuns.

Entretanto, apesar dos principais mediadores finais da hipernocicepção inflamatória periférica serem provavelmente as PGs e as aminas simpatomiméticas, sua liberação, como mencionado anteriormente, é precedida pela liberação de outros mediadores, como citocinas, por exemplo. A lesão tecidual induz uma resposta de alarme precoce na qual os macrófagos desempenham papel crucial, sinalizando a presença de estímulos deletérios para o organismo, possivelmente via liberação desses mediadores. Neste contexto, as citocinas parecem ser o “elo” entre a injúria celular, ou o reconhecimento de antígenos, e a liberação dos mediadores

responsáveis pelo desenvolvimento de sinais e sintomas locais ou sistêmicos da inflamação (POOLE et al., 1999a; POOLE et al., 1999b).

1.2.2 Mecanismos intracelulares da hipernocicepção

Embora os eventos moleculares associados à hipernocicepção mecânica induzida pelos mediadores inflamatórios ainda não estejam totalmente compreendidos, evidências experimentais mostraram que a administração de PGE₂, dopamina ou carba-prostaciclina (um análogo estável da prostaciclina [PGI₂]), induz aumento da concentração intracelular de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e do íon cálcio (Ca⁺²) (HINGTGEN et al., 1995), demonstrados estarem associados com a sensibilização dos nociceptores (FERREIRA; NAKAMURA, 1979).

Além disso, alguns estudos demonstraram que os receptores para prostanóides estão acoplados à enzima adenilato ciclase (HINGTGEN et al., 1995; AANTAA et al., 1995; COLEMAN et al., 1994; NAMBA et al., 1994; SMITH et al., 1998), a qual, uma vez ativada, converte adenosina-difosfato (ADP) em AMPc. Isso sugeriu a participação do AMPc na sensibilização do neurônio sensorial primário, claramente evidenciada por meio de modelos experimentais de hipernocicepção mecânica (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; TAIWO; LEVINE, 1991). Outros estudos também demonstraram haver aumento da hipernocicepção induzida por PGE₂ após administração de forskolin, um ativador da adenilato ciclase, ou de inibidores da fosfodiesterase (PDE), enzima responsável pela degradação de AMPc (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; TAIWO; LEVINE, 1991; CUNHA et al., 1999; OUSEPH et al., 1995).

Os níveis citosólicos de AMPc são controlados pelas suas taxas de produção (ação da adenilato ciclase) e de degradação (ação da 3',5'-fosfodiesterase nucleotídeo cíclico) (TEIXEIRA et al., 1997). Cunha et al. (CUNHA et al., 1999) demonstraram que a hipernocicepção induzida por PGE₂ ou dopamina é significativamente aumentada pelo inibidor específico da PDE do tipo 4 rolipram. Por outro lado, o zaprinast e o Org-9935, inibidores das PDEs do tipo 5 e 3 respectivamente, não afetam a hipersensibilidade mecânica induzida por PGE₂. Esses resultados indicam, em conjunto, que, nos neurônios sensoriais nociceptores, o AMPc é metabolizado principalmente pela isoforma PDE₄. Contudo, o que acontece após o aumento dos níveis citosólicos de AMPc no que concerne à hipernocicepção ainda está pouco a pouco sendo esclarecido. Inclusive, a participação de proteínas quinases neste quadro tem sido bastante estudada. Por exemplo, foi observado que o H89, um inibidor

da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (LYNN; O'SHEA, 1998), inibe a hipernocicepção induzida por PGE₂ de maneira dose-dependente (CUNHA et al., 1999). Assim, sugeriu-se que a PGE₂ produz hipernocicepção mecânica devido ao aumento de AMPc (FERREIRA; NAKAMURA, 1979), o que ativaria a PKA no neurônio sensorial primário (CUNHA et al., 1999). Esta ativação possivelmente levaria à fosforilação de canais iônicos e/ou modulação de estruturas citossólicas que controlam os níveis intracelulares de cálcio (Ca⁺²) (OUSEPH et al., 1995; LYNN; O'SHEA, 1998; SLUKA et al., 1997; TAIWO et al., 1992; WANG et al., 1996). Ainda, outros trabalhos também verificaram o envolvimento da proteína quinase C (PKC) neste processo.

Pertencentes a uma superfamília de proteínas quinases que compreende pelo menos 10 membros, as proteínas quinases C (PKCs) são divididas em PKCs convencionais - PKC α , PKC β _I, PKC β _{II} e PKC γ , ativadas por fosfatidilserina, Ca⁺² e diacilglicerol (DAG) -, PKCs que não requerem Ca⁺² para serem ativadas - como a PKC δ , PKC ϵ , PKC η e PKC ϕ -, e PKCs atípicas - PKC- ζ e PKC- λ -, que são ativadas apenas por fosfatidilserina (BOYCE et al., 1999; ROBINSON-WHITE; STRATAKIS, 2002).

Estudos realizados com o intuito de investigar a participação da PKC na dor inflamatória (TAIWO; LEVINE, 1991; MARTIN et al., 1999) mostraram que a administração intraplantar de PMA (4beta-phorbol-12-myristate-13-acetate), um ativador de PKC, induz hipernocicepção (TANIGUCHI et al., 1997). Além disso, também foi observado que a ligação da PGE₂ ao receptor do tipo EP1 leva à ativação da via de sinalização da fosfolipase C (PLC), com conseqüente hidrólise de fosfatidilinositol-bifosfato (PIP₂) e subseqüente liberação de IP₃ (inositol (1,4,5)-trifosfato) e DAG (REGAN, 2003; WATABE et al., 1993), via um processo envolvendo a PKC. Em seqüência isso levará, finalmente, à liberação de Ca⁺² de estoques intracelulares, o que provavelmente está associado à sensibilização neuronal. Assim, esses dados reforçam a determinação da PKC como um importante elemento da hipernocicepção inflamatória induzida pela administração de PGE₂.

Por outro lado, foi observado que a noradrenalina, após ativação de receptores do tipo β_2 , induz hipernocicepção dependente das proteínas quinases A e C (KHASAR et al., 1999), e que a administração do inibidor específico de PKC bisindolilmaleimida I inibe a alodinia mecânica induzida por bradicinina (SOUZA et al., 2002). Esses resultados mostram novamente a participação da PKC na hipernocicepção de origem inflamatória, já que esses mediadores são importantes nesse processo.

Finalmente, a ação de enzimas levando à fosforilação de canais iônicos e alterações

na excitabilidade neuronal é o mecanismo de indução de sensibilização dos nociceptores mais aceito atualmente. Dessa forma, a alteração do potencial de repouso da membrana neuronal por agentes inflamatórios é considerada a consequência final da indução do fenômeno hipernociceptivo.

1.3 CANAIS IÔNICOS – MECANISMOS DE ALTERAÇÃO DO LIMAR DE DISPARO DOS NOCICEPTORES

A excitabilidade dos neurônios é controlada por condutâncias iônicas através da membrana plasmática e os canais iônicos são presumivelmente os alvos finais de processos intracelulares regulados pelos segundos-mensageiros ativados pelos mediadores hipernociceptivos. Em concordância com esta idéia, pesquisas recentes revelaram a maneira como esses segundos-mensageiros modulam a atividade dos canais iônicos responsáveis pela excitabilidade das células nervosas.

Os canais de potássio (K^+) e de sódio (Na^+) presentes nas membranas celulares são os principais responsáveis pela atividade elétrica que conduz a informação pelas vias neuronais. As dinâmicas de abertura e fechamento, alterando as condutâncias iônicas, provocam mudanças no potencial elétrico da membrana celular que, se forem suficientes para atingir o limiar de disparo, provocarão o potencial de ação. Este percorrerá a célula conduzindo a informação até o local onde o neurônio faz conexão com outro neurônio subsequente. Eventos como liberação de neurotransmissores e neuromoduladores serão ativados pelo potencial de ação, possibilitando a sinalização para os neurônios pós-sinápticos.

Cada tipo de canal iônico possui características estruturais que dão seletividade para determinados íons. Além disso, moléculas receptoras presentes em alguns canais possibilitam que sejam ativados ou inativados por ligantes. Outros canais, como os canais responsáveis pela geração de potenciais de ação e manutenção do potencial de repouso da célula possuem sensores de voltagem e são regulados pelo potencial elétrico da membrana plasmática neuronal (HILLE, 1977a; 1977b).

1.3.1 Canais de sódio voltagem-dependentes

A ativação de canais de Na^+ por estímulos, como deformação na membrana neuronal ou mudanças no pH local, por exemplo, é responsável pela geração e disparo dos potenciais de ação. Para que o potencial de ação aconteça, o estímulo inicial deve causar uma

despolarização suficiente, que atinja o limiar de disparo (ou seja, o potencial elétrico naquele local da membrana tornou-se eletropositivo o bastante para estimular a abertura de outros canais de Na^+ e gerar o potencial de ação), para que ocorra a abertura dos canais de Na^+ voltagem-dependentes. Com base neste conceito, atualmente têm-se relacionado a hipernocicepção inflamatória aos canais de Na^+ resistentes à tetrodotoxina (TTX-r) (GOLD et al., 1996a). Foi verificado que a PGE_2 aumenta a condutividade destes canais (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998), provavelmente via fosforilação induzida por PKA (FITZGERALD et al., 1999) e/ou PKC. Isso levaria ao aumento nas correntes de Na^+ através destes, além de aumento na probabilidade de ocorrência de despolarizações pela maior quantidade de canais prontos para serem ativados. São descritos dois subtipos de canais de Na^+ TTX-r expressos seletivamente em neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro: os canais Na_v 1.8 ou SNS - dependentes de voltagem e com cinética de ativação lenta, aparentemente importantes na gênese de potenciais de ação (RENGANATHAN et al., 2001) – e os canais Na_v 1.9 ou NaN – ativados em potenciais de -70 a -60 mV, portanto facilmente acionados, levando à alteração na condição de repouso da membrana neuronal (CUMMINS et al., 1999; DIB-HAJJ et al., 1999).

1.3.2 Canais de potássio

Sabe-se que os canais de K^+ estão envolvidos tanto no potencial de ação quanto na manutenção do potencial de repouso dos neurônios. Durante o repouso, os canais de K^+ abertos mantêm o potencial de membrana ao redor do equilíbrio eletroquímico do K^+ , por volta de -90 mV. Porém, devido a interações com outros íons e cargas intra e extracelulares, o potencial de repouso da membrana neuronal se fixa por volta de -70 mV. Portanto, pode-se dizer que a abertura e o fechamento de canais de K^+ presentes na membrana celular são importantes processos reguladores da excitabilidade da célula e que o potencial de equilíbrio neuronal, no qual não há atividade elétrica celular (despolarização), é regulado pelos canais de K^+ (HODGKIN; HUXLEY, 1952). A importância dos canais de K^+ no mecanismo de manutenção do potencial de repouso neuronal é refletida pela grande heterogeneidade de subtipos de canais para esse íon. Uma variedade de canais de K^+ voltagem-dependentes é encontrada nos neurônios sensoriais (CARDENAS et al., 1995; GOLD et al., 1996b; NOWYCKT, 1992; SAFRANOV et al., 1996). Esses canais abrem em resposta à despolarização e são responsáveis pela rápida repolarização da membrana, finalizando o

potencial de ação. Assim, segundo Rudy (RUDY, 1988), todas as correntes de K^+ em neurônios são basicamente inibitórias.

No SNC, a abertura dos canais de K^+ participa da antinocicepção, uma vez que drogas bloqueadoras de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}), as chamadas sulfoniluréias, bloqueiam este efeito (OCAÑA et al., 1990; OCAÑA et al., 1995; ROANE; BOYD, 1993; WILD et al., 1991). Por meio do uso de agentes que abrem canais K^+_{ATP} , Vergoni (VERGONI et al., 1992) demonstrou o efeito antinociceptivo de agonistas opióides, e, na mesma época, foram apresentadas evidências de que a analgesia poderia ser induzida por abertura de canais de K^+ ativados por cálcio ($K^+_{Ca^{+2}}$) (STRETTON et al., 1992). Desta forma, foi sugerido que uma grande diversidade de canais de K^+ descritos em neurônios, com diferentes características eletrofisiológicas e farmacológicas, estariam envolvidos na antinocicepção (HALLIWELL, 1990). Mais ainda, o fato de alguns trabalhos terem mostrado que agentes mediadores hipernociceptivos podem influenciar a sensibilidade neuronal por causar o fechamento de canais de K^+ voltagem-dependentes em neurônios periféricos mostra que esses canais também são importantes durante a hipernocicepção. A diminuição nas correntes de K^+ induzida pela PGE_2 (JIANG et al., 2003; NICOL et al., 1997) devido ao fechamento de canais possivelmente voltagem-dependentes (EVANS et al., 1999), em conjunto com a fosforilação de canais de Na^+ TTX-r, seria suficiente para diminuir o limiar de ativação neuronal, facilitando a produção de potenciais de ação.

1.3.3 Outros canais iônicos

Além da alteração das dinâmicas iônicas através da membrana neuronal pela fosforilação de canais estar envolvida no mecanismo de hipernocicepção periférica, tem sido observada também a participação do íon Ca^{+2} neste fenômeno (HINGTGEN et al., 1995; FERREIRA; NAKAMURA, 1979). Considerando que a PGE_2 , via ativação de segundos-mensageiros intracelulares, leva ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} (proveniente dos estoques e vesículas presentes no retículo endoplasmático), a possibilidade de participação deste íon na sensibilização neuronal não deve ser descartada.

1.3.3.1 Cálcio e liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} (CICR)

A importância do Ca^{+2} nos processos biológicos foi adequadamente traduzida por BERTIL HILLE em seu livro “*Ion Channels of Excitable Membranes*” (Canais Iônicos de

Membranas Excitáveis) (HILLE, 2001), que diz: “as células excitáveis traduzem seus impulsos elétricos em ação através de fluxos de Ca^{+2} modulados por canais voltagem-sensíveis permeáveis a esse íon” (pág. 102), explicitando seu papel de mensageiro intracelular capaz de ativar muitas funções celulares. Seja por seu envolvimento no processo de exocitose de vesículas contendo neurotransmissores (HUANG; NEHER, 1996; SEWARD et al., 1995), possibilitando a condução sináptica, ou por sua participação na plasticidade neuronal (NEVEU; ZUCKER, 1996) e expressão gênica (HARDINGHAM et al., 1997), o íon Ca^{+2} parece participar ativamente de vários processos essenciais para o funcionamento do sistema sensorial.

Atualmente é discutido o comportamento do neurônio aferente primário como uma unidade integrada, na qual eventos presentes em uma extremidade se comunicam e interferem em outros eventos ocorrentes na extremidade oposta. Ferreira e Lorenzetti (FERREIRA; LORENZETTI, 1996) mostraram que a injeção intratecal de PGE_2 induz sensibilização periférica que é inibida pela injeção intraplantar de morfina. Mais recentemente foi demonstrado que a administração intratecal de NMDA sensibiliza o neurônio primário via ativação de receptores pré-sinápticos, sendo esta sensibilização inibida por injeção periférica de morfina ou dipirona (PARADA et al., 2003). Dessa forma, apesar da distância e das diferenças funcionais entre os terminais periférico e central, foi proposta a integração neuronal por mecanismos que possibilitam a detecção e interação de eventos ocorrentes em terminais opostos no neurônio aferente primário. Lembrando que o transporte de moléculas por difusão ou ligação a proteínas do citoesqueleto é um processo que necessita de tempo para percorrer as distâncias entre os terminais nervosos, um sistema rápido de comunicação intraneuronal deve existir. A sugestão da participação do fenômeno das oscilações de Ca^{+2} encaixa-se perfeitamente nesta proposição. Conhecido por CICR (“ Ca^{+2} -induced Ca^{+2} -release” – liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2}), tal fenômeno tem sido associado à sensibilização neuronal como um processo que se difunde pela célula, integrando os diversos segmentos de sua estrutura (terminal periférico, gânglio da raiz dorsal – GRD - e terminal central).

Neste processo, uma modesta elevação na concentração de Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) é amplificada por uma liberação secundária de Ca^{+2} de estoques vesiculares que se propaga pela célula (USACHEV; THAYER, 1999).

As ondas de Ca^{+2} são formadas por ativação de canais do retículo endoplasmático, sendo o receptor para rianodina (RyR) o canal mais importante, embora o processo também ocorra por ativação de receptores para IP_3 (inositol (1,4,5)-trifosfato) (USACHEV; THAYER, 1999). Além destes receptores, sugeriu-se que canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes também

participam do fenômeno oscilatório (USACHEV; THAYER, 1997), de maneira que este processo seria iniciado pela entrada de Ca^{+2} do meio extracelular. O aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ativaria RyR, resultando na liberação de mais Ca^{+2} no meio intracelular, provocando a abertura de RyR adjacentes. Considerando que a concentração intracelular de Ca^{+2} livre nas células em repouso é extremamente baixa (30-200 nM) e que os mecanismos que controlam esta concentração são extremamente sensíveis a variações, o fato de haver maior disponibilidade do íon no citoplasma acionaria as bombas de Ca^{+2} , tanto da membrana plasmática quanto das vesículas de estoque, normalizando a concentração citoplasmática. Porém, os mecanismos de liberação já estariam ativados, elevando novamente a quantidade de Ca^{+2} citoplasmática, formando um ciclo que poderia ser suficiente para provocar a sensibilização da célula como um todo. Portanto, a CICR é um processo tudo-ou-nada que gera uma oscilação da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ que se propaga pela célula neuronal inteira.

Apesar do papel desempenhado pela CICR em neurônios sensoriais primários não estar totalmente claro, vários trabalhos realizados em culturas de gânglios da raiz dorsal (GRDs) indicam o envolvimento da mobilização de Ca^{+2} na sensibilização. A estimulação elétrica de neurônios sensoriais cultivados a partir de GRDs induz o aparecimento de CICR quando estes neurônios estão sensibilizados com cafeína ou rianodina (AYAR; SCOTT, 1999; CURRIE; SCOTT, 1992; CURRIE et al., 1992; CURRIE et al., 1995). Além disso, alguns estudos realizados *in vivo* demonstraram que vários dos mediadores responsáveis pela sensibilização do neurônio primário, como PGE_2 , bradicinina e serotonina, induzem influxo de Ca^{+2} (LINHART et al., 2003), o que pode levar à sensibilização.

Portanto, o efeito do Ca^{+2} sobre a excitabilidade neuronal pode se dar por diferentes maneiras: a) diretamente promovendo despolarização; b) indiretamente por ativar cascatas enzimáticas dependentes de Ca^{+2} ou c) por atuar em canais dependentes de Ca^{+2} (como o canal rianodina, por exemplo). Assim, a ocorrência de CICR nos neurônios nociceptores poderia promover a sensibilização dos mesmos e agentes que bloqueiam as ondas de Ca^{+2} poderiam apresentar efeitos analgésicos.

É conveniente, porém, lembrarmos que existe a necessidade da ativação deste fenômeno oscilatório, ou seja, durante a indução da sensibilização algum mecanismo deve ser acionado de maneira que haja uma entrada inicial de Ca^{+2} na célula ou este seja liberado de estoques intracelulares, provocando aumento da $[\text{Ca}^{+2}]_i$.

1.4 A TRANSMISSÃO SINÁPTICA

A informação sensorial provém da transdução de sinais que ativam neurônios periféricos sensoriais, gerando a atividade elétrica, que percorre o trajeto das vias aferentes até atingir os centros superiores de interpretação da resposta. Essa transmissão da informação aferente de um neurônio para o próximo em seqüência se dá pela liberação dos neurotransmissores, como mencionado anteriormente. A informação nociceptiva também depende da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica para que seja transmitida. Inclusive, certas drogas que alteram a liberação desses neurotransmissores têm sido utilizadas terapêuticamente para o controle da dor e outras doenças, como, por exemplo, algumas patologias neurodegenerativas. Além disso, durante a presença de um processo inflamatório e conseqüente hipernocicepção, a ação destes neurotransmissores liberados parece ser importante para a sensibilidade neuronal. Neste contexto, o aminoácido excitatório (AAE) glutamato (GLU), juntamente com seus diversos tipos de receptores, tem sido observado ter fundamental importância para o fenômeno de hipernocicepção / hiperalgesia.

1.4.1 O glutamato como aminoácido excitatório

A transmissão sináptica glutamatérgica no SNC foi lentamente sendo demonstrada e descrita durante cerca de 20 anos a partir de 1950. A suspeita de que o GLU, assim como outros AAEs, mediava ações estimulatórias via ativação de múltiplos receptores precedeu a identificação dessas estruturas como receptores sinápticos. As altas concentrações de GLU no encéfalo, primeiramente observadas na década de 30 do século passado, levaram à especulação de um papel neurofisiológico importante para esse aminoácido. Isso estimulou a realização de vários experimentos com o objetivo de avaliar se o GLU e a glutamina presentes na dieta poderiam ser benéficos no tratamento de desordens de aprendizagem e epilepsia (1940). Hayashi (HAYASHI, 1954) foi quem fez uma das primeiras observações do papel especial do GLU em processos fisiológicos, injetando-o diretamente no encéfalo e na carótida, e produzindo convulsões, o que o levou a sugerir que esse aminoácido era um transmissor no SNC de mamíferos. Em 1958, a ação excitatória do L-GLU em determinadas células *in vivo* foi observada (CURTIS et al., 1960; CURTIS; WATKINS, 1960), embora diversos pesquisadores estivessem convencidos de que o GLU afetava diferentes tipos de células por ação não-específica, ou seja, não por atuação em receptores. Entretanto, o papel neurotransmissor do GLU ainda era considerado improvável, ainda mais por ser um metabólito intermediário no encéfalo.

Apesar de esta visão ter permanecido durante bastante tempo, o papel transmissor do GLU não foi totalmente descartado. Mesmo porque não havia ferramentas antagonistas para a maioria das ações excitatórias sinápticas observadas eletrofisiologicamente em neurônios centrais após estimulação de determinadas vias, nem antagonistas específicos para os transmissores naturais conhecidos ou substâncias semelhantes ao GLU, cruciais para a pesquisa. Ainda assim, a posterior investigação de análogos de GLU, mostrando que alguns destes aparentemente possuíam estereoseletividade, já que algumas formas agonistas pareciam ter diferentes potências (como o NMDA, que parecia ser mais potente que o L-GLU), sugeriu a existência de receptores específicos (CURTIS; WATKINS, 1960). Outros análogos também apresentaram maior potência que o GLU *per se* (SHINOZAKI; SHIBUYA, 1974), como o ácido kaínico (extraído da alga marinha *Digenia simplex*) e o ácido quisquálico (extraído de plantas do gênero *Quisqualis*). Mais tarde também foi observada a ação potente do aminoácido sintético AMPA (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), o que foi bastante importante para os estudos sobre os tipos de receptores para GLU (WATKINS et al., 1990).

Outro dado importante para a identificação da via glutamatérgica neurotransmissora foi a descrição da via de síntese do GLU nos terminais sinápticos, denominada “ciclo glutamato-glutamina” (DUGGAN, 1974; MCCULLOCH et al., 1974; MCLENNAN et al., 1968; WATKINS, 1972). Neste processo, o L-GLU extracelular, após liberação na fenda sináptica pelos terminais, é captado pelas células da glia, onde é convertido em glutamina. Esta é então reabsorvida pelos terminais sendo reconvertida em GLU pela ação da enzima glutaminase, altamente concentrada nas terminações sinápticas. Assim, a demonstração deste processo nos terminais sinápticos, mais a posterior identificação de múltiplos receptores específicos para AAEs a partir de diversos trabalhos (DUGGAN, 1974; MCCULLOCH et al., 1974; MCLENNAN et al., 1968), contribuiu deveras para o estabelecimento do GLU como transmissor sináptico. A ação seletiva de antagonistas auxiliou a identificação destes receptores, o que também sugeriu ações diversas dependendo do tipo de receptor ativado. Nesse sentido, os receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) foram estudados com certo destaque, pois diversos estudos mostravam sua ativação em processos relacionados à transmissão no SNC.

O desenvolvimento de antagonistas glutamatérgicos como DL- α -aminoadipato (D α AA) possibilitou a observação de tipos diferentes de receptores para o GLU. A estereoforma D parecia antagonizar especificamente as respostas induzidas pelo NMDA, sem afetar as induzidas pelo kainato ou quisqualato – três agonistas de receptores para GLU -, ou

antagonizar em diferentes graus as induzidas por outros agonistas de tais receptores. Esses dados foram publicados com considerável impacto (EVANS et al., 1979), sugerindo a classificação dos receptores para GLU como “NMDA-“ ou “não-NMDA-“ (WATKINS; EVANS, 1981). A re-classificação dos receptores “não-NMDA” em receptores kainato e quisqualato ocorreu um pouco mais adiante. A grande gama de antagonistas NMDA-específicos e específicos para outros tipos de receptores GLU foi de grande valia para a pesquisa de possíveis aplicações terapêuticas. Por exemplo, antagonistas NMDA que atuam competitivamente sobre o sítio de reconhecimento de GLU nos receptores NMDA (NMDARs), como o D-2-amino-phosphonopentanoato (D-AP-5), foram largamente usados para identificação de subtipos de NMDARs. Assim, a partir de 1980, o uso de diversos antagonistas específicos forneceu evidências convincentes da existência de diferentes classes de receptores GLU participantes da transmissão sináptica. Mais ainda, a identificação farmacológica de subtipos de receptores glutamatérgicos e sua divisão em duas famílias - receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G) e ionotrópicos (associados a canais iônicos, e recebendo o nome dos agonistas seletivos AMPA, kainato e NMDA) – acentuou o crescente interesse sobre a neurotransmissão excitatória por aminoácidos no SNC.

1.5 RECEPTORES NMDA

Diversos trabalhos sugeriram a existência de diferentes tipos de receptores para GLU no sistema nervoso. Experimentos realizados *in vitro* para diferenciar respostas induzidas por AAAs, nos quais havia sido adicionado magnésio (Mg^{+2}) ao meio que perfundia a medula espinal isolada de sapos (com intuito de abolir a liberação de neurotransmissores nas sinapses), mostraram reduzida atividade sináptica após estimulação de raízes nervosas ou adição de alguns AAAs, principalmente aspartato, à preparação. No caso do NMDA, as respostas foram praticamente abolidas pela adição do Mg^{+2} , enquanto que a administração de L-GLU no meio induziu respostas em grau intermediário (pequena redução). Já as respostas ao kainato e quisqualato não foram afetadas. Dessa maneira, os efeitos produzidos por análogos de GLU passaram a ser classificados também como sensíveis- e insensíveis ao Mg^{+2} . Ao lado desta propriedade associada à presença de Mg^{+2} , outras características dos receptores que mediavam as respostas sensíveis ao Mg^{+2} foram observadas.

1.5.1 Características gerais dos NMDARs

A forma ácida do NMDA foi sintetizada no início da década de 60 por Jeffrey C. Watkins (WATKINS, 1962), sendo observado que era um potente excitador de neurônios espinais por ativação de um subtipo particular de receptor de GLU, o qual levou seu nome. Surpreendentemente, o NMDA se mostrou um ligante altamente específico, sem ação em nenhum outro sistema receptor. As descobertas iniciais levando ao reconhecimento e início da caracterização das funções dos NMDARs aconteceram em 1977. Primeiro, foi observado que íons Mg^{+2} bloqueavam potentemente a ativação desse sistema receptor NMDA (dados iniciais não-publicados obtidos na Universidade de Bristol, Inglaterra, em colaboração com Richard Evans (WATKINS, 1994)). Segundo, a síntese dos primeiros antagonistas de NMDARs sintéticos, tais como aminoadipato, aconteceu. Estes compostos foram usados para fornecer as primeiras evidências diretas de que os NMDARs estavam envolvidos na transmissão sináptica no sistema nervoso (em sinapses entre interneurônios excitatórios e células Renshaw – interneurônios inibitórios encontrados na substância cinzenta da medula espinal).

Em pouco tempo, antagonistas sintéticos mais potentes, como o AP-5, por exemplo, foram desenvolvidos, e têm sido até hoje utilizados para identificar o papel crucial dos NMDARs em uma gama enorme de processos fisiológicos e patológicos. Como exemplos podemos citar a descoberta da indução da potenciação de longa duração (LTP ou *Long Term Potentiation*, um fenômeno importante para a neuroplasticidade e aprendizado), seu envolvimento na epilepsia e neurodegeneração (como resultado de morte celular isquêmica), além de seu papel na neurotoxicidade associada ao influxo de Ca^{+2} e ativação de enzimas dependentes desse íon, como a sintase do óxido nítrico neuronal (NOS).

A partir da década de 80 do século passado, o papel dos NMDARs presentes nos neurônios periféricos passou a ser bastante investigado devido à sua provável participação na transmissão da informação sensorial, inclusive na sensibilização neuronal (MELZACK et al., 2001). Mais ainda, NMDARs expressos nos terminais centrais e periféricos dos neurônios aferentes primários foram relacionados à detecção e transmissão da informação nociceptiva. Isso foi reforçado por trabalhos que mostraram a inibição da hipernocicepção mecânica induzida por carragenina ou PGE_2 por antagonistas de NMDARs como o AP-5 (competitivo) e o MK801 (não-competitivo) (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; 1994).

A transferência da informação sensorial da periferia para o sistema nervoso central foi demonstrada ser dependente da liberação de GLU dos terminais centrais das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinal. Mais recentemente essa modulação da liberação de GLU pelos neurônios primários foi demonstrada ocorrer por ativação de receptores do tipo AMPA e kainato pelo próprio GLU após atividade elétrica

(despolarização). Estudos imunocitoquímicos demonstraram que existe expressão de NMDARs nos corpos celulares de neurônios sensoriais de pequeno e grande diâmetros (LIU et al., 1994; SATO et al., 1993), além de nos terminais pré-sinápticos dos neurônios aferentes (LIU et al., 1994; LIU et al., 1997). Aparentemente, estes receptores pré-sinápticos estariam envolvidos na liberação de substância P pelos terminais centrais de um grupo de neurônios nociceptores no corno dorsal medular de ratos. Outros trabalhos também demonstraram a presença de NMDARs no hipocampo e cerebelo, além de sua atividade modulatória de liberação de neurotransmissores (CASADO et al., 2000; CASADO et al., 2002; PITTALUGA; RAITERI, 1990), inclusive em aferentes primários (DE BIASI; RUSTIONI, 1988). Apesar de NMDARs funcionais não serem detectáveis ao longo do axônio, são fortemente expressos próximos ao terminal central, e foi demonstrado que sua ativação inibe ou diminui a liberação glutamatérgica sináptica. Tal fato sugere que esses receptores pré-sinápticos têm potencial de influenciar fortemente a transmissão da informação sensorial aferente para o corno dorsal da medula espinal (BARDONI et al., 2004).

Devido, então, ao papel relevante dos NMDARs em diversos processos tanto fisiológicos quanto patológicos, os esforços prévios para desenvolver compostos para bloquear a atividade destes receptores foram prejudicados pela indução de efeitos adversos por essas drogas (alucinações, elevação da pressão sanguínea mediada centralmente e, em altas doses, catatonia), reduzindo a capacidade de explorar a potencial eficácia terapêutica desses compostos. Contudo, avanços na compreensão da estrutura molecular e do perfil funcional dos NMDARs levaram os pesquisadores a investigar a possibilidade de desenvolver bloqueadores subtipos-específicos em um esforço de separar os perfis eficazes dos adversos associados ao bloqueio desses receptores.

1.5.1.1 Os NMDARs são canais catiônicos permeáveis ao cálcio

O canal iônico associado ao NMDAR é um canal catiônico que permite a passagem de Na^+ , K^+ , e Ca^{+2} , e é bloqueado por Mg^{+2} . A permeabilidade preferencial ao Ca^{+2} foi suspeitada precocemente, mas foi definitivamente estabelecida por experimentos de MacDermott et al. (MACDERMOTT et al., 1986) e Mayer e Westbrook (MAYER; WESTBROOK, 1987). Estes autores mostraram que agonistas de NMDARs produzem entrada de Ca^{+2} via canais voltagem-dependentes. A intensidade de permeabilidade do Ca^{+2} também parece ser dependente da estrutura que compõe o NMDAR.

1.5.1.2 Bloqueio por magnésio

Como mencionado, os NMDARs são receptores ionotrópicos, ou seja, são acoplados, ou o são, canais iônicos permeáveis, neste caso, preferencialmente ao íon Ca^{+2} . Entretanto, apenas a ativação deste receptor pelo agonista (GLU ou NMDA, por exemplo) não é suficiente para que haja influxo de Ca^{+2} na célula. Estudos demonstraram que, em condições basais de potencial de membrana, o poro do canal permanece bloqueado por um “*plug*” de Mg^{+2} , o qual é voltagem-dependente (JOHNSON; ASCHER, 1990). Desta forma, é necessária uma despolarização prévia neuronal para que haja liberação do “*plug*” de Mg^{+2} do poro do canal, permitindo o influxo de Ca^{+2} . Neste sentido, o Mg^{+2} atuaria como um antagonista, como demonstrado por Evans et al. (EVANS et al., 1979) e Ault et al. (AULT et al., 1980). Experimentos realizados para diferenciar as respostas induzidas por diferentes AAEs mostraram que a inclusão de Mg^{+2} no meio que perfundia a medula espinal de sapos isolada (preparação na qual a solução de banho normalmente é Mg^{+2} -free) reduzia fortemente a atividade sináptica evocada pela estimulação das raízes dorsais e diminuía as respostas a alguns AAEs adicionados ao meio, principalmente do NMDA. Atualmente se sabe que certas características estruturais influenciam neste bloqueio voltagem-dependente pelo Mg^{+2} .

1.5.1.3 Glicina como co-agonista

Dos receptores glutamatérgicos, o NMDAR é certamente um dos mais pesquisados. Esta popularidade é parcialmente devida ao reconhecimento de que este receptor tem papel importante em uma grande variedade de processos fisiológicos assim como em um grande número de condições patológicas. Também é devida ao fato de que os NMDARs podem ser modulados farmacologicamente por influência de ligantes que se acoplam a sítios de ação diferentes do sítio para GLU. Entre esses, o sítio de ligação da glicina (GLY) é um importante alvo de interesse.

A resposta ao NMDA é enormemente aumentada por baixas concentrações de glicina (JOHNSON; ASCHER, 1987). Ainda, a GLY possui altíssima afinidade pelo sítio de ligação nos NMDARs e foi demonstrado que sua ligação é um requisito absoluto para a abertura do canal NMDA (KLECKNER; DINGLEDINE, 1988). Inúmeros experimentos subsequentes reforçaram a idéia de que o NMDAR é o único canal iônico ativado por ligante que requer, para seu funcionamento, a ligação de dois diferentes agonistas.

1.5.1.4 Subunidades estruturais dos NMDARs

As informações sobre os mecanismos responsáveis pela diversidade de tipos de NMDARs provém de estudos funcionais, farmacológicos e técnicas de biologia molecular. Os NMDARs são complexos heteroméricos formados por diferentes subunidades dentro de um repertório de três subtipos: NR1, NR2 e NR3. Apesar de existirem 8 diferentes tipos de NR1, geradas por pequenas variações em um mesmo gene, consideramos essa subunidade como sendo a mais importante dos NMDARs, pois nelas está localizado o sítio de ligação para o co-agonista glicina (o tipo de variante desta subunidade pode também influenciar certas características como inibição de NMDARs por prótons e Zn^{+2}). Existem 4 tipos de subunidades NR2 (NR2A, NR2B, NR2C e NR2D - críticas em determinar muitas características biofísicas e farmacológicas, incluindo alta afinidade pelo GLU, modulação pela GLY, sensibilidade ao bloqueio pelo Mg^{+2} e propriedades cinéticas) e 2 subtipos de NR3 (NR3A e NR3B - quando expressas com NR1/NR2, reduzem a permeabilidade ao Ca^{+2} e fluxo de corrente pelo canal), todas codificadas por seis genes diferentes. A expressão de NMDARs funcionais em células mamíferas requer a co-expressão de pelo menos uma subunidade NR1 e uma NR2. Tem sido descrito que os NMDARs se apresentam como tetrâmeros compostos por duas subunidades NR1 e duas NR2 do mesmo tipo ou diferentes (a maioria dos NMDARs nativos funciona apenas com essa configuração) (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004). Nas células que expressam a subunidade NR3, considera-se que estas se ligam a NR1 e NR2, formando complexos tetraméricos ternários NR1/NR2/NR3 (SASAKI et al., 2002).

A ligação simultânea dos dois co-agonistas (GLU e GLY), permitindo a ativação do NMDAR, ocorre em sítios de ligação nas subunidades NR2 (GLU), e em sítios na subunidade NR1 ou NR3 (GLY) (FURUKAWA et al., 2005; PAOLETTI; NEYTON, 2007; YAO; MAYER, 2006).

NMDARs formados por diferentes subunidades NR2 não variam muito em suas propriedades de condutância e seletividade ao Ca^{+2} , e em sua susceptibilidade ao bloqueio por Mg^{+2} . Entretanto, a presença de subunidades NR3 diminui significativamente a condutância pelo canal e a susceptibilidade ao bloqueio pelo Mg^{+2} (SASAKI et al., 2002).

Recentemente tem sido cogitado que NMDARs contendo subunidades NR2A estão presentes nas sinapses, enquanto NMDARs contendo subunidades NR2B seriam extrasinapses. Isto seria importante, pois indicaria que NMDARs sinápticos e extrasinápticos poderiam contribuir para funções fisiológicas distintas – inclusive com relação à transmissão

da informação sensorial aferente. Assim, as subunidades NR2 determinariam a localização sináptica e a função dos NMDARs. Experimentos mostraram que a deleção do domínio C-terminal de subunidades NR2 impede sua concentração nas sinapses. Pode-se considerar, então, que esta subunidade é importante para determinar processos de plasticidade sináptica relacionados aos NMDARs (CHUNG et al., 2004).

As subunidades NR1 possuem ampla distribuição no SNC. Porém, a localização de NMDARs contendo subunidades NR2B é mais restrita no encéfalo de ratos e humanos (encontrados no telencéfalo, córtex, hipocampo, tálamo e bulbo olfatório – o que pode ser um indicativo de participante da informação olfativa), sendo ausente no cerebelo. Aliás, NMDARs contendo NR2B também são encontrados em células dos GRDs e nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal (BOYCE et al., 1999; NAGY et al., 2004), o que sugere sua participação em processos relacionados à transmissão da informação sensorial.

Atualmente, o desenvolvimento de drogas com ação específica em subunidades de NMDARs é o objetivo de diversos estudos. Uma das primeiras a serem caracterizadas foi o Ifenprodil, com análogos sendo desenvolvidos posteriormente (WILLIAMS, 1993). Esta droga bloqueia seletivamente receptores com subunidades NR2B.

1.6 CONSIDERAÇÕES: A SENSIBILIZAÇÃO RETRÓGRADA DO NEURÔNIO AFERENTE PRIMÁRIO

Como descrito por Parada et al. (PARADA et al., 2003), após ativação do neurônio sensorial periférico, ocorre liberação de GLU no terminal sináptico deste neurônio primário, que atua tanto em receptores pós-sinápticos quanto pré-sinápticos. A estimulação de NMDARs pré-sinápticos levaria, então, à indução da chamada “sensibilização retrógrada”, um processo no qual o próprio neurônio se manteria nesse estado hipernociceptivo, em uma espécie de “retroalimentação positiva”. Com base em trabalhos de Ferreira e Lorenzetti (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; 1994), esse fenômeno retrógrado pode ser considerado um elemento-chave no processo de sensibilização periférica. Esses autores demonstraram que a administração intratecal de PGE₂ induz hipernocicepção periférica devido à liberação de GLU espinal, e que a sensibilização induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ é dependente de NMDARs pré-sinápticos. Levando em conta que uma característica dos neurônios primários é seu funcionamento como uma unidade integrada, neste estudo damos continuidade à investigação da hipótese de que a estimulação de estruturas pré-sinápticas pode ser a responsável pela ativação de mecanismos intracelulares que se difundem pela

célula, comunicando as extremidades. Dessa maneira, propomos que a ativação de receptores do tipo NMDA pré-sinápticos pelo GLU liberado pelo neurônio primário estimula a entrada de Ca^{+2} na célula, que, por sua vez, inicia o fenômeno da oscilação (CICR). Em suma, os mediadores liberados na sinapse pelos neurônios aferentes primários atuam em receptores pré-sinápticos, iniciando um mecanismo independente da mediação central, que sensibilizaria o neurônio primário de maneira retrógrada. Embora Parada et al. (PARADA et al., 2003) tenham associado a ativação destes receptores ao aumento da expressão de canais de Na^+ do tipo $\text{Na}_v1.8$ em fibras do tipo C, alterando o limiar de excitabilidade neuronal, não podemos descartar o fato de que tais receptores podem estar associados também ao fenômeno CICR, já que os NMDARs são canais permeáveis ao Ca^{+2} .

A ativação de NMDARs promove o influxo de Ca^{+2} nos neurônios, aumentando a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ (MAYER; WESTBROOK, 1987). Considerando o que foi exposto acima, essa alteração na $[\text{Ca}^{+2}]_i$ pode ser um dos mecanismos pelos quais se iniciam as ondas de Ca^{+2} . Desta maneira, a ação retrógrada do GLU liberado no terminal pré-sináptico de neurônios aferentes primários em NMDARs pré-sinápticos promoveria influxo de Ca^{+2} e iniciaria a CICR, o que, segundo nossa hipótese, poderia ser um dos processos responsáveis pelo início ou manutenção da hipersensibilidade induzida por mediadores inflamatórios. Portanto, embora o Ca^{+2} possa ser necessário para a ativação de processos bioquímicos intracelulares – como transcrição gênica, por exemplo –, a ocorrência da CICR pode alterar o limiar de repouso neuronal devido à nova dinâmica de movimentos iônicos induzida por esse fenômeno. Dessa maneira, é plausível a nossa proposta de estudar o papel dos receptores pré-sinápticos do tipo NMDA na sensibilização do neurônio aferente primário, inclusive sua interação com os eventos intracelulares promovidos pelo mediador PGE_2 (indução da cascata dos segundos-mensageiros AMPc, PKA e PKC), e sua participação no fenômeno CICR, processos estes demonstrados estarem envolvidos na sensibilização neuronal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi verificar qual é o papel dos receptores tipo NMDA pré-sinápticos no processo de hipernocicepção inflamatória, sua interação com os eventos intracelulares promovidos pelo mediador PGE₂ (ativação dos segundos-mensageiros AMPc, PKA e PKC) e sua participação no fenômeno de oscilação de Ca⁺² (CICR), processos estes envolvidos na sensibilização neuronal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- verificar a participação dos NMDARs na cascata de eventos induzida pela PGE₂ e determinar em qual(is) etapa(s) desta cascata os NMDARs atuam: foi demonstrado que estímulos hipernociceptivos como a PGE₂ induzem cascatas de eventos intracelulares, envolvendo segundos-mensageiros (AMPc, PKA e PKC), que culminam na sensibilização do neurônio aferente primário. Por outro lado, o GLU liberado na terminação neuronal atua em receptores pré-sinápticos tipo NMDA, levando à sensibilização retrógrada (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; PARADA et al., 2003; FERREIRA; LORENZETTI, 1994). Além disso, foi verificado que a PGE₂ induz oscilações de Ca⁺² (CICR), o que pode ser um dos mecanismos de sensibilização neuronal. Consideramos a hipótese de que os NMDARs poderiam ser responsáveis pela indução da CICR e, uma vez que ainda não havia demonstrações indicando se a ativação destes receptores teria influência sobre a cascata de eventos promovidos pela PGE₂, verificamos qual a relevância destes receptores nestes dois processos;

- verificar in vitro a participação dos NMDARs na indução das oscilações de Ca⁺²: vários trabalhos descrevem o fenômeno de ondas de Ca⁺² após ativação de neurônios sensoriais cultivados (USACHEV; THAYER, 1997; AYAR; SCOTT, 1999; CURRIE; SCOTT, 1992; CURRIE et al., 1992; CURRIE et al., 1995). Além disso, como mencionado anteriormente, foi demonstrado que drogas que induzem a sensibilização, como a PGE₂, provocam ondas de Ca⁺². A partir disso, levantamos a hipótese de que o aumento de Ca⁺² intracelular e a ativação do fenômeno CICR induzido por PGE₂ e DbcAMP seriam dependentes de NMDARs. Dessa maneira investigamos *in vitro* se a

administração de NMDA poderia produzir oscilações de Ca^{+2} e se antagonistas de NMDARs (MK801 e D-AP-5) inibiriam a CICR induzida por PGE_2 e dibutilil-AMPC (DbcAMP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (USP-RP), onde os animais eram mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida *ad libitum* até o dia do experimento. Os testes comportamentais foram realizados com animais pesando entre 180 e 220 g e, os experimentos *in vitro*, com animais pesando de 100 a 160 g.

3.2 ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS

Nos testes comportamentais, as drogas foram administradas por quatro vias diferentes: via intraplantar (i.pl. – subcutânea [s.c.] ou intradérmica [i.d.]), via intratecal (i.t.) ou via intraganglionar (i.gl.).

3.2.1 Administração intraplantar (i.pl.) de drogas

3.2.1.1 Via subcutânea (s.c.)

As drogas foram injetadas na pata traseira dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa e inserida no meio da pata, entre as cinco calosidades distais, no mesmo local de aplicação do estímulo mecânico. Volumes de 100 µl (quando apenas uma droga foi injetada) ou 50 µl (quando mais de uma droga foi injetada no mesmo sítio) foram administrados (PARADA et al., 2003).

3.2.1.2 Via intradérmica (i.d.)

A administração intraplantar intradérmica de drogas foi feita utilizando-se o mesmo tipo de agulha hipodérmica descartável, número 26G½ (0,45 x 13 mm) (marca *Benton & Dickinson*), retirada de seu encaixe original e conectada à extremidade de um cateter de polietileno PE-20 (marca *Intramedic Clay Adams*; diâmetro interno 0,381 mm e diâmetro externo 1,09 mm), por sua vez encaixado em uma microsseringa de Hamilton de 25 µl. Após

a inserção da agulha e injeção da droga (em volume máximo de 10 µl) sob a pele da pata do animal, era observada a formação de uma pequena bolha (KHASAR et al., 1993).

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

A metodologia de administração intratecal direta descrita por Papir-Kricheli et al. (PAPIR-KRICHELI et al., 1987) foi ligeiramente modificada, de acordo com trabalho publicado por Mestre et al. (MESTRE et al., 1994). Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais eram anestesiados com éter e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar ficasse hiperfletida. Em seguida, uma agulha BD *Ultra-Fine*[®] (29G) de seringa para insulina 30 unidades era inserida no espaço subaracnóide, perfurando a região medial entre as vértebras L4-L5 (± 1) em ângulo de aproximadamente 45°, e o volume de 10 µl era injetado em *bolus*. A correta localização da punção no espaço subaracnóide pôde ser verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal. Após a injeção, a agulha era mantida por alguns segundos em posição antes de sua cuidadosa retirada, para evitar o refluxo da solução injetada.

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

Para a inoculação de drogas no gânglio da raiz dorsal (GRD) foi utilizado o método de injeção direta no quinto GRD lombar (GRD-L5) descrito por Ferrari et al. (FERRARI et al., 2007). Para que o volume de 5 µl pudesse ser administrado sem o risco de permear estruturas adjacentes ao gânglio, foi confeccionada uma escala utilizada para controle fino da quantidade de solução injetada (**figura 3.1**).

3.2.3.1 Preparação da cânula para injeção intraganglionar

Uma tira de papel milimetrado de 10 cm foi cortada (10 cm X 2 cm) e colada a um pedaço de 30 cm de cateter de polietileno PE-10 (marca *Intramedic Clay Adams*, diâmetro interno 0,28 mm e diâmetro externo 0,61 mm), de modo a servir como graduação da quantidade de substância no interior do cateter (**figura 3.1, painel A**). A calibração foi feita de modo que cada 2,5 cm corresponderiam ao volume de 1 µl depositado na extremidade da agulha (**figura 3.1, painel B**). Uma pequena gota do corante azul de pontamina foi succionada para o interior do cateter, de modo que ficasse sobre a porção graduada. O deslocamento da

gota de corante forneceu a referência para determinação da quantidade de solução depositada na extremidade da agulha.

A agulha utilizada (agulha gengival marca *Injecta*, 30 G curta) foi adaptada à extremidade do cateter após sua preparação. Contudo, devido ao seu extenso bisel, havia a possibilidade de erro no momento da injeção, depositando solução fora da estrutura ganglionar, já que o orifício da agulha no bisel poderia ultrapassar as dimensões do gânglio. Para diminuir essa possibilidade, a agulha foi retirada de sua base com a ajuda de uma lamparina, e invertida, sendo fixada novamente na base com resina acrílica odontológica (marca *Dencor*, pó/líquido, autopolimerização). O bisel de menor extensão após inversão da agulha propiciou maior precisão da injeção, diminuindo o risco de depositarmos a solução fora do GRD. A outra extremidade da agulha foi, então, adaptada à cânula (**figura 3.1, painel C**).

O outro extremo do cateter foi adaptado à uma agulha comum (marca *B-D*, 13x3, 30 G^{1/2}) e, a esta, foi adaptada uma válvula *tri-way* conectada à uma seringa luer de vidro, de 5 ml. O fácil deslizamento do êmbolo da seringa de vidro facilitou o controle do volume injetado através de nosso aparato. O uso da válvula *tri-way* foi de grande valia, uma vez que muitas vezes foi necessário re-preencher a seringa com ar para que pudéssemos “empurrar” a gota de corante que marcava a quantidade de solução injetada.

Uma vez preparada a cânula graduada, conectada a seringa e preenchida com a solução a ser injetada, passamos à injeção propriamente dita.

3.2.3.2 Localização e injeção no gânglio da raiz dorsal L5

Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados com éter e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo que a região lombar ficasse hiperfletida (**figura 3.2, painel A**). 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas (**figura 3.2, painel B**), foi inserida uma cânula-guia (25x10, 19 G), com maior calibre, com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. Esta última foi inserida, através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral fosse atingido (**figura 3.2, painel C**). Delicados movimentos foram feitos até que uma área com menor resistência, indicando a penetração da agulha no espaço intervertebral, fosse encontrada, e um reflexo da pata ipsilateral ocorresse, indicando a penetração da ponta da agulha no GRD do quinto nervo

espinal lombar (L5), localizado sob o processo transversal da quinta vértebra lombar. Em seguida, pressionou-se o êmbolo da seringa de vidro de modo que houvesse um deslocamento de 12,5 cm da solução dentro do cateter, totalizando a injeção do volume de 5 µl no GRD (em casos nos quais mais de uma droga foi administrada no GRD, o volume injetado de cada droga foi de 2,5 µl – deslocamento da gota de 6 cm). Após a injeção da(s) droga(s), os animais eram recolocados na caixa para recuperação da anestesia.

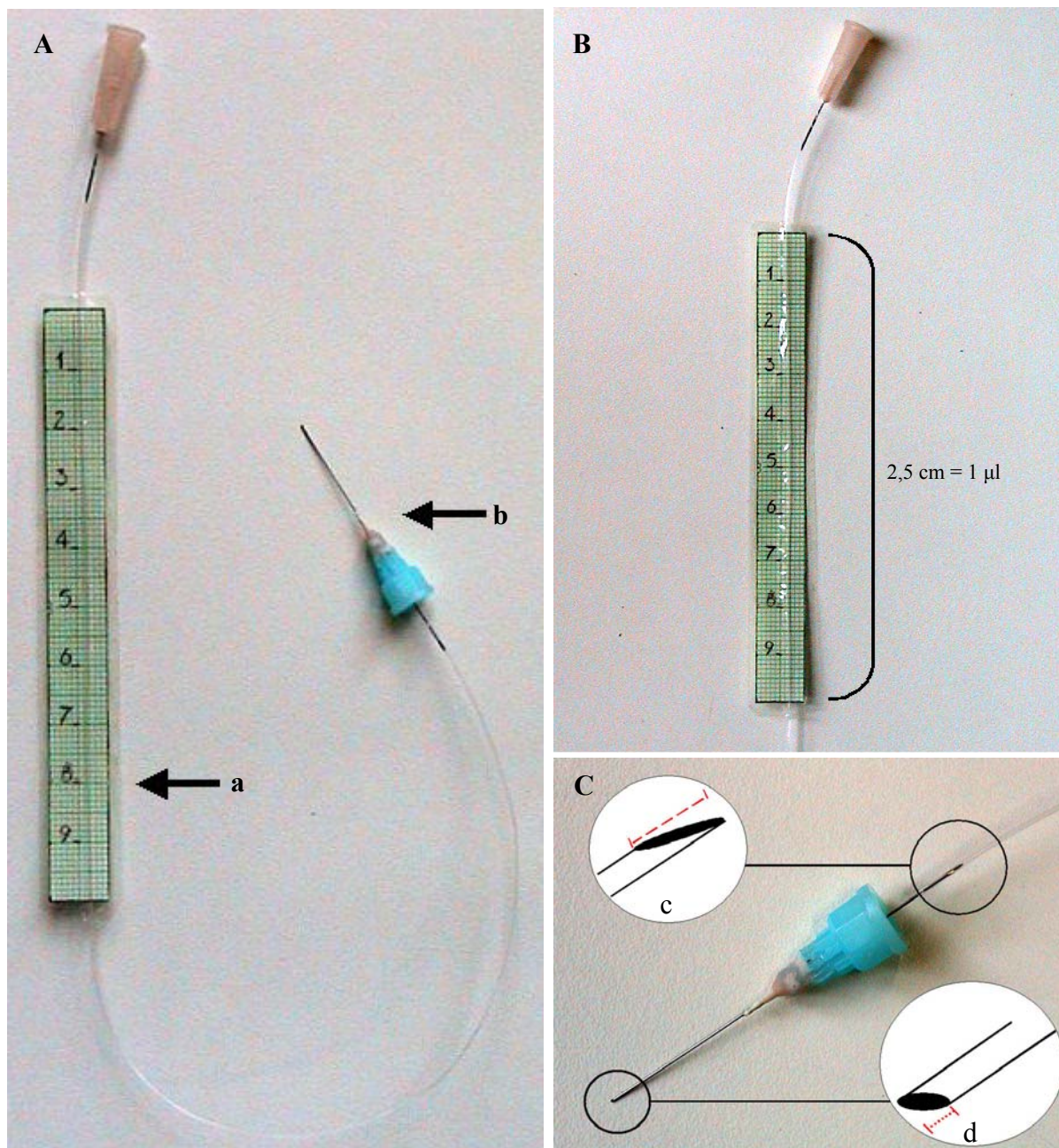


Figura 3.1: Detalhes do aparato confeccionado para injeção direta no gânglio da raiz dorsal (GRD). **Painel A:** (a) – escala milimetrada para controle da quantidade de solução injetada; (b) – agulha gengival adaptada para proporcionar maior precisão no momento da injeção; **Painel B:** detalhe da escala; **Painel C:** detalhe da agulha gengival adaptada. Note a inversão da posição da agulha (c e d dentro dos círculos), adaptada de modo a obtermos menor bisel e, assim, melhor precisão no momento de localizar o GRD.

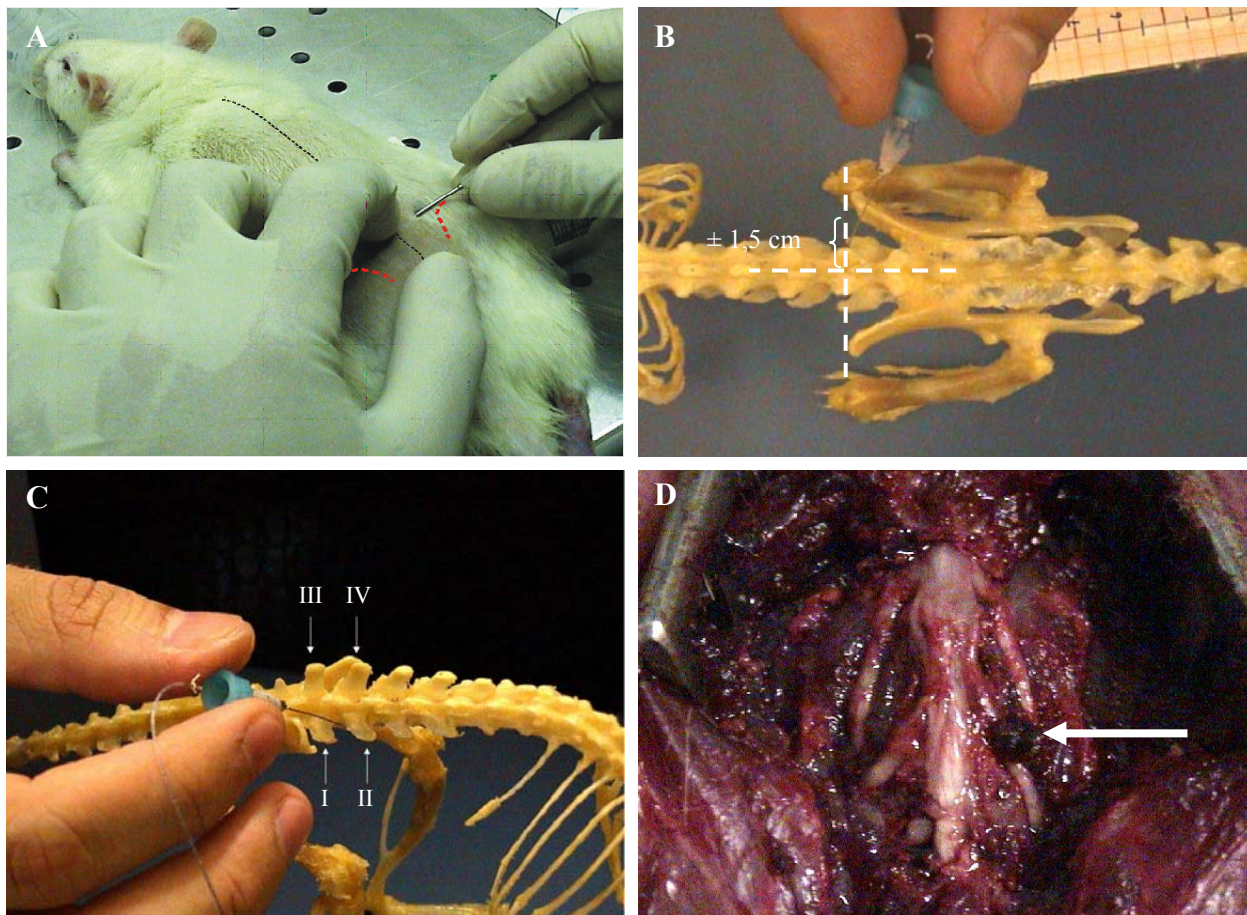


Figura 3.2: Detalhes do procedimento de injeção direta no gânglio da raiz dorsal L5 (GRD-L5). **Painel A:** punção inicial com agulha de maior calibre (cânula-guia 25x10, 19G) para facilitar a penetração da agulha gengival na pele do animal. A linha pontilhada preta está sobre a coluna vertebral do animal e as linhas vermelhas indicam as cristas ilíacas, usadas como referência para a localização do GRD-L5; **Painel B:** linha imaginária unindo as bordas rostrais das cristas ilíacas. Sobre esta linha, cerca de 1,5 cm lateralmente à linha sagital, é inserida a agulha adaptada em ângulo de 45°; **Painel C:** localização da agulha entre os processos laterais das vértebras L6 e L5 (I e II, respectivamente). III e IV indicam os processos lombares das referidas vértebras; **Painel D:** dissecação cuidadosa mostrando o GRD-L5 direito após injeção i.gl. (seta), o nervo L4 direito, as raízes aferentes e GRDs dos nervos L4, L5 e L6 esquerdos.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais para avaliação da hipernocicepção mecânica foram realizados entre 9 e 17:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas éticas estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983), e estavam de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Ainda, os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (protocolo n° 140/2005).

3.3.1 Teste de pressão crescente na pata de ratos – Von Frey eletrônico - O uso de filamentos de von Frey (VON FREY, 1896) é um método utilizado rotineiramente em procedimentos experimentais para avaliar nocicepção. Esse método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado em humanos (JENSEN et al., 1986) e em ratos (MÖLLER et al., 1998). Neste trabalho, os experimentos foram realizados com um anesthesiômetro eletrônico (MODELO 1601C, *LIFE SCIENCE INSTRUMENTS*, Califórnia, EUA) adaptado, que consistia em um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho era de 0,1 g e estava 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 era realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 20 x 17 cm cujo assoalho consistia de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes dos experimentos para adaptação ao ambiente. Espelhos posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação facilitaram a visualização da planta das patas dos animais (**figura 3.3**). O experimentador aplicava, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada (**figura 3.4**). Os estímulos eram repetidos por até seis vezes, em geral até que o animal apresentasse 3 medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na força (Δ de reação em gramas) obtida pela subtração da média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (“zero hora”) da média de três valores em gramas (força) mensurados após a administração das drogas, as quais variaram de acordo com o experimento (**figura 3.5**).

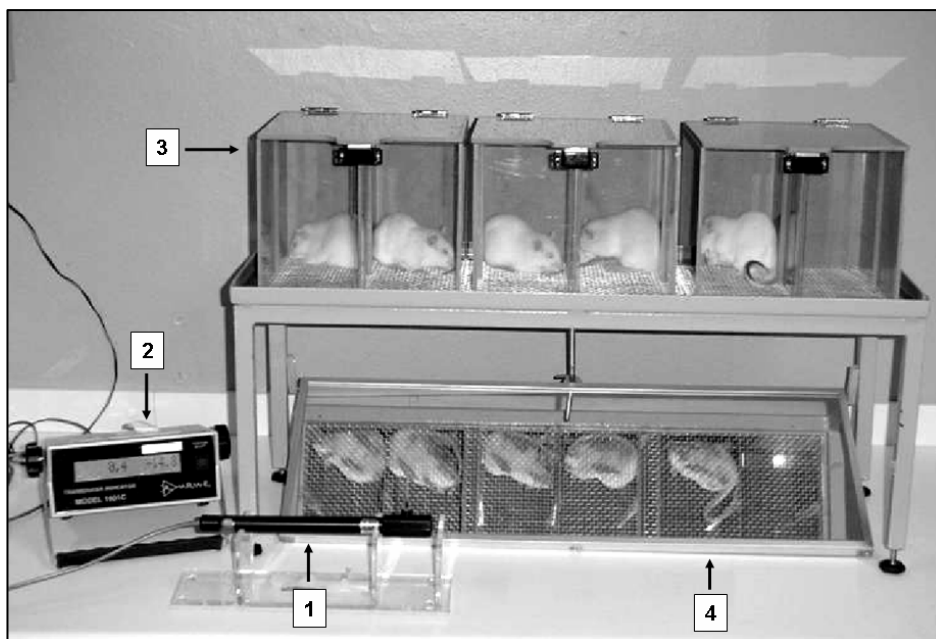


Figura 3.3: Equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). A foto mostra o anestesímetro eletrônico (Modelo 1601C, *LIFE SCIENCE INSTRUMENTS*, Califórnia, EUA), constituído por transdutor de pressão (1) conectado ao contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 20 x 17 cm de altura) (3) e o espelho inclinado (4), posicionado abaixo do assoalho, usado para fornecer visão desobstruída das patas traseiras dos animais durante a avaliação da hipernocicepção à estimulação mecânica.

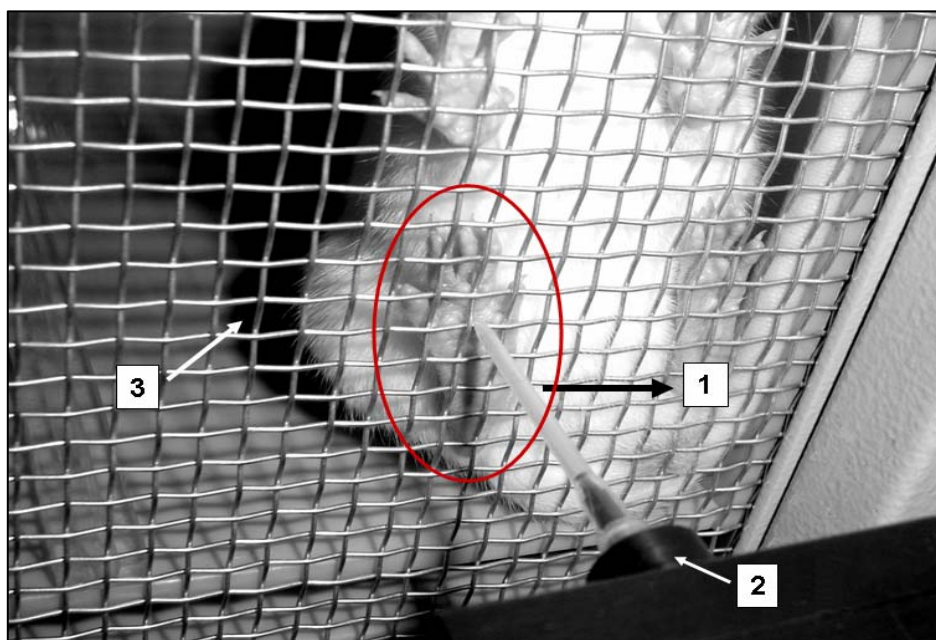


Figura 3.4: Momento do teste de pressão crescente na pata do animal. A foto mostra a ponteira de polipropileno (1), acoplada ao transdutor de força (2), em contato com a pata do animal (círculo vermelho). O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede do assoalho (3), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata, até que o animal produza a resposta de sacudida caracterizada como “flinch”.

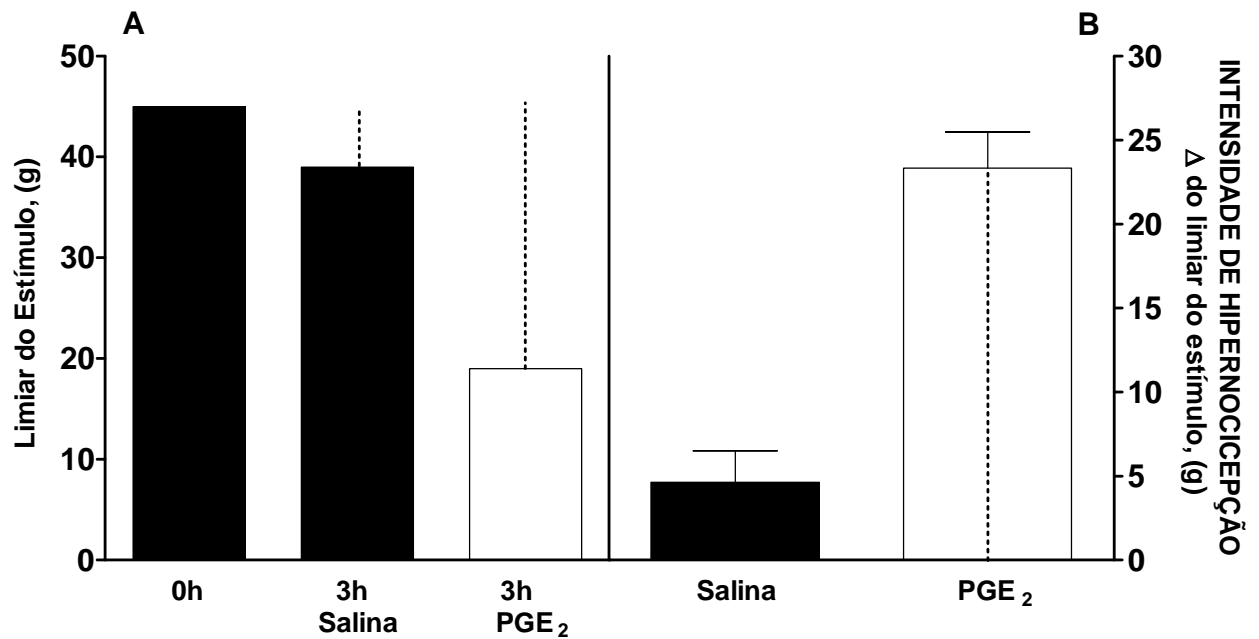


Figura 3.5: Parâmetros utilizados para o cálculo da intensidade de hipernocicepção mecânica avaliado no teste de pressão crescente na pata de ratos – Von Frey eletrônico. Painel A: Limiar de estímulo em gramas avaliado na zero hora (0h) e 3 horas após a administração de salina (3h; Salina) ou prostaglandina E₂ (3h; PGE₂). **Painel B:** Intensidade de hipernocicepção, em gramas, que corresponde à diferença entre os limiares de estímulo em gramas, medidos na zero hora e na 3^a hora após a administração de salina ou prostaglandina E₂ (indicado pelas linhas pontilhadas).

3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DE RECEPTORES NMDA NOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS DOS NERVOS ESPINAIS LOMBARES

Embora no Projeto inicial tenha sido proposto o uso da técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) para análise das subunidades que compõem os NMDARs do GRD, optamos pela mudança de metodologia, passando a fazer tais análises pelo método de PCR em tempo real (*real time-PCR*), que se mostrou mais eficiente, podendo, inclusive, ser realizado em menor tempo. A seguir serão descritos os passos desta técnica.

3.4.1 Retirada dos gânglios das raízes dorsais

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (4%, 1 ml / 100 g / via intraperitoneal [i.p.]) para retirada dos GRDs L4, L5 e L6. Após tricotomia da região dorso-lombar, seguida de assepsia da região com povidine iodado, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica apropriada e uma incisão na linha média, desde a região lombar até a segunda vértebra sacral, foi feita. Os músculos paravertebrais foram dissecados, deixando livres os processos espinais. Iniciando pelas vértebras L4, L5 e L6, seccionando-se os processos lombares e transversos e retirando-se os ligamentos intravertebrais, foi possível remover a lâmina superficial das vértebras e expor os GRDs. Depois de retirados, os mesmos foram imediatamente congelados em gelo seco e processados, como descrito a seguir. **OBSERVAÇÃO:** para avaliação da expressão de NMDARs após o tratamento com olideoxinucleotídeos-antisenses (ver item 3.7 *OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS ANTISENSES (ODN-AS), mais adiante) somente os GRD-L5 foram retirados.

3.4.2 Extração do RNA e preparo do cDNA

Após os GRDs terem sido extraídos e estocados à temperatura de -70°C , passou-se à extração do RNAm. Materiais plásticos e soluções livres de RNAase foram usados em todo procedimento. No momento do processamento, foi acrescentado 1 ml de reagente Trizol (*Gibco - Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA*) aos GDRs, que foram homogeneizados (*Polytron Aggregate, PT 3100*) para a extração do RNA total, realizada como descrito por Overbergh et al. (OVERBERGH et al., 2003). Em seguida, 2 μg do RNA total foram transcritos por ação da enzima transcriptase reversa Superscript II (*Gibco -*

Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA). O cDNA assim obtido foi usado para amplificação específica do RNAm de interesse.

3.4.3 Reações de PCR em tempo real (*real time-PCR*)

A expressão quantitativa de RNAm para as subunidades de NMDARs foi analisada por meio de reações de *real time-PCR*, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (*Applied Biosystems*, Warrington, Reino Unido). Para as reações de *real time-PCR* foram utilizados 12,5 µl do reagente SYBRGreen Master Mix (*Applied Biosystems*, o qual contém o fluoróforo SYBRGreen 1, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs com dUTP, o fluoróforo ROX - utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência -, e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5 µl da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 3,5 µl de água MiliQ tratada com DEPC, e 4 µl da solução contendo cada *primer* (0,1 µg / µl) (a partir de uma solução estoque, na qual cada *primer* se encontrava na concentração de 5 µg / µl, foram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal do *primer* a ser utilizada em cada reação para o volume de 4 µl - ver item 3.7 **primers* para reação de *real time-PCR* específicos para as subunidades de receptores NMDA NR1, NR2a, NR2b, NR2c, NR2d, NR3a e NR3b, mais adiante). A reação de amplificação compreendeu basicamente 2 minutos a 50° C, 10 minutos a 95° C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95° C e 1 minuto a 60° C, além de um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95° C, realizado para obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Previamente as reações de *real time-PCR* foram otimizadas com relação às concentrações ideais de cada par de *primers* (*sense* e *antisense*, *forward* e *reverse* e seqüência 1 e seqüência 2) e temperatura de *annealing* (anelamento), de modo a maximizar a eficiência e a especificidade de amplificação. O sistema utilizado (termociclador ABI5700 associado ao software ABI Prism, *Applied Biosystems*) realizou as reações de amplificação e detecção, e quantificou as amostras por meio da análise do nível de fluorescência gerada pela incorporação de nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de *ct* (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos no qual a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), o que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Todas as amostras também foram

submetidas a reações para detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Desta forma, os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene-alvo. Além disso, uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados. Os resultados apresentados representam os valores da média \pm epm da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos dos GRDs de 12 animais (ou, nos experimentos para avaliação da expressão de NMDARs após o tratamento com olideoxinucleotídeos-antisenses (ver item 3.7 *OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS ANTISENSES (ODN-AS), mais adiante), 5 animais).

3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL

3.5.1 Cultura de neurônios dos gânglios das raízes dorsais

As culturas foram preparadas conforme protocolo descrito anteriormente (LINHART et al., 2003). Ratos Wistar machos (100 g) foram anestesiados com éter, sacrificados, e tiveram os GRDs das regiões lombar e torácica removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37° C por 75 minutos em solução salina de Hank's contendo 0,28 U/ml de colagenase e, depois, por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de streptomicina. As células, dissociadas mecanicamente, foram contadas em "trypan blue" para determinar a viabilidade celular. Estas células foram cultivadas em placas cobertas com matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ (37° C), com o mesmo meio de cultura já descrito, e utilizadas após 24 a 48 horas. Diferentemente das células cultivadas a partir de gânglios de animais recém-nascidos, as culturas feitas a partir de animais adultos crescem independentemente da presença do fator de crescimento neural (NGF) (DODGE et al., 2002). Contudo, em nossos experimentos foram cultivadas na presença e na ausência de 50 ng/ml de NGF. Apesar de ter sido observado anteriormente (SOUTHALL; VASKO, 2000) que a presença de NGF não causa alteração nas respostas à PGE₂ observadas, decidimos, mesmo assim, manter as culturas na ausência de NGF, pois havia o risco de que a presença deste fator pudesse alterar algumas respostas observadas *in vitro* (KASAI; MIZUMURA, 2001;

WINTER, 1998) e também tenha sido observado que sua administração *in vivo* induz hipernocicepção (LEWIN et al., 1993). **OBSERVAÇÃO**: nos experimentos realizados com culturas de células da glia isoladas, as culturas eram preparadas normalmente, porém esperava-se 3 dias. Neste tempo havia intensa proliferação dessas células, e era feita dissociação mecânica, raspando-se a placa e transferindo as células para outra placa, sem matrigel. Os neurônios não se aderiam à placa sem matrigel, permanecendo apenas as células da glia.

3.5.2 Imunofluorescência em cortes e culturas de gânglios das raízes dorsais

Foram removidos os gânglios L5 de animais anestesiados em éter e perfundidos com salina (150 ml) e paraformaldeído 4% (PFA, 150 ml). Estes gânglios foram pós-fixados por 1 hora em PFA 4% e desidratados em solução de sacarose 30% por 48 horas, ou até que afundassem na solução. Foram feitos cortes de 14 µm em lâminas gelatinizadas. Para o ensaio em culturas primárias, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS e então fixadas durante 15 minutos em PFA 4%. O protocolo descrito a seguir foi utilizado tanto nos cortes quanto nas culturas: os tecidos foram incubados por 30 minutos em PBS contendo glicina (0,1 M) para inativar os aldeídos livres presentes no PFA. Foi realizado bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 2% e permeabilização com triton X-100 0,2% por 1 hora, sendo os anticorpos primários incubados em solução PBS contendo triton X-100 0,1% e BSA 1% por duas horas em temperatura ambiente. Os tecidos foram lavados uma vez com a mesma solução usada para incubação do anticorpo primário e em seguida lavados 5 vezes durante 5 minutos com PBS. Os anticorpos secundários foram incubados por 1 hora em solução igual à utilizada para incubação dos anticorpos primários. Os cortes ou culturas foram então lavados 5 vezes durante 5 minutos em PBS e, as lâminas, montadas em *fluoromount*. As imagens foram inicialmente observadas em microscópio de fluorescência comum e depois fotografadas em microscópio confocal (Leica, SP5).

3.5.3 Verificação da dinâmica de cálcio em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal por microscopia confocal

A ocorrência de ondas de Ca^{+2} (CICR) em neurônios sensitivos primários foi avaliada por meio de microscopia confocal. As culturas de neurônios cultivadas em placas contendo uma lamínula de vidro aderida ao fundo foram lavadas em tampão Hanks com 10 mM de

HEPES (pH 7,4) e incubadas com 10 μM do indicador de Ca^{+2} intracelular Fluo-3 AM (*Molecular Probes*) durante 1 hora no escuro em temperatura ambiente. As placas de cultura incubadas com o indicador de Ca^{+2} foram lavadas 3 vezes. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada por meio de imagens obtidas por microscopia confocal (*Zeiss*, LSM 510 ou *Leica*, SP5), usando-se o comprimento de onda de 488 nm para excitação e 522 nm para emissão. Nos experimentos realizados para avaliar o efeito do NMDA sobre o Ca^{+2} intracelular foi utilizado tampão Hanks sem a adição de magnésio (Mg^{+2}). No experimento realizado para avaliar a participação do Ca^{+2} extracelular no efeito da PGE_2 foi utilizado tampão Hanks no qual o Ca^{+2} foi substituído pelo quelante EGTA. Os dados foram mostrados como variação de intensidade de fluorescência dividida pela fluorescência basal ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$).

3.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *Graph Pad Prism 4.0* e os resultados foram representados como a média \pm erro padrão da média em grupos de 4 a 12 animais. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando-se a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*). Em seguida, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Bonferroni para se obter comparações pareadas. O nível de significância estabelecido foi de $\text{P}<0,05$. As imagens obtidas por microscopia confocal foram transformadas e quantificadas usando o software de domínio público *ImageJ* (NIH).

3.7 DROGAS E DILUENTES

As seguintes drogas foram utilizadas durante a execução deste estudo:

- * **Prostaglandina E₂ (PGE₂)** (*Sigma/RBI*, USA) - dissolvida em etanol (*Merk*) para a produção de uma solução estoque na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sendo esta posteriormente diluída em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplex*, Brasil) para obtenção das soluções com as concentrações utilizadas nos respectivos experimentos;
- * **NMDA (N-metil-D-aspartato)** (*TOCRIS*, USA) – agonista de receptores para glutamato NMDA (NMDARs), diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplex*, Brasil);
- * **D-AP-5 (2-amino-5-phosphoalate)** (gentilmente cedido pelo Dr. J. Garthwaite, *Wellcome Foundation*, Inglaterra) - antagonista competitivo de NMDAR, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplex*, Brasil);

- * **AMPA ((RS)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)** (*Tocris*, Charlotte, Bristol, Inglaterra) - diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione)** (*Tocris Neuramin*, Essex, Reino Unido) - antagonista de receptores para glutamato tipo AMPA, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **Protein kinase A** (*Calbiochem* (La Jolla, CA, USA)) – subunidade catalítica de proteína quinase dependente de AMPc (PKA), diluída em DMSO e re-suspensa em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **PKCε (ψεRACK)** (*SynPep Corp* (Dublin, CA)) – agonista específico de proteína quinase Cε;
- * **DbcAMP** (N²,2'-O-dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate, *Sigma*, USA) – dibutilil AMPc (análogo sintético de AMPc), diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **H89** (*Sigma/RBI*, USA) – inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (PKA), diluído em DMSO e re-suspensa em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **Inibidor específico da proteína quinase C epsilon (PKCε inhibitor)** (*Sigma/RBI*, USA) - diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **Wiptide** (*Peninsula Laboratories*, Inc.) - inibidor de proteína quinase dependente de AMPc, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **SQ22536 (9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine)** (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO) – inibidor de adenilato ciclase, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **Indometacina (1-[P-chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid)** (*Sigma*, USA) - dissolvida em tampão TRIS e re-suspensa em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);
- * **Fluorocitrato** – inibidor do metabolismo de células da glia. A solução de fluorocitrato foi preparada como descrito a seguir (PAULSEN et al., 1987): 8 mg de D,L-ácido fluorocítrico, sal de Ba₃ (*Serva*, Heidelberg, F.R.G.), foram dissolvidos em 1 ml de 0,1M HCl. Duas a três gotas de 0,1M Na₂SO₄ foram adicionadas ao precipitado de Ba₂. 2 ml de 0,1M NaHPO₄ foram adicionados e a suspensão foi centrifugada a 1000G durante 5 minutos. O sobrenadante foi diluído em 0,9% NaCl até a concentração final e o pH foi ajustado a 7,4;
- * **Dantrolene** (*Sigma/RBI*, USA) – antagonista de receptores rianodine, diluído em DMSO e re-suspensa em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);

* **BAPTA/AM (1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid / tetra (acetoxymethyl) Ester)** (*Merck Bioscience*, Korea Merck Limited, Seoul) – quelante de cálcio intracelular, diluído em DMSO e re-suspenso em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);

* **Éter etílico** (*Technion*, Brasil) - agente anestésico;

* **Hidrato de Cloral** (*VETEC*) – agente anestésico, diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil);

* **primers para reação de *real time*-PCR específicos para as subunidades de receptores NMDA NR1, NR2a, NR2b, NR2c, NR2d, NR3a e NR3b** (LAI et al., 2000; PAARMANN et al., 2000; SHIMOYAMA et al., 2005; WANG et al., 2005) (adquiridos por meio da importadora Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) - **NMDAR1**: Grin1 (UniSTS:465388); *Forward primer*: ATAGTGACAATCCACCAAGAGCC, *Reverse primer*: GTAGCTCGCCCATCATTCCGTT; **NMDAR2, subunidade NR2a**: Grin2a (UniSTS:143261); *Forward primer*: TTATTGGGAGATGTCCCTCG, *Reverse primer*: CACGTCTATTGCTGCAGGAA; **NMDAR2, subunidade NR2b**: Grin2b (UniSTS:143262); *Forward primer*: ATCAGTGCTTGCTTCACGG, *Reverse primer*: GGGTTGGACTGGTTCCTAT; **NMDAR2, subunidade NR2c**: Grin2c (UniSTS:143263); *Forward primer*: CTTTTGTGCTTGGCCTAGG, *Reverse primer*: CCTTATCGTGCCTTTGTTCT; **NMDAR2, subunidade NR2d**: *sense*: CGATGGCGTCTGGAATGG, *antisense*, AGATGAAACTGTGACGGCG; **NMDAR3, subunidade NR3a**: Grin3a; *sense*, CCGCGGGATGCCCTACTGTTC, *antisense*, CCAGTTGTTTCATGGTCAGGAT; **NMDAR3, subunidade NR3b**: Grin3b; *Sequence 1*: TGGTGCTTTCCAGTTACACG, *Sequence2*: TTTTGTCCCAACCATGAC;

OBSERVAÇÃO: o material utilizado nos experimentos de *real time*-PCR foi detalhado durante a descrição da metodologia (item 3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS SUBUNIDADES DE RECEPTORES NMDA NOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS DOS NERVOS ESPINAIS LOMBARES).

* **OLIGODEOXINUCLEOTÍDEOS ANTISENSES (ODN-AS)** - Os ODN-antisenses (ODN-AS) utilizados foram obtidos da empresa *Bioneer* (EUA). Os ODN-AS específicos para cada subunidade de NMDARs foram desenhados a partir do genoma de ratos disponível na rede mundial de computadores (Pubmed – Medline) e, das diversas seqüências possíveis, a escolha foi baseada nos critérios estabelecidos na literatura (STONE; VULCHANNOVA, 2003) no que diz respeito ao tamanho (15-20 pares de base), proximidade com a extremidade inicial do RNAm e quantidade de resíduos de guanina e citosina.

- a) ODN-AS **NR1**: TCTTCCAAGAGCCGTC;
- b) ODN-AS **NR2a**: TATCGGAGGCGTGGTCGTG;
- c) ODN-AS **NR2b**: TAGGTGACAGTGTGCGTGG;
- d) ODN-AS **NR2c**: TAAGGCGCCAACTCTCGGT;
- e) ODN-AS **NR2d**: TGAAGGTAGAGCCACCAGG;
- d) ODN-AS **NR3a**: TATCACCTGGCTTCGTGCG;
- e) ODN-AS **NR3b**: TGTTGCCTCAGATCCGCCT.

Como controle, foi utilizado o MISMATCH, que corresponde à mesma seqüência do antisense, exceto pela substituição de 4 bases. Antes da administração, os ODN-AS foram liofilizados e reconstituídos em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax*, Brasil) livre de nuclease à concentração de 1 µg/µl. Os ODN-AS ou o MISMATCH foram administrados por via intraganglionar (i.gl.) (20 µg/ 5 µl) uma vez ao dia, durante 5 dias consecutivos.

*** ANTICORPOS:**

- Anticorpos primários

- Rabbit IgG anti-BNPI (VGLUT1) (*Santa Cruz Biotechnology*, USA);
- Goat IgG anti-GFAP (*Santa Cruz Biotechnology*, USA).

- Anticorpos secundários

- Donkey anti-goat igG conjugado a Alexa Fluor488 (*Molecular Probes*, USA);
- Donkey anti-rabbit IgG conjugado a Alexa Fluor594 (*Molecular Probes*, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito hipernociceptivo do NMDA administrado no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) e comparação com o efeito hipernociceptivo do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (curvas dose-resposta e tempo-resposta).

Resultados obtidos anteriormente (FERRARI, 2004) mostraram que drogas administradas por via intratecal (i.t) podem atingir diretamente os gânglios das raízes dorsais (GRDs), exercendo efeito nestas estruturas. Considerando que vários experimentos mostraram que a administração i.t. de NMDA induz hipernocicepção mecânica (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; 1994), levantamos a hipótese de que tal efeito resultaria da ação do agonista em receptores localizados nos GRDs. Para testarmos tal proposição, realizamos experimentos de dose-resposta com a administração por via i.t. ou por via i.gl. de doses crescentes de NMDA (25, 80 e 240 ng, dissolvido em salina – **figura 4.1a, painéis A e B**). Os resultados mostraram que, quando administrado por via i.t., o agonista induziu hipernocicepção mecânica com intensidade crescente dependente da dose, e efeito máximo atingido com a dose de 80 ng, uma vez que, na dose de 240 ng, produziu efeito estatisticamente não diferente do produzido pela dose anterior (**figura 4.1a, painel A**). Entretanto, embora a intensidade da hipernocicepção induzida pelo NMDA administrado por via i.gl. (**figura 4.1a, painel B**) tenha também apresentado perfil crescente dependente da dose, apenas a dose de 240 ng produziu efeito estatisticamente diferente dos produzidos pelas doses de 25 e 80 ng. Os dados apresentados mostraram que o NMDA administrado tanto por via i.t. quanto i.gl. é capaz de induzir hipernocicepção mecânica. Contudo, a dose mais efetiva em induzir tal efeito no GRD (240 ng) foi maior que a dose capaz de induzir hipernocicepção administrada por via i.t. (80 ng). Isso sugere que o NMDA administrado na medula espinal pode estar atuando em receptores pós-sinápticos, em adição aos receptores presentes no GRDs. Além disso, não descarta a possibilidade do agonista estar atuando também em receptores localizados nos terminais pré-sinápticos dos neurônios aferentes primários.

Esses dados nos possibilitaram estabelecermos as doses de NMDA a serem utilizadas por via i.t. e i.gl.. Somando-se a isso o fato de que a administração i.t. de NMDA induz hipernocicepção mecânica com intensidade crescente em função do tempo, com pico de efeito na terceira hora pós-administração, de modo semelhante à prostaglandina E₂ (PGE₂) administrada por via intraplantar (i.pl.) (PARADA et al., 2003), verificamos se os perfis de desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo NMDA administrado nestes dois sítios

são semelhantes. Avaliamos a intensidade da hipernociceção mecânica 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a administração i.t. (dose de 80 ng) ou i.gl. (dose de 240 ng) do agonista, e comparamos seu desenvolvimento com o perfil da hipernociceção mecânica observada após administração i.pl. de PGE₂ (100 ng / pata). Os resultados mostraram perfis de desenvolvimento da hipernociceção bastante semelhantes nos três casos, com picos de intensidade na terceira hora, caindo a partir da quarta hora. Esse dado foi levado em consideração em nossos próximos experimentos, nos quais a hipernociceção induzida tanto pela PGE₂ quanto pelo NMDA (i.t. ou i.gl.) foi avaliada sempre na terceira hora (**figura 4.1b**).

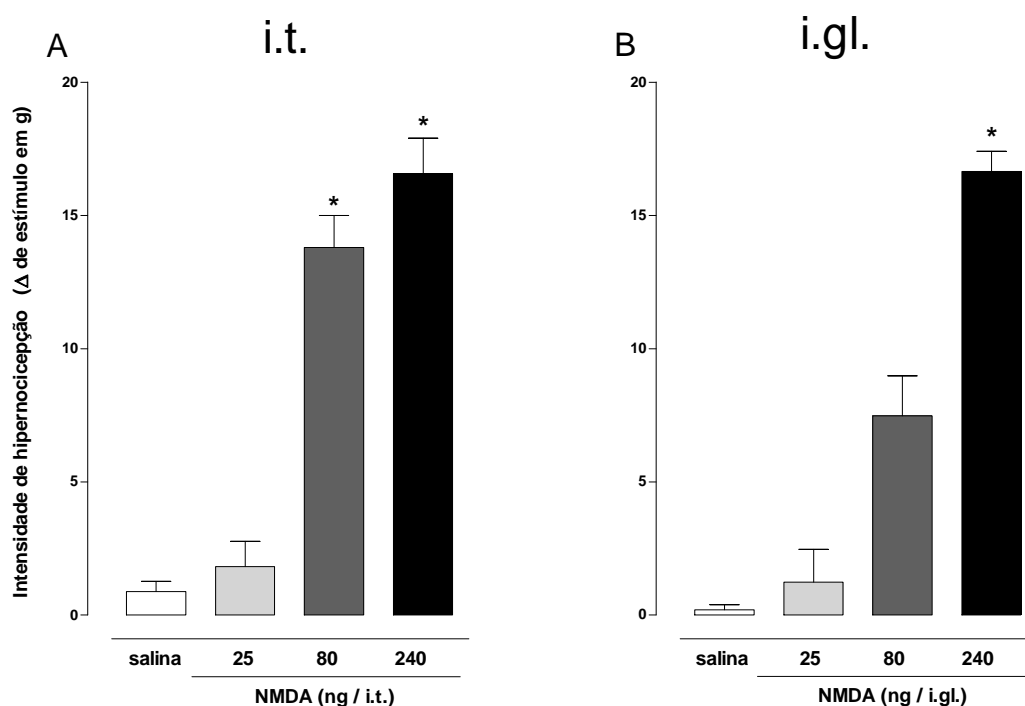


Figura 4.1a: Efeito hipernociceptivo do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (painel A) ou intraganglionar (i.gl.) (painel B). O NMDA foi administrado em doses crescentes (25, 80 e 240 ng) por via i.t. (**painel A**) ou i.gl. (**painel B**). A intensidade da hipernociceção mecânica foi avaliada na terceira hora após a administração pelo método de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina e 25 ng (**painel A**) e em relação aos grupos salina, 25 e 80 ng (**painel B**) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

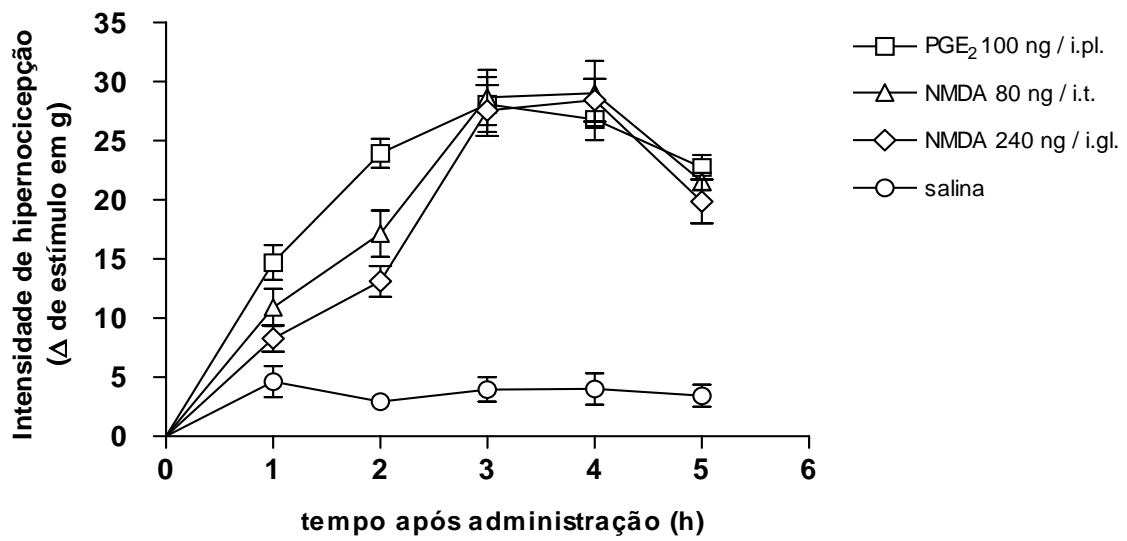


Figura 4.1b: Curva tempo-resposta da hipernociceção induzida pela administração de prostaglandina E₂ (PGE₂) por via intraplantar (i.pl.) (□) e do NMDA administrado por via intratecal (i.t.) (Δ) ou intraganglionar (i.gl.) (◇). A hipernociceção foi induzida pela administração i.pl. de PGE₂ na dose de 100 ng ou pela administração de NMDA na dose de 80 ng por via i.t. ou 240 ng por via i.gl.. A intensidade da hipernociceção mecânica foi avaliada até a quinta hora após a administração das drogas pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos □, Δ, ◇ e ○ representam a média ± epm de 5 animais por grupo.

4.2 Efeito do pré-tratamento intraperitoneal (i.p.) ou intratecal (i.t.) com indometacina sobre a hipernociceção mecânica induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.

Uma vez que o NMDA administrado tanto por via i.t. quanto por via i.gl. induz hipernociceção semelhante à induzida pela PGE₂, levantamos a hipótese de que tal efeito ocorreria devido à liberação de prostaglandinas estimulada pelo NMDA. Para testarmos essa possibilidade, verificamos se haveria alteração na hipernociceção mecânica induzida pelo NMDA i.gl. em animais pré-tratados com o inibidor não-seletivo das ciclooxigenases (COX) indometacina. A indometacina foi administrada por via intraperitoneal (5 mg / kg, i.p.) (**figura 4.2, painel A**). Porém, ao considerarmos a possibilidade da administração i.p. não atingir o GRD, optamos também pelo tratamento por via i.t. (100 µg / 10 µl) (**figura 4.2, painel B**). A hipernociceção mecânica foi avaliada na terceira hora e não foram observadas alterações na intensidade do efeito do NMDA pelo tratamento i.p. ou i.t. com indometacina. Este resultado nos sugere que a hipernociceção presente após a administração i.gl. de NMDA ocorre por ativação de receptores glutamatérgicos e não como efeito secundário à estimulação de liberação de prostaglandinas.

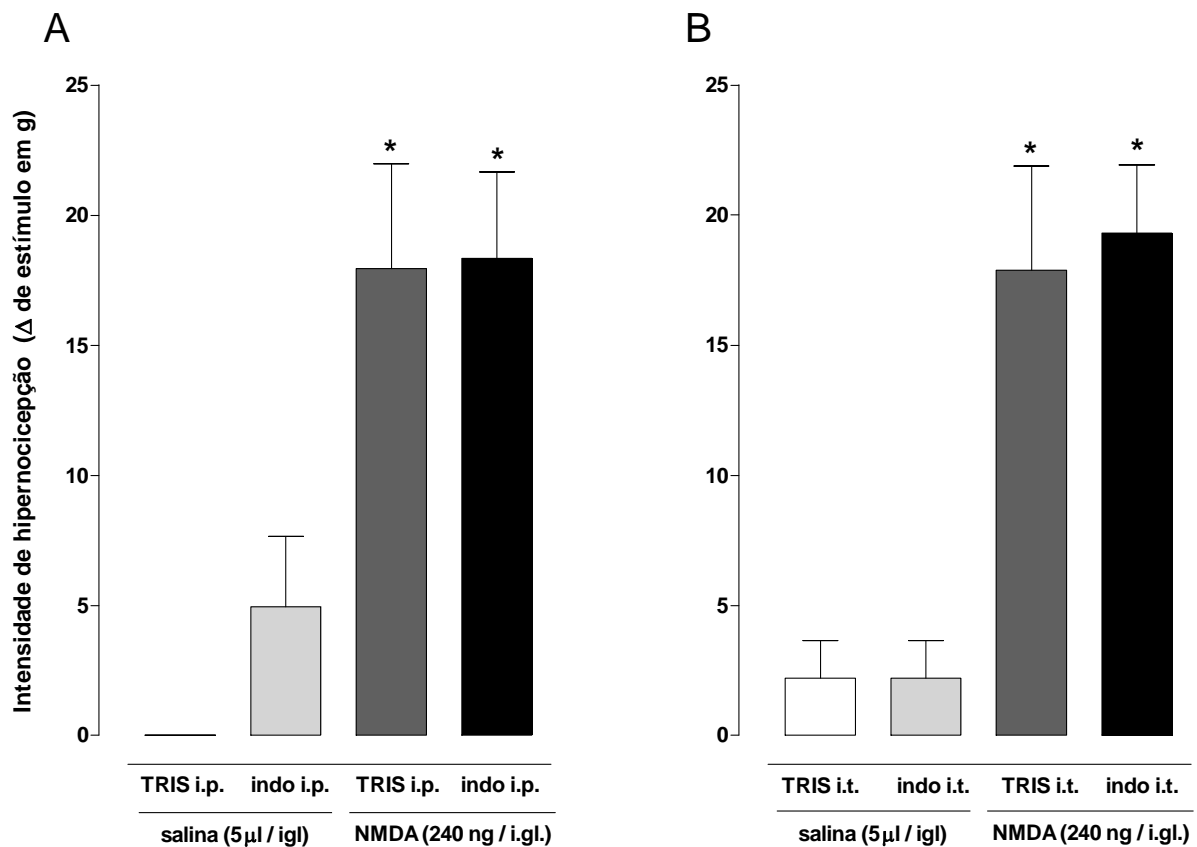


Figura 4.2: Efeito do pré-tratamento com indometacina sobre a hipernociceção induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA. A indometacina foi administrada por via intraperitoneal (5 mg / kg, i.p.) (**painel A**) ou i.t. (100 μg / 10 μl) (**painel B**). A hipernociceção mecânica foi avaliada na terceira hora após a administração i.gl. do NMDA (240 ng) pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos controle e indometacina isolada (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.3 Efeito do pré-tratamento intratecal (i.t.) com fluorocitrato sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA.

A literatura recente tem demonstrado a participação ativa de células da glia em vários processos celulares, inclusive na transmissão da informação nociceptiva (HANANI, 2005). Seria então importante determinar a eventual participação de tais células em nossos experimentos. Neste sentido, verificamos que o tratamento com a droga inibidora do metabolismo de células da glia fluorocitrato (1 nM, 10 µl, i.t.) 60 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (NMDA, 240 ng, i.gl.) não alterou de maneira significativa a intensidade de hipernocicepção mecânica, avaliada na terceira hora após o NMDA. Uma vez que drogas administradas por via i.t. atingem tanto os neurônios medulares quanto os GRDs (FERRARI, 2004), tal experimento nos serviu como controle para descartarmos a influência glial na hipernocicepção induzida pelo estímulo administrado por via i.gl. (**figura 4.3**).

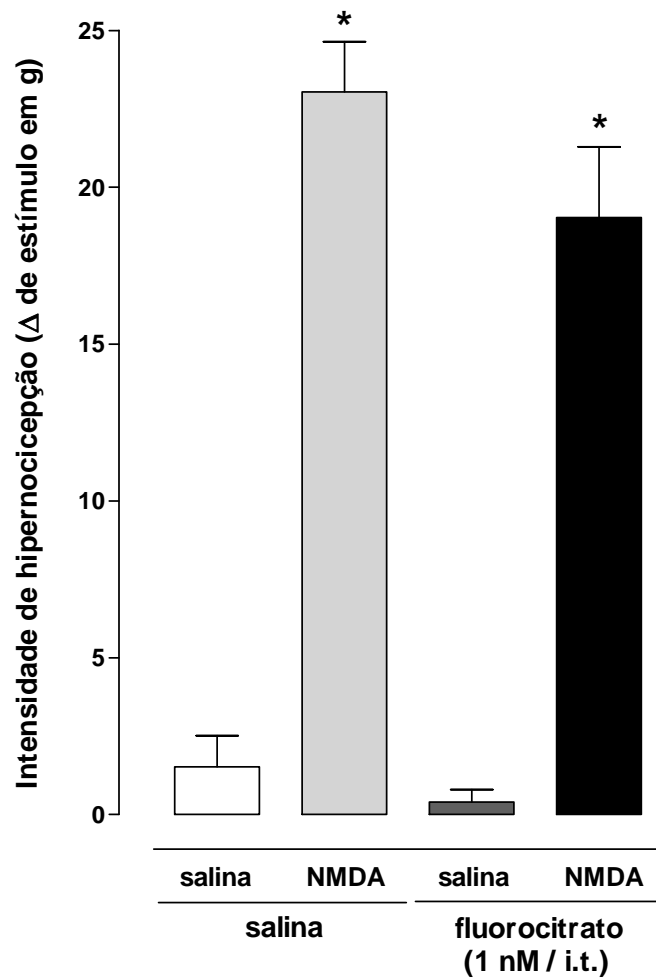


Figura 4.3: Efeito do pré-tratamento intratecal (i.t.) com fluorocitrato, droga inibidora do metabolismo de células da glia, sobre a hipernociceção induzida pela administração intraganglionar (i.gl.) de NMDA. O fluorocitrato (1 nM, 10 μ l, i.t.) foi administrado 1 hora antes da injeção i.gl. de NMDA (240 ng, 5 μ l). A hipernociceção mecânica foi avaliada três horas depois do estímulo pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos-controle (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.4 Avaliação do efeito antinociceptivo em relação à dose do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂) intraplantar (i.pl.) ou pelo NMDA intratecal (i.t.).

Embora dados prévios concernentes à sensibilização retrógrada tenham mostrado sua inibição por antagonistas de receptores NMDA administrados por via i.t. (FERREIRA; LORENZETTI, 1994), nossos resultados recentes sugerem que tal processo pode estar ocorrendo no GRD (ver **figura 4.1a**). Desta forma, seguindo o mesmo protocolo, porém administrando doses crescentes do antagonista competitivo de NMDARs D-AP-5 (1, 3 e 9 µg, diluído em solução salina), diretamente no GRD, verificamos a inibição significativa da hipernocicepção induzida tanto pela PGE₂ i.pl. (100 ng) (**figura 4.4, painel A**) quanto pelo NMDA i.t. (80 ng) (**figura 4.4, painel B**). As doses de 3 e 9 µg de D-AP-5 foram eficazes em diminuir a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl., sendo que não houve diferença significativa entre a inibição causada pelas duas doses (**figura 4.4, painel A**). Entretanto, apenas a dose de 9 µg de D-AP-5 foi eficaz em inibir a hipernocicepção induzida pela NMDA i.t. (**figura 4.4, painel B**).

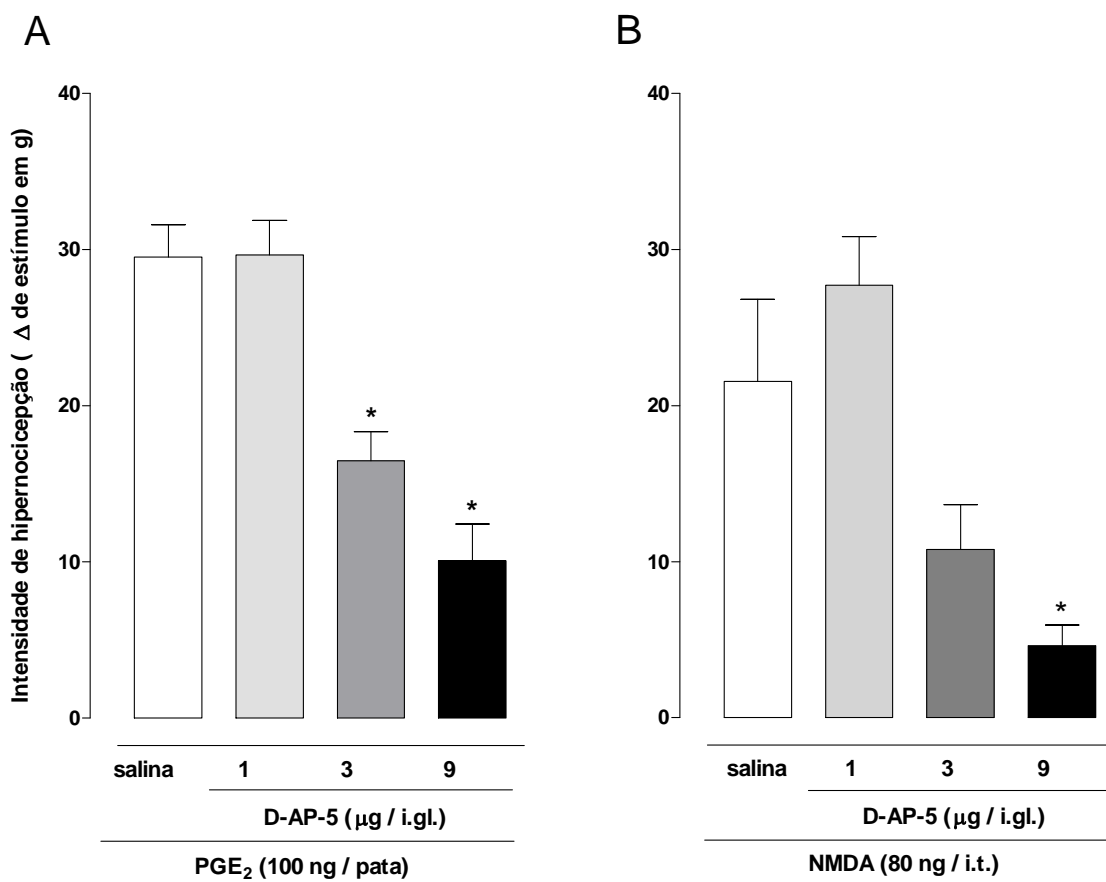


Figura 4.4: Efeito antinociceptivo do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernociceção induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE₂ (painel A) ou intratecal (i.t.) de NMDA (painel B). A hipernociceção foi induzida pela administração de PGE₂ (100 ng, i.pl.) (painel A) ou NMDA (80 ng, i.t.) (painel B). O D-AP-5 (1, 3 ou 9 μg, i.gl.) foi administrado 60 minutos antes da avaliação final do limiar de hipernociceção mecânica, que ocorreu na terceira hora após o estímulo inflamatório, pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle e 1 μg (painel A) e p<0,001 em relação aos grupos controle, 1 μg e 3 μg (painel B) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.5 Avaliação do tempo de ação do D-AP-5 administrado por via intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Para verificarmos a duração do efeito antinociceptivo do antagonista de NMDARs D-AP-5 sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ administrada por via i.pl. (**figura 4.4, painel A**), acompanhamos sua ação tanto após a administração i.t. quanto i.gl.. A PGE₂ (100 ng) induziu hipernocicepção com pico de intensidade na terceira hora. O tratamento com D-AP-5 por via i.t. (9 µg, **figura 4.5, painel A**) no mesmo momento da PGE₂ bloqueou a hipernocicepção até a segunda hora (grupo ♦, **figura 4.5, painel A**). Após esse tempo, os valores de sensibilidade à estimulação mecânica retornaram aos valores apresentados pelos animais tratados com salina (grupo ▼, **figura 4.5, painel A**). Entretanto, quando o tratamento com D-AP-5 foi realizado no gânglio da raiz dorsal (9 µg, i.gl., **figura 4.5, painel B**), ao mesmo tempo que a administração i.pl. de PGE₂, a intensidade de hipernocicepção induzida pela PGE₂ permaneceu baixa até a terceira hora (grupo ♦, **figura 4.5, painel B**), sendo que, na quarta hora, pareceu ter havido tendência em retornar aos valores apresentados pelo grupo que recebeu apenas salina ao invés de D-AP-5 (grupo ▼, **figura 4.5, painel B**).

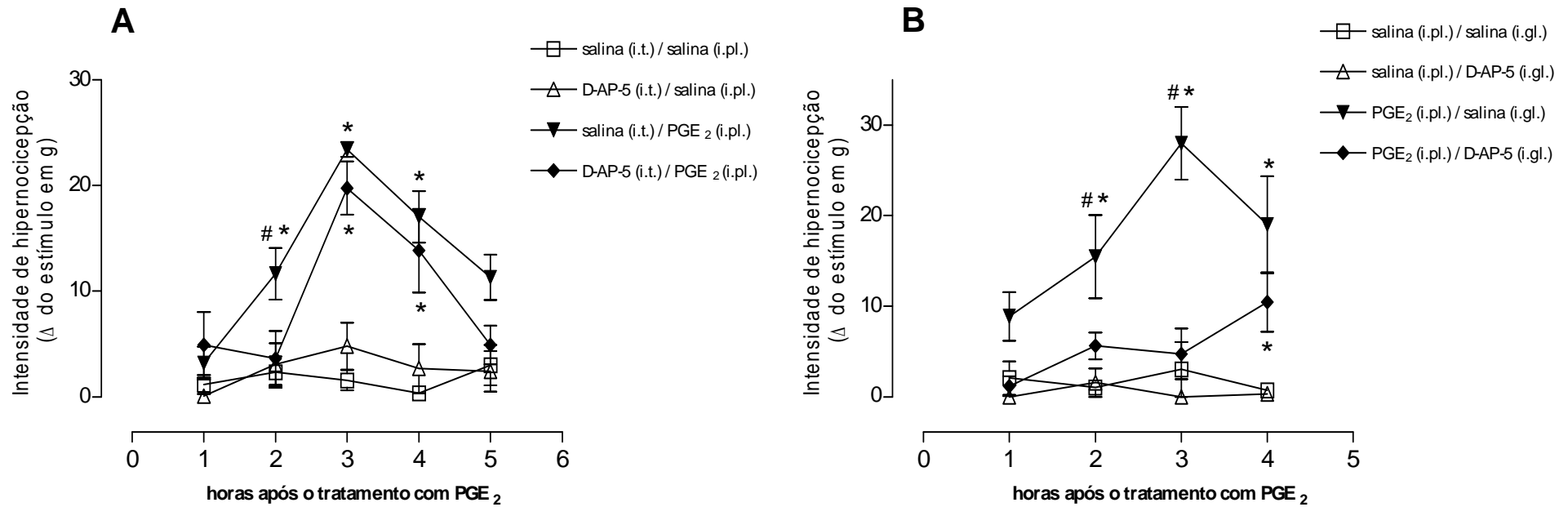


Figura 4.5: Efeito em função do tempo do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado por via intratecal (i.t., painel A) ou intraganglionar (i.gl., painel B) sobre a hipernociceção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂). A hipernociceção foi induzida pela administração i.pl. de PGE₂ (100 ng). O D-AP-5 (9 µg) foi administrado, por via i.t. (**painel A**) ou i.gl. (**painel B**), ao mesmo tempo que a PGE₂. O limiar de retirada de pata à estimulação mecânica foi avaliado na primeira, segunda, terceira e quarta hora após a injeção do estímulo inflamatório pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos □, Δ, ▼ e ◆ representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam p<0,001 em relação aos grupos □ e Δ; # indicam p<0,001 em relação aos grupos ◆ (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.6 Avaliação do efeito em função do tempo do pré-tratamento intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) com D-AP-5 sobre a hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE₂.

Uma vez que o tratamento com o antagonista de NMDARs D-AP-5, tanto por via i.t. quanto por via i.gl., administrado ao mesmo tempo (ver **figura 4.5**) ou duas horas após a PGE₂ i.pl. (100 ng; ver **figura 4.4, painel A**), foi capaz de bloquear o andamento da hipernocicepção, avaliamos seu efeito quando administrado previamente (15 minutos) ao estímulo inflamatório. O pré-tratamento i.t. com D-AP-5 (**figura 4.6, grupo \diamond** , 9 μ g) bloqueou a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl. até a segunda hora. Entretanto, quando administrado por via i.gl., o D-AP-5 (**figura 4.6, grupo \blacklozenge** , 9 μ g) bloqueou a hipernocicepção até a terceira hora, tendo havido retorno da sensibilização aos valores apresentados pelo grupo salina(i.gl.) / PGE₂(i.pl.) (\circ) na quarta hora pós-estímulo. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos nos experimentos anteriores para avaliação do tempo de ação do D-AP-5. Além disso, sugerem que a ação hipernociceptiva da PGE₂ é dependente de receptores NMDA durante todo seu desenvolvimento, já que o antagonista usado é uma droga que exerce seu efeito por competição pelos NMDARs.

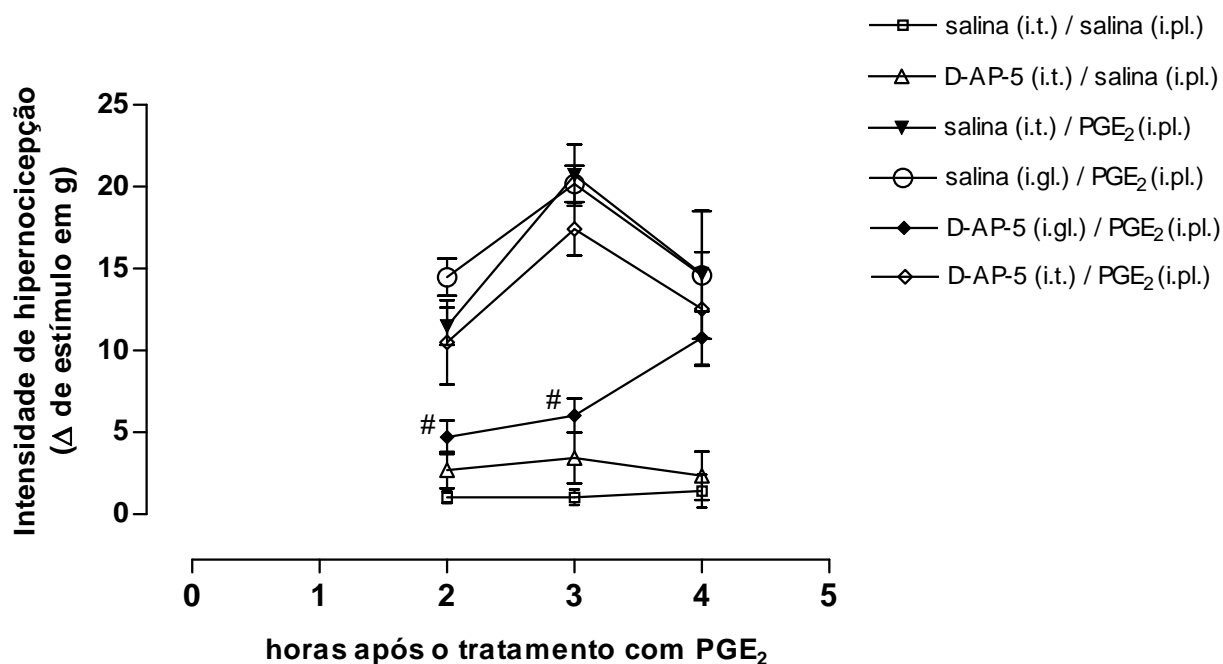


Figura 4.6: Efeito em função do tempo do pré-tratamento com o antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado via intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.) sobre a hipernociceção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂). A hipernociceção foi induzida pela administração de PGE₂ (100 ng, i.pl.). O D-AP-5 (9 µg) foi administrado 15 minutos antes da PGE₂ por via i.t. (grupo ◇) ou i.gl. (grupo ◆) e o limiar de retirada de pata à estimulação mecânica foi avaliado na segunda, terceira e quarta hora após o estímulo inflamatório pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos □, △, ▼, ○, ◆ e ◇ representam a média ± epm de 5 animais por grupo. # indicam p<0,001 em relação ao grupo ○ (salina(i.gl.) / PGE₂(i.pl.)) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.7 Ativação de receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal é responsável pela manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE₂ administrada na pata de ratos por via subcutânea, mas não por via intradérmica.

A administração subcutânea (s.c.), na planta da pata de ratos, de PGE₂ induz hipernocicepção com pico de intensidade na terceira hora (PARADA et al., 2003). De maneira diversa, a administração de PGE₂ na planta da pata, porém no tecido dérmico (i.d.), reduz o limiar de retirada de pata à estimulação mecânica com pico de intensidade atingido aos 15 minutos (PARADA et al., 2003). Com base nestes dados, e considerando que tanto o pré-tratamento (15 minutos) quanto o pós-tratamento (2 horas) com o antagonista de NMDARs D-AP-5 no GRD (9 µg) é capaz de bloquear a hipernocicepção induzida pela PGE₂ s.c., verificamos qual seria seu efeito sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂ administrada por via i.d.. Nossa suspeita era de que a curta duração do efeito da PGE₂ i.d. se deveria à falta de participação dos NMDARs durante seu desenvolvimento, ou seja, neste caso não haveria envolvimento do processo de sensibilização retrógrada. De fato, foi observada ausência de efeito do D-AP-5 na hipernocicepção induzida pela PGE₂ administrada na planta da pata por via i.d. (**figura 4.7, painel B**). Estes resultados sugerem fortemente que a liberação de GLU no GRD, atuando sobre NMDARs ganglionares, pode ser responsável pela manutenção do estado sensibilizado do neurônio aferente primário durante o desenvolvimento da hipernocicepção induzida pela PGE₂ s.c. (**figura 4.7, painel A**).

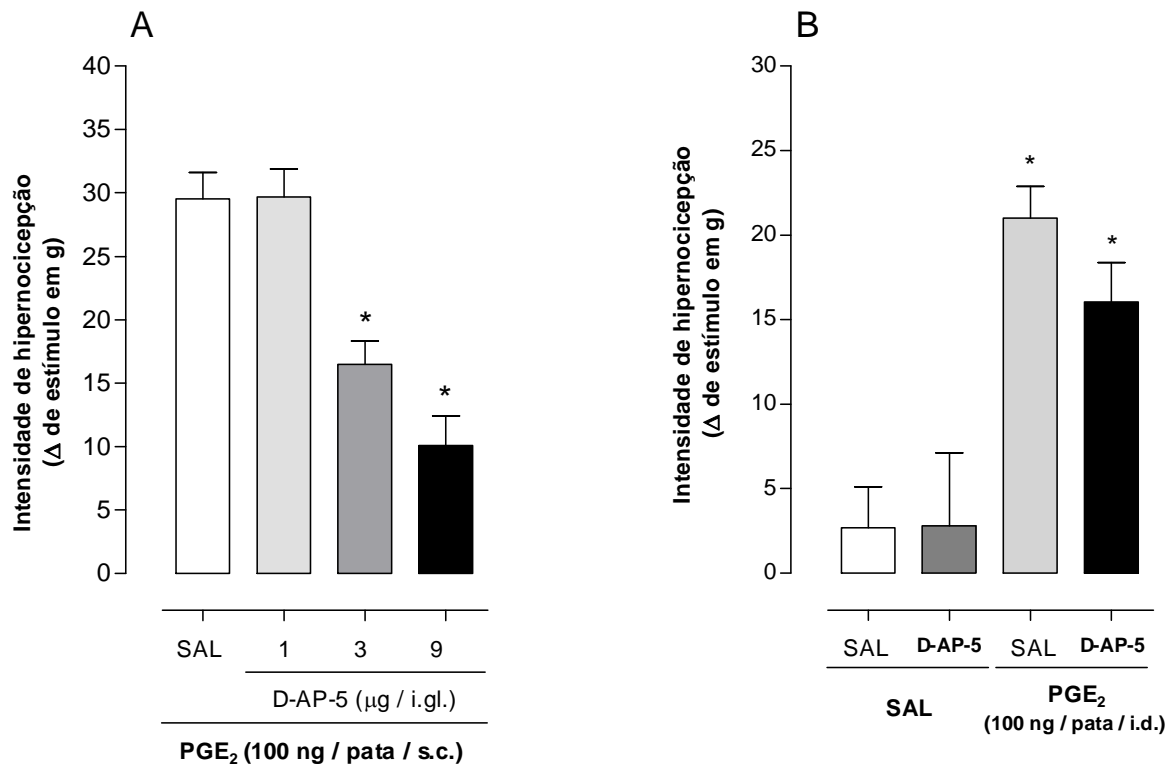


Figura 4.7: Efeito da administração intraganglionar (i.gl.) do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 sobre a hipernociceção induzida pela PGE₂ injetada na pata de ratos por via subcutânea (s.c., painel A) ou intradérmica (i.d., painel B). A hipernociceção foi induzida pela administração, na pata dos animais, por via subcutânea (s.c., **painel A**) ou intradérmica (i.d., **painel B**) de PGE₂ (100 ng). Em (**A**): dose-resposta (1, 3 e 9 μg) de D-AP-5 i.gl.. Em (**B**): efeito da dose de 9 μg de D-AP-5 sobre a PGE₂ i.d.. O D-AP-5 foi administrado no GRD 1 hora antes da medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica, realizada na terceira hora (**painel A**) ou aos 15 minutos (**painel B**) após a administração de PGE₂, no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam p<0,05 em relação aos grupos-controle (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.8 A administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), de AMPA induz hipernocicepção mecânica na pata de ratos.

Está bem estabelecido na literatura que a transmissão da informação nociceptiva se dá pela liberação de GLU pelo neurônio aferente primário (REN et al., 1992; YAMAMOTO; YAKSH, 1992), que ativa receptores pós-sinápticos presentes nos neurônios secundários, dando continuidade à transmissão do estímulo. Mais ainda, considera-se que a sensibilização dos neurônios primários leva a alterações nesse mecanismo de transmissão. Enquanto na dor aguda seriam ativados receptores do tipo AMPA (a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) pós-sinápticos, a transmissão da dor durante a hipernocicepção inflamatória ocorreria pela ativação de NMDARs pós-sinápticos (MURRAY et al., 1991). Em nosso estudo sugerimos que, além da possibilidade da transmissão da informação hipernociceptiva ocorrer por ativação de NMDARs pós-sinápticos, NMDARs presentes no GRD também participariam do fenômeno de sensibilização dos neurônios periféricos. Neste sentido, aparentemente estes receptores seriam justamente os responsáveis pela manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE₂ administrada por via subcutânea (ver dados anteriores). Contudo, uma vez que não existem demonstrações da participação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA presentes no GRD na sensibilização periférica, achamos conveniente verificarmos o possível envolvimento destes na hipernocicepção de origem inflamatória, já que a PGE₂ pode induzir liberação de GLU no GRD ativando, em adição aos NMDARs, receptores AMPA ganglionares. Desse modo observamos que a administração de AMPA por via i.t., mas não i.gl. (40 ng, [dose baseada em (FERREIRA; LORENZETTI, 1994)], **figura 4.8a**), induziu hipernocicepção mecânica. Isso sugere que não há receptores AMPA no GRD envolvidos na hipernocicepção. Do mesmo modo, a administração i.pl. de PGE₂ induziu hipernocicepção que não foi inibida pela administração i.gl. do antagonista de receptores AMPA DNQX (40 ng, **figura 4.8b**). Entretanto, a administração de DNQX por via i.t. inibiu de maneira significativa a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl., sugerindo que apenas receptores AMPA pós-sinápticos seriam ativados durante a transmissão da informação hipernociceptiva produzida pela injeção de PGE₂.

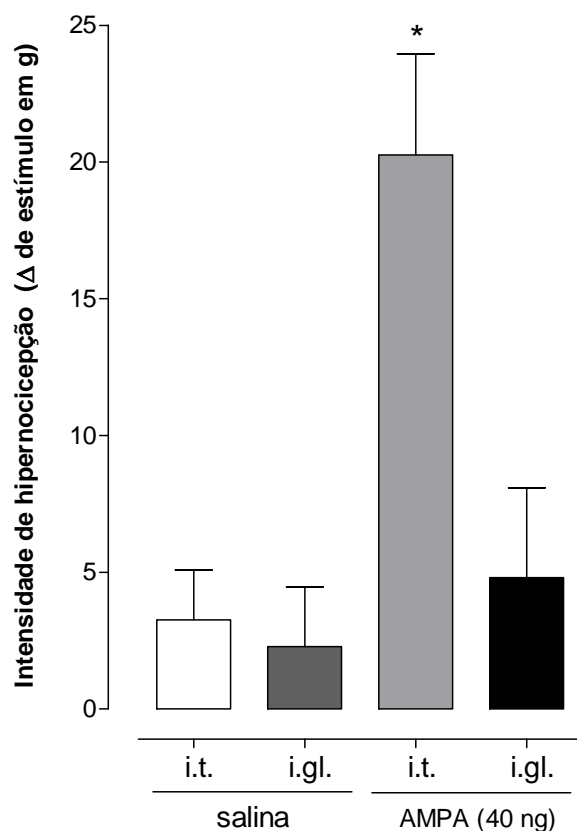


Figura 4.8a: Indução de hipernociceção pela administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), do agonista de receptores AMPA. A administração de AMPA (40 ng) foi feita por via i.t. ou i.gl. e, a medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica, realizada três horas após no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. * indica $p < 0,05$ em relação aos grupos-controle (salina i.t. e salina i.gl.) e AMPA i.gl. (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

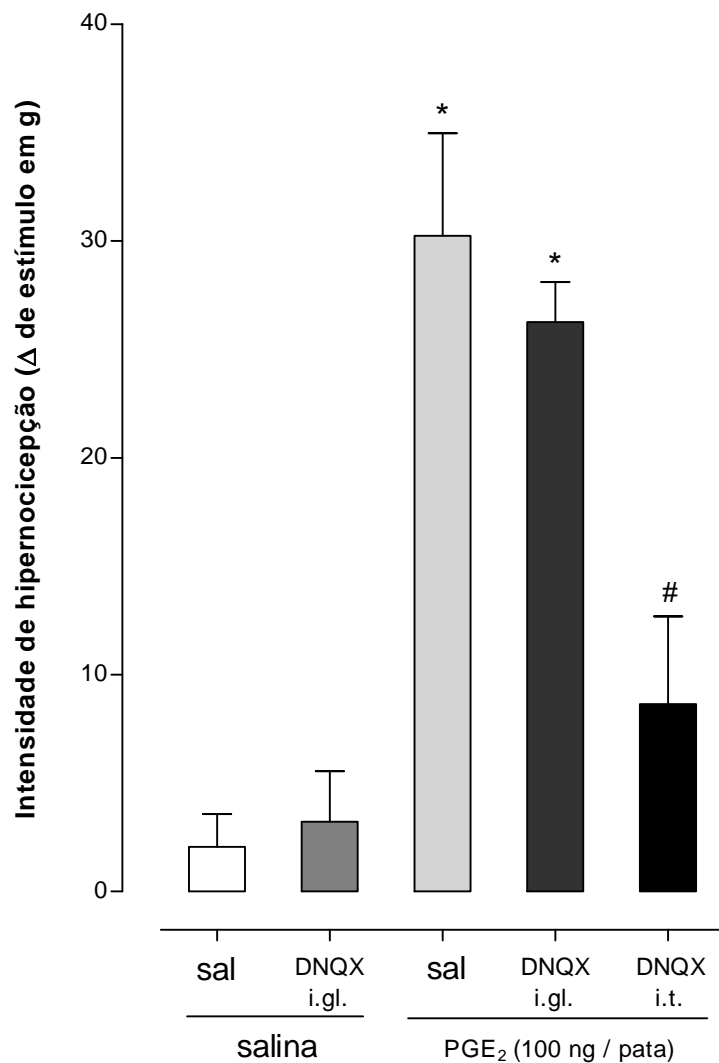


Figura 4.8b: Bloqueio pela administração intratecal (i.t.), mas não intraganglionar (i.gl.), do antagonista de receptores AMPA DNQX da hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE₂. O DNQX (10 nmol) foi administrado por via i.t. ou i.gl. 1 hora antes da medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica, a qual foi realizada na terceira hora após a administração i.pl. de PGE₂ (100 ng), no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam $p < 0,05$ em relação aos grupos-controle (sal+salina e salina+DNQX i.gl.) e PGE₂+DNQX i.t.; # indica $p < 0,001$ em relação ao grupo PGE₂+salina (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.9 Determinação das subunidades de receptores NMDA (NMDARs) presentes nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) L4, L5 e L6 de ratos.

Para determinarmos quais subunidades estruturais de NMDARs são expressas nos neurônios periféricos a fim de, posteriormente, verificarmos qual(is) é(são) a(s) mais importante(s) durante a sensibilização neuronal, removemos GRDs L4, L5 e L6 de ratos Wistar e, após homogeneização, submetemos o material ao protocolo de PCR em tempo real. Como base para detecção de cada subunidade, utilizamos *primers* desenhados especificamente para cada estrutura. Após amplificação da expressão das mesmas (ver MATERIAL E MÉTODOS, item 3.4, seções “3.4.2 Extração do RNA e preparo do cDNA” e “3.4.3 Reações de *real time*-PCR”), pudemos avaliar quais delas estão presentes nestes GRDs. Os resultados mostraram que todas as subunidades podem ser expressas neste tecido (**figura 4.9, painel B**). Entretanto, a quantificação diferencial de cada subtipo não foi possível por esta técnica, já que a amplificação para detecção da expressão é dependente da qualidade do *primer* desenhado. Mesmo assim, a efetividade dos *primers* foi verificada, como confirmado pelo controle positivo realizado em tecido recolhido do cerebelo de ratos da mesma espécie, considerado expressar todas as subunidades estruturais de NMDARs (**figura 4.9, painel A**). Esses *primers* serão utilizados em experimento posterior para confirmarmos a diminuição de expressão destas subunidades após tratamento com oligodeoxinucleotídeos-antisenses (ODN-AS) específicos para cada subunidade de NMDAR seguido de experimentos comportamentais.

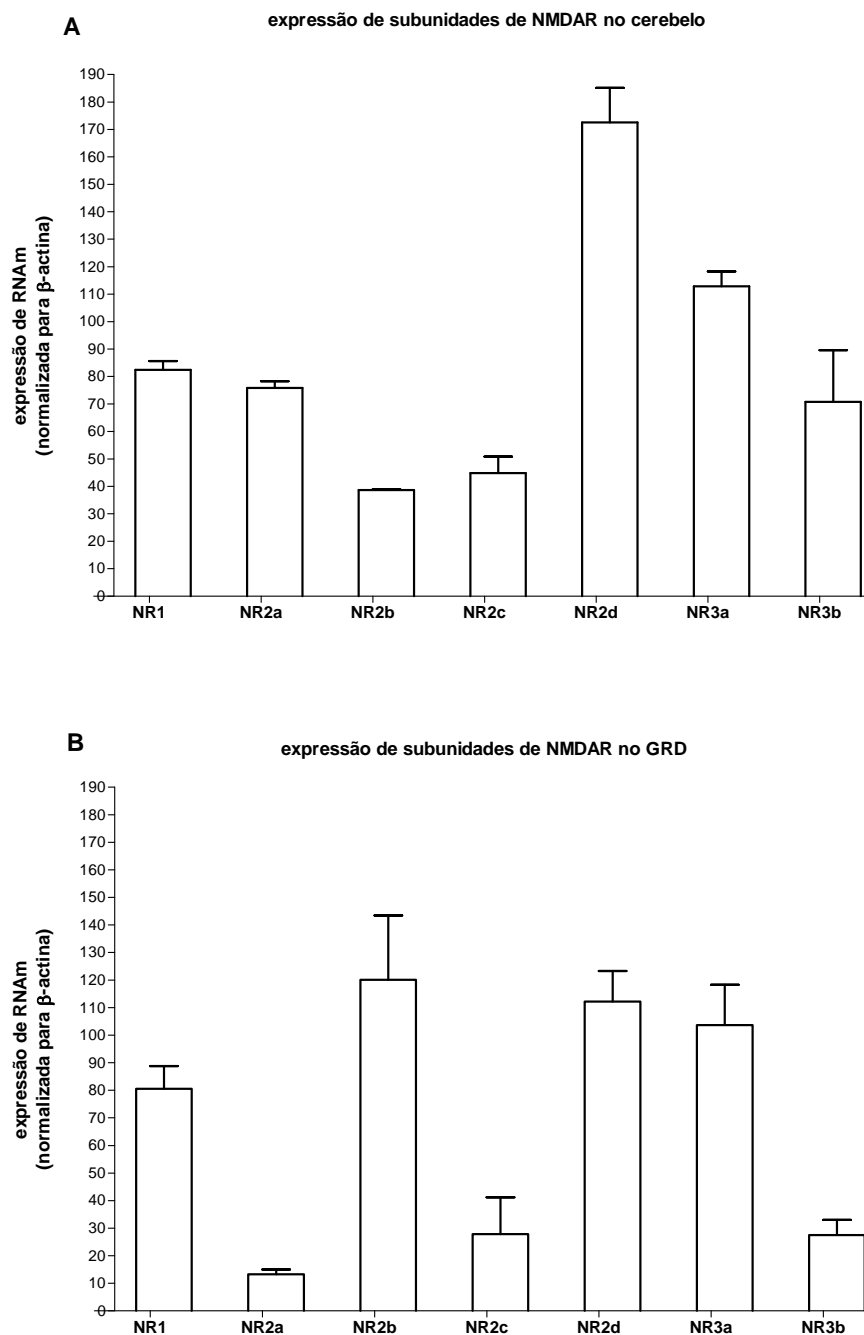


Figura 4.9: Expressão de RNAm para subunidades de receptores NMDA no cerebelo (painel A) e nos gânglios das raízes dorsais L4, L5 e L6 (painel B) de ratos Wistar. O painel A mostra a expressão de RNAm para as subunidades de NMDARs no cerebelo. O painel B mostra a expressão de RNAm para estas subunidades nos GRDs: os GRDs L4, L5 e L6 de 12 ratos foram cirurgicamente removidos e, a partir do RNAm extraído, os cDNAs foram preparados e processados pelo método de PCR em tempo real, para amplificação das subunidades estruturais de NMDARs com base nos *primers* previamente confeccionados. A expressão dos RNAm relacionados a cada subunidade foi normalizada com base na amplificação de beta-actina, usada como controle positivo.

4.10 Avaliação da intensidade da hipernocicepção mecânica induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE₂ após *knock down* das subunidades de NMDARs.

Para avaliarmos a relevância individual de cada subunidade de NMDAR na hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl. (100 ng), depletamos temporariamente, por meio da administração de ODN-AS específicos, cada uma das subunidades, submetendo os animais, em seguida, ao teste de pressão crescente na pata (von Frey eletrônico). Os ODN-AS foram administrados, durante 5 dias (20 µg, 5 µl), diretamente no GRD L5, de modo a induzirmos o *knock down* (bloqueio da expressão das estruturas) apenas nos neurônios periféricos. No quinto dia, administramos PGE₂ na pata dos animais, avaliando, na terceira hora, a hipernocicepção mecânica. Verificamos que os animais tratados com ODN-AS contra as subunidades NR1, NR2b, NR2d e NR3a, apresentaram diminuição significativa da hipernocicepção, ao contrário dos animais que tiveram as outras subunidades depletadas (NR2a, NR2c e NR3b). A intensidade de hipernocicepção nos animais tratados com ODN-AS contra as subunidades NR1 e NR2b foi menor que nos animais que tiveram as subunidades NR2d e NR3a depletadas, embora todos estes resultados tenham sido estatisticamente significantes em relação aos grupos-controle (MISMATCH – MS) (**figura 4.10, painel A**).

Logo após os testes comportamentais, os GRDs-L5 (onde foram administrados os ODN-AS) foram removidos e preparados para processamento no PCR em tempo real para confirmação da depleção das respectivas subunidades de NMDARs. Todos esses controles mostraram efetividade dos ODN-AS em interromper a expressão das referidas estruturas (**figura 4.10, painel B**).

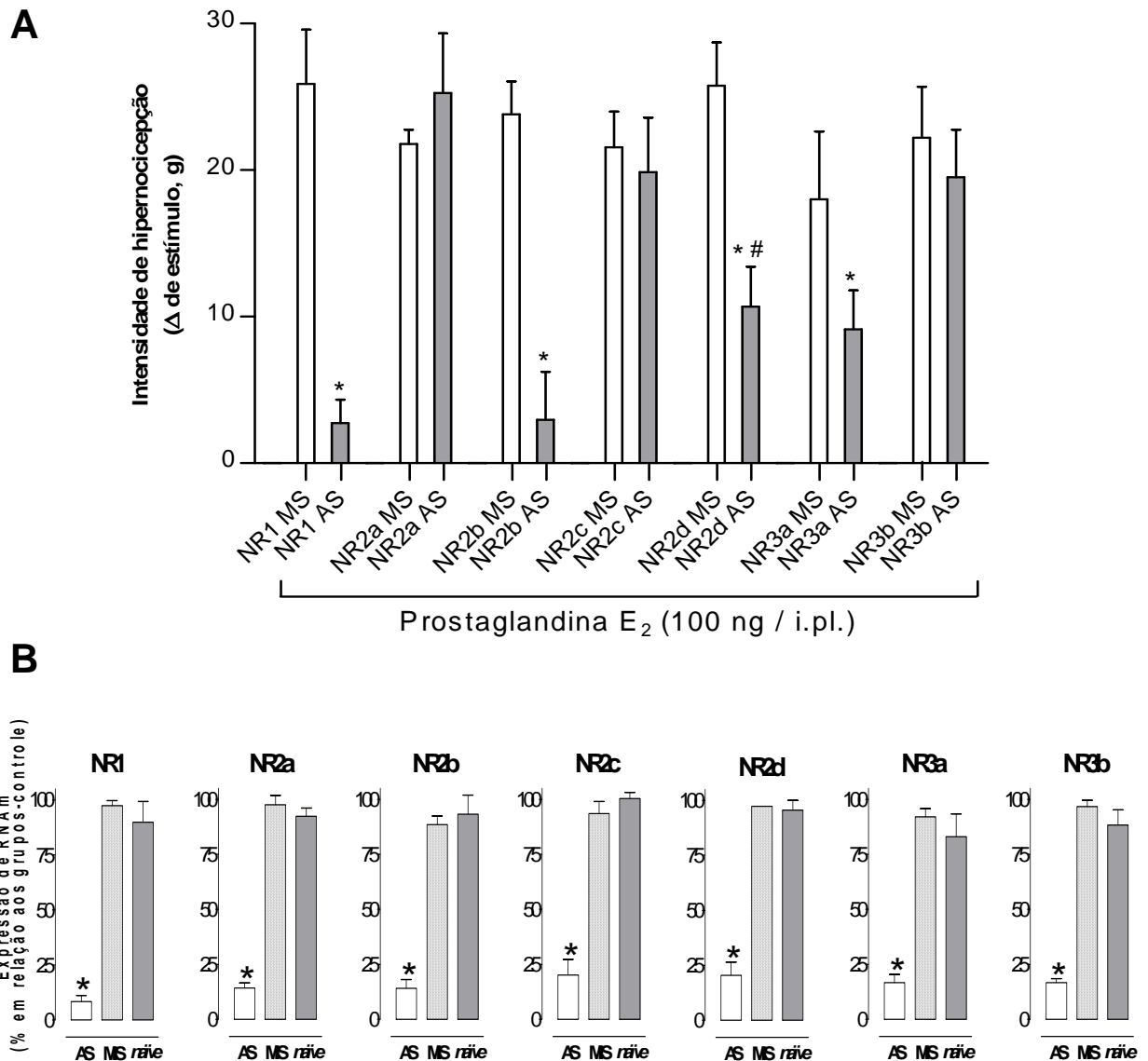


Figura 4.10. PAINEL A: Hipernocicepção mecânica induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de PGE₂ após *knock down* das subunidades estruturais de NMDARs. ODN-AS contra a expressão de cada subunidade de NMDAR foram administrados durante 5 dias por via i.g.l. (20 µg, 5 µl). No quinto dia foi administrada PGE₂ por via i.pl. (100 ng) e, após três horas, avaliou-se a hipernocicepção mecânica pelo método de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam p<0,001 em relação aos grupos MISMATCH (controle) (MS – barras brancas); # indica p<0,001 em relação aos grupos NR1 AS, NR2b AS e NR3a AS (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni). **PAINEL B:** Expressão de RNAm para as subunidades de NMDARs nos GRDs-L5 de animais *naïve* ou tratados com mismatch (MIS) ou ODN-AS por via intraganglionar (i.g.l.). Os animais foram tratados por via i.g.l. (20 µg, 5 µl), durante 5 dias, com mismatch (MIS) ou ODN-AS específicos para cada subunidade de NMDAR. A análise da expressão de RNAm foi realizada pelo método de PCR em tempo real para confirmar a efetividade do tratamento com ODN-AS dos animais submetidos ao teste comportamental. As barras representam a média ± epm dos dados obtidos de GRDs-L5 de 5 animais / grupo e expressam as quantidades de RNAm (%) em relação aos grupos-controle (* indicam p<0,001 em relação aos grupos MIS e *naïve*), sendo normalizadas pela expressão de β-actina (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.11 O cálcio (Ca^{+2}) intracelular local parece ser importante para o início, mas não para a manutenção, da hipernocicepção induzida pela PGE_2 intraplantar (i.pl.).

Os receptores para GLU do tipo NMDA (NMDARs) são do tipo ionotrópico, ou seja, diretamente acoplados a canais iônicos (LI et al., 2004). Esses canais associados aos NMDARs possuem certa seletividade para o íon cálcio (Ca^{+2}), de modo que, quando ativados durante a hipernocicepção, permitem sua passagem, aumentando os níveis intracelulares de Ca^{+2} nos neurônios. Neste estudo temos verificado que esses receptores parecem ser importantes para a manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE_2 i.pl., e nossa primeira hipótese sugeria que o aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular proporcionado pela ativação dos NMDARs poderia participar desse efeito. Para verificarmos a relevância dos níveis intracelulares de Ca^{+2} , tanto no início quanto na manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE_2 , utilizamos o quelante de Ca^{+2} intracelular BAPTA, administrado no mesmo sítio do estímulo inflamatório (PGE_2). Os resultados mostraram que o Ca^{+2} intracelular presente no local do estímulo é importante para o início do processo que levará à hipernocicepção mecânica, já que o pré-tratamento com BAPTA (10 mM, 1 hora antes, **figura 4.11, painel A**) bloqueou a hipernocicepção induzida pela PGE_2 i.pl.. Entretanto, o pós-tratamento com BAPTA (10 mM, 2 horas após, **figura 4.11, painel B**) não teve efeito sobre a hipernocicepção induzida pela PGE_2 . Embora esses dados mostrem que durante o andamento da hipernocicepção o Ca^{+2} local não seja importante, sendo útil apenas para o início do processo, tais dados não descartam a possibilidade de que o Ca^{+2} intracelular esteja sendo importante em outro local do neurônio, como, por exemplo, no gânglio da raiz dorsal.

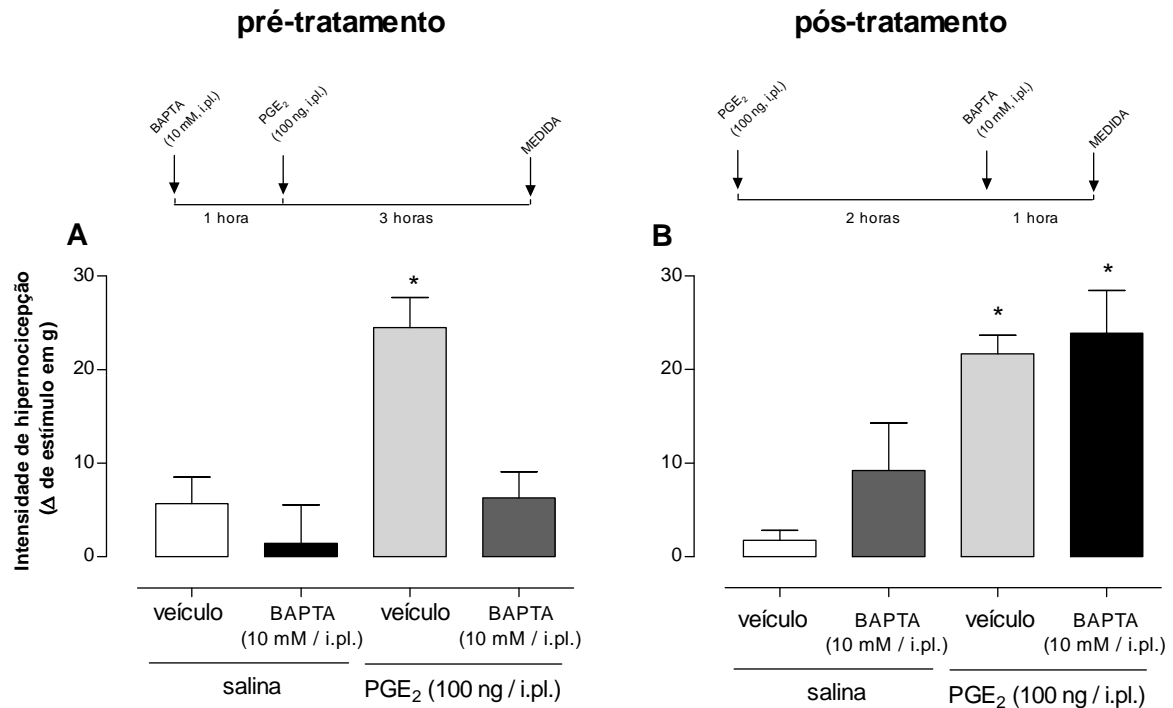


Figura 4.11: Bloqueio da hipernociceção, induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de PGE₂, pela administração local do quelante de cálcio intracelular BAPTA. A hipernociceção foi induzida pela administração i.pl. de PGE₂ (100 ng). O BAPTA (10 mM, i.pl.) foi administrado 1 hora antes (**painel A**) ou 2 horas após (**painel B**) a PGE₂. A medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica foi realizada na terceira hora após a administração do estímulo inflamatório no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indicam p<0,05 em relação aos grupos-controle (salina+veículo e salina+BAPTA) (**painéis A e B**) e ao grupo PGE₂+BAPTA (apenas no **painel A**) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.12 Liberação de cálcio (Ca^{+2}) de estoques intracelulares à distância parece ser importante para a manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE_2 intraplantar (i.pl.).

Nossa hipótese sugere que a manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE_2 i.pl. seria dependente da liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares em locais distintos do local do estímulo, o que poderia explicar a sensibilização do neurônio como um todo. Considerando que os receptores do tipo rianodine participam do processo de liberação de Ca^{+2} intracelular e, provavelmente, do fenômeno das ondas de Ca^{+2} , verificamos se o seu bloqueio no GRD teria influência sobre o efeito produzido pela PGE_2 injetada na pata dos animais. Os dados obtidos mostraram que a administração i.gl. do antagonista de receptores rianodine dantrolene (70 nM, **figura 4.12, painel A**) ou do quelante de Ca^{+2} BAPTA (10 mM, **figura 4.12, painel B**) bloqueou de maneira significativa a hipernocicepção induzida pela PGE_2 administrada na pata.

Esse fato está de acordo com nossa hipótese de que a PGE_2 atua via indução da CICR, ou ondas de Ca^{+2} . Mais ainda, uma vez que nossas hipóteses incluem a possível participação dos NMDARs ganglionares na ativação da CICR, nosso passo seguinte foi verificar se o dantrolene seria capaz de inibir a hipernocicepção induzida pela administração i.t. de NMDA, a qual, de acordo com dados anteriores, se assemelha em muito à hipernocicepção induzida pela PGE_2 . Os resultados mostraram que o dantrolene também inibiu a hipernocicepção induzida pelo NMDA (**figura 4.12, painel C**), de modo que podemos sugerir que o aumento nos níveis de Ca^{+2} intracelular proporcionado pela ativação dos NMDARs ganglionares pode ativar receptores rianodine, e iniciar as ondas de Ca^{+2} que sensibilizarão o neurônio aferente primário por inteiro.

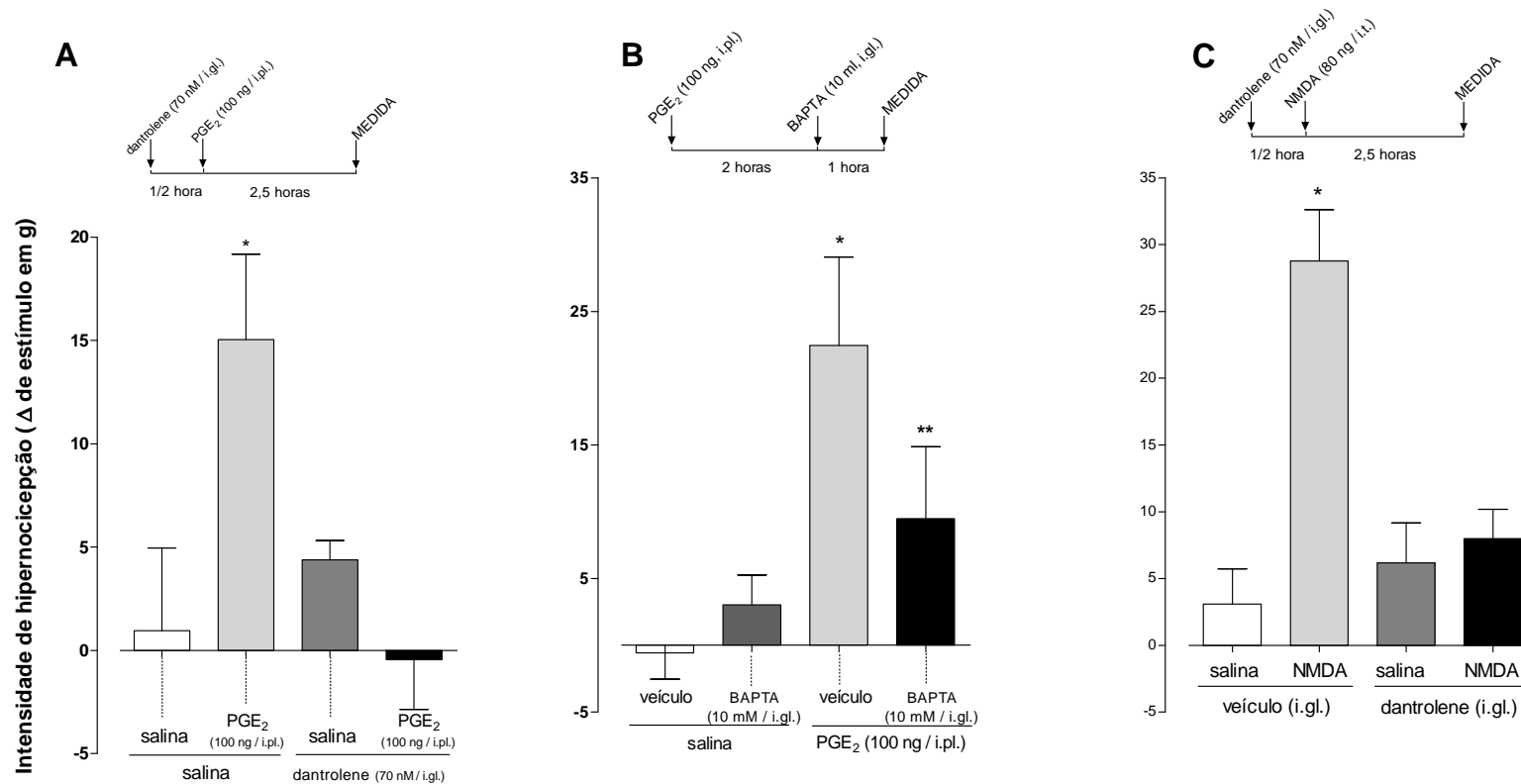


Figura 4.12: Bloqueio da hipernociceção, induzida por injeção intraplantar (i.pl.) de PGE₂ (painéis A e Painel B) ou por injeção intratecal (i.t.) de NMDA (painel C), pela administração intraganglionar (i.gl.) do antagonista de receptores rianodine dantrolene (painéis A e C) ou do quelante de Ca⁺² BAPTA (painel B). A hipernociceção foi induzida pela administração i.pl. de PGE₂ (100 ng, **painéis A e B**) ou i.t. de NMDA (80 ng, **painel C**). O dantrolene (70 nM) foi administrado 30 minutos antes e, o BAPTA (10 mM), 2 horas após, o estímulo inflamatório, por via i.gl.. A medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica foi realizada na terceira hora no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indica p<0,05 em relação aos grupos salina+salina, salina+dantrolene e PGE₂+dantrolene; **Painel B:** * indica p<0,05 em relação aos grupos salina+veículo e salina+BAPTA; ** indica p<0,05 em relação ao grupo PGE₂+veículo; **Painel C:** * indica p<0,05 em relação aos grupos salina+veículo, dantrolene+salina e dantrolene+NMDA (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.13 Verificação do efeito do NMDA sobre neurônios do gânglio da raiz dorsal *in vitro*.

Tanto os nossos experimentos comportamentais como experimentos previamente publicados demonstram que o NMDA pode sensibilizar os neurônios aferentes primários (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; 1994). Entretanto, os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não estão completamente elucidados. Considerando que os NMDARs são canais com relativa seletividade ao íon Ca^{+2} , uma das explicações propostas para seu mecanismo hipernociceptivo é relacionada à possível indução de processos celulares envolvendo o disparo do fenômeno de ondas de Ca^{+2} após ativação desses receptores. A microscopia confocal possibilita a observação de fenômenos celulares por meio da visualização de fluorescência ativada pelo influxo celular de Ca^{+2} . Uma vez dentro da célula, um marcador previamente administrado à cultura fluoresce quando há aumento nos níveis intracelulares desse íon. Dessa forma, nosso próximo passo foi verificar *in vitro*, por meio de microscopia confocal, o efeito da administração direta do agonista de NMDARs sobre células do gânglio da raiz dorsal (**figuras 4.13a e 4.13b**), ou seja, neurônios (**figura 4.13a, painéis A e B**) e células satélites (**figura 4.13a, painéis C e D**).

Tanto no caso dos neurônios (**figura 4.13a, painel B e figura 13b, painel A**) quanto das células satélites (**figura 4.13a, painel D e figura 13b, painel B**), verificamos que a aplicação de NMDA (250 μM) causou aumento na fluorescência, indicando aumento nos níveis de Ca^{+2} intracelular. Interessantemente, a aplicação do NMDA induziu, ainda, a ativação repetida de alguns dos neurônios (**figura 4.13b, painel A, traçados preto e azul**). Entretanto, nem todos os neurônios responderam do mesmo modo, embora os experimentos tenham sido realizados em culturas feitas em condições idênticas. Apesar disso, e considerando que as respostas são agrupadas por cultura, pudemos verificar que o NMDA de fato causa influxo de Ca^{+2} nas células neuronais – o que pode levar à ativação de mecanismos bioquímicos e de segundos-mensageiros intracelulares.

Em relação à resposta apresentada pelas células satélites (**figura 4.13b, painel B**), também observamos aumento da fluorescência após a aplicação de NMDA (250 μM). O fato destas células também responderem ao NMDA sugere a possibilidade de sua participação em processos que influenciam o comportamento dos neurônios, inclusive na sensibilização neuronal observada durante a hipernocicepção retrógrada.

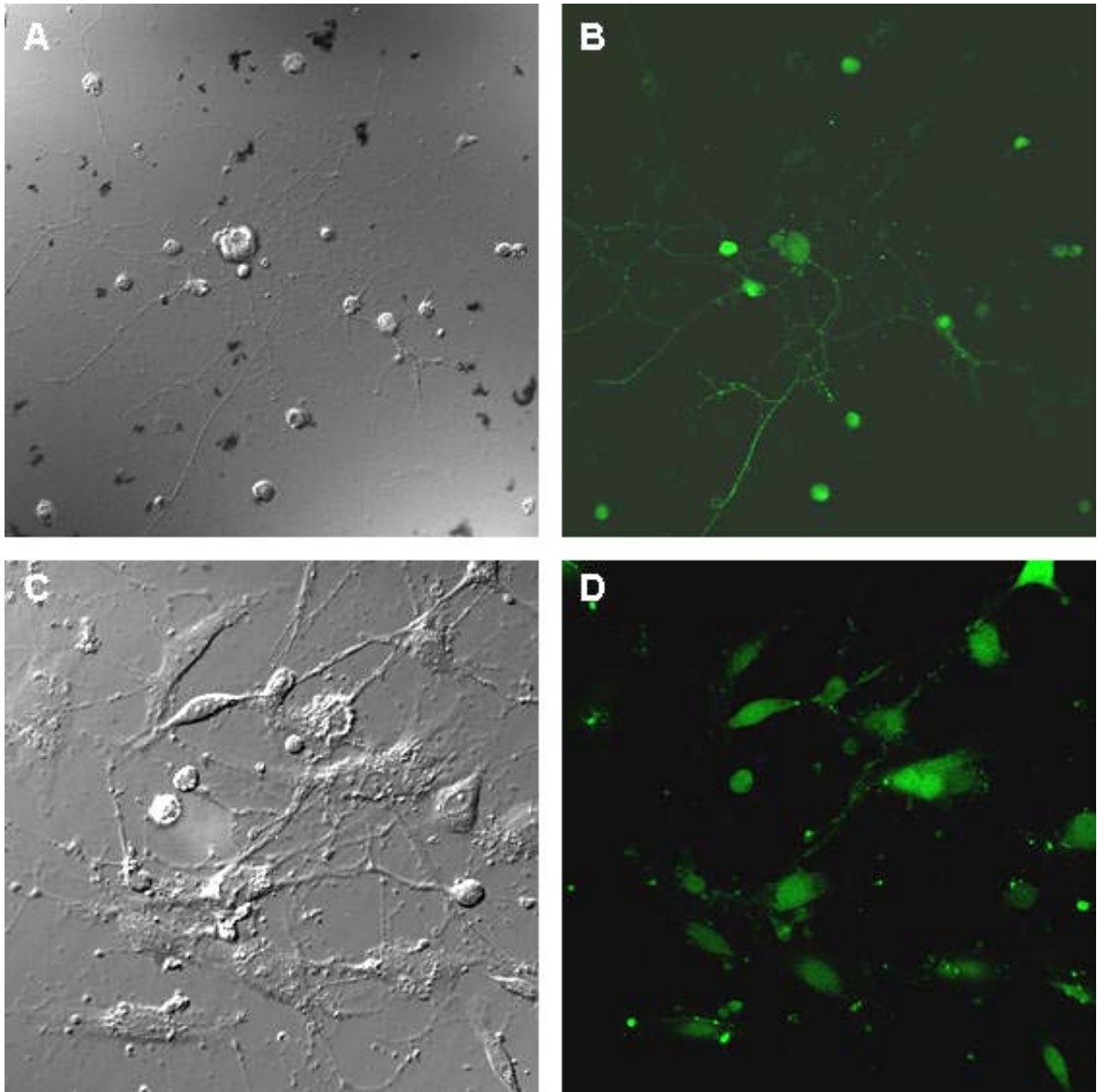


Figura 4.13a: Imagens de cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal após administração de NMDA. PAINÉIS A e B: cultura de 1 dia – muitos neurônios (pequenos e redondos) e poucas células da glia. A primeira imagem é em DIC e a segunda é uma imagem confocal dos neurônios carregados com Fluo-3 AM. PAINÉIS C e D: cultura de 3 dias - pode-se ver muitas células da glia e alguns neurônios. O NMDA (250 μ M) foi adicionado às culturas, ativando o influxo de Ca^{+2} (fluorescência observada em B e D).

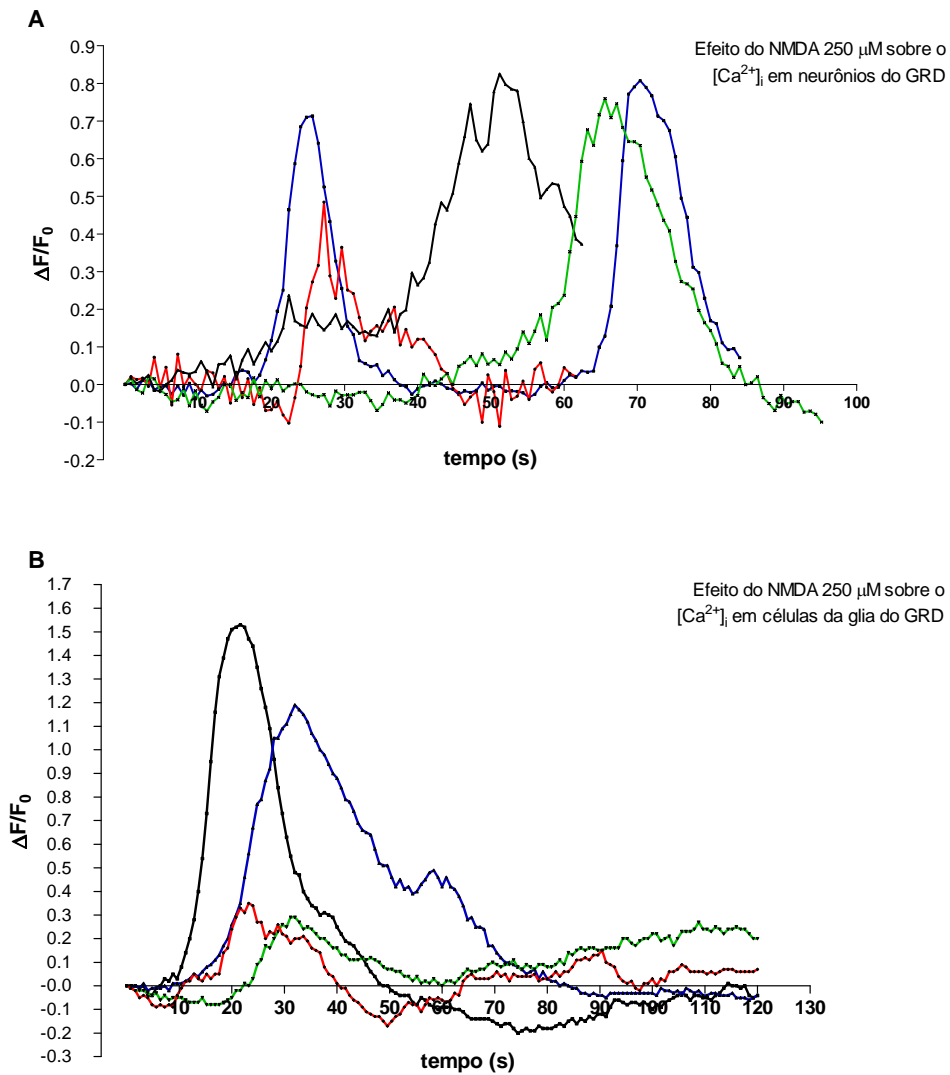


Figura 4.13b: Efeito do NMDA sobre os níveis de cálcio intracelular em neurônios do gânglio da raiz dorsal (painel A) e em células da glia (painel B). As culturas de neurônios do GRD foram preparadas e, os efeitos da aplicação de NMDA (250 μM) sobre a fluorescência, observados, na presença do co-agonista glicina (10 μM), em microscópio confocal. Foi utilizado tampão Hank's sem Mg^{2+} com 10 mM de HEPES. Em **B**: As culturas foram observadas após 3 dias, para que as células da glia se desenvolvessem. As condições de observação foram as mesmas de A. Os traçados indicam aumento nos níveis de fluorescência em relação ao nível basal (Δ de intensidade de fluorescência) e representam o influxo de Ca^{+2} causado pela ativação de NMDARs.

4.14 Efeito da PGE₂ sobre o cálcio (Ca⁺²) intracelular em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal.

Nossos resultados anteriores obtidos por meio de experimentos comportamentais já haviam mostrado que o efeito da PGE₂ é dependente de Ca⁺². Mais ainda, diversos trabalhos da literatura demonstram a relação entre hipernocicepção periférica e processos envolvendo este íon (LINHART et al., 2003). Assim, verificamos se neurônios do GRD cultivados apresentariam alterações nos níveis de Ca⁺² intracelular após o estímulo com o mediador inflamatório PGE₂. Foram testadas três concentrações de PGE₂: 10, 100 e 1000 nM, sendo que apenas as concentrações de 100 e 1000 nM mostraram-se efetivas em induzir influxo de Ca⁺² nos neurônios (**figura 4.14, painéis B e C**). **OBSERVAÇÃO:** Neste, assim como nos próximos experimentos *in vitro*, foram consideradas apenas as respostas apresentadas por neurônios respondíveis à capsaicina (1 µM), os quais provavelmente eram nociceptores, ou seja, fibras do tipo C. Além disso, esse procedimento serviu-nos como controle positivo para verificarmos a viabilidade das células cultivadas. Dessa forma, logo após os experimentos e antes da quantificação das respostas observadas, era adicionada capsaicina às culturas de modo a evidenciar estes neurônios pelo influxo de Ca⁺² e conseqüente fluorescência, já que os receptores TRPV (canais permeáveis ao Ca⁺² ativados pela capsaicina) estão presentes apenas nestas células (IMMKE; GAVVA, 2006; ROBERTS; CONNOR, 2006). Neurônios de outros tipos presentes nas culturas não apresentaram resposta.

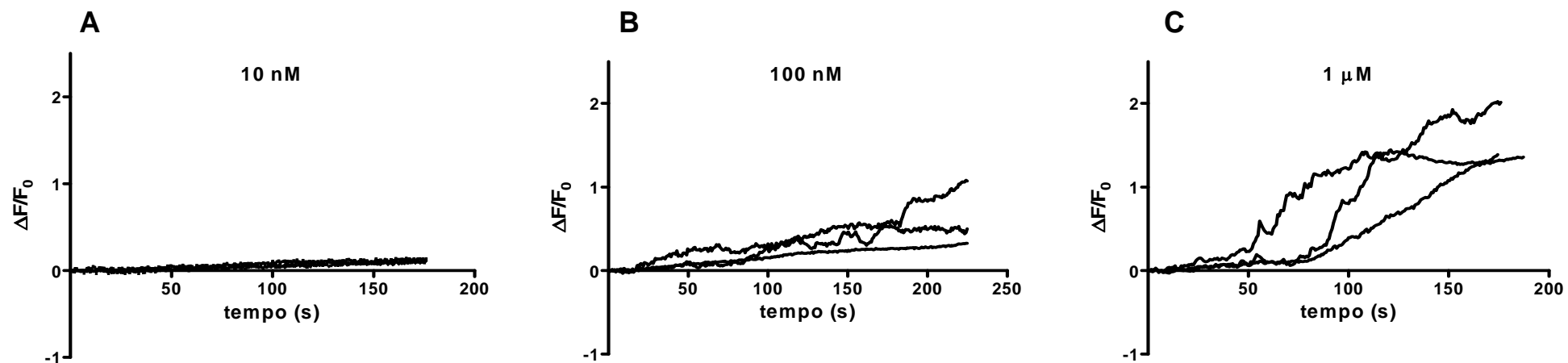


Figura 4.14: Efeito da PGE_2 sobre o Ca^{+2} intracelular em neurônios isolados do gânglio da raiz dorsal. Variação da fluorescência causada pelo influxo de Ca^{+2} em neurônios cultivados, após a adição de PGE_2 nas concentrações de 10 nM, 100 nM e 1 μM . Após o experimento com PGE_2 , foi realizado o controle positivo com adição de capsaicina (1 μM) às culturas, para verificar quais neurônios estavam viáveis. Apenas os neurônios que responderam foram considerados no experimento.

4.15 A PGE₂ induz entrada de Ca⁺² extracelular e liberação de Ca⁺² de estoques intracelulares em neurônios do GRD.

Para avaliar se o aumento de Ca⁺² intracelular induzido pela PGE₂ ocorria devido à entrada de Ca⁺² proveniente do meio extracelular ou da liberação de estoques intracelulares (do retículo endoplasmático), trocamos completamente a solução Hank's, cinco minutos antes da adição de PGE₂ (1 μM), por uma mesma solução na qual o CaCl₂ havia sido substituído por EGTA. Nas placas de cultura testadas observamos uma pequena variação inicial nos níveis de Ca⁺², provavelmente devida à liberação de estoques intracelulares do retículo endoplasmático. Entretanto, o aumento gradativo nos níveis de Ca⁺², bastante evidente após adição de PGE₂ (1 μM), em neurônios cultivados em solução contendo Ca⁺², não foi verificado (**figura 4.15, painel A**). Esse dado sugere que, no efeito induzido pela PGE₂, há participação de Ca⁺² proveniente do meio extracelular. Além disso, sua ação nestes neurônios nociceptores também parece ser dependente da ativação de receptores do tipo rianodine, visto que não foi observada nenhuma resposta à PGE₂ na presença do antagonista seletivo para estes receptores, presentes no retículo endoplasmático, dantrolene (10 μM) (**figura 4.15, painel B**).

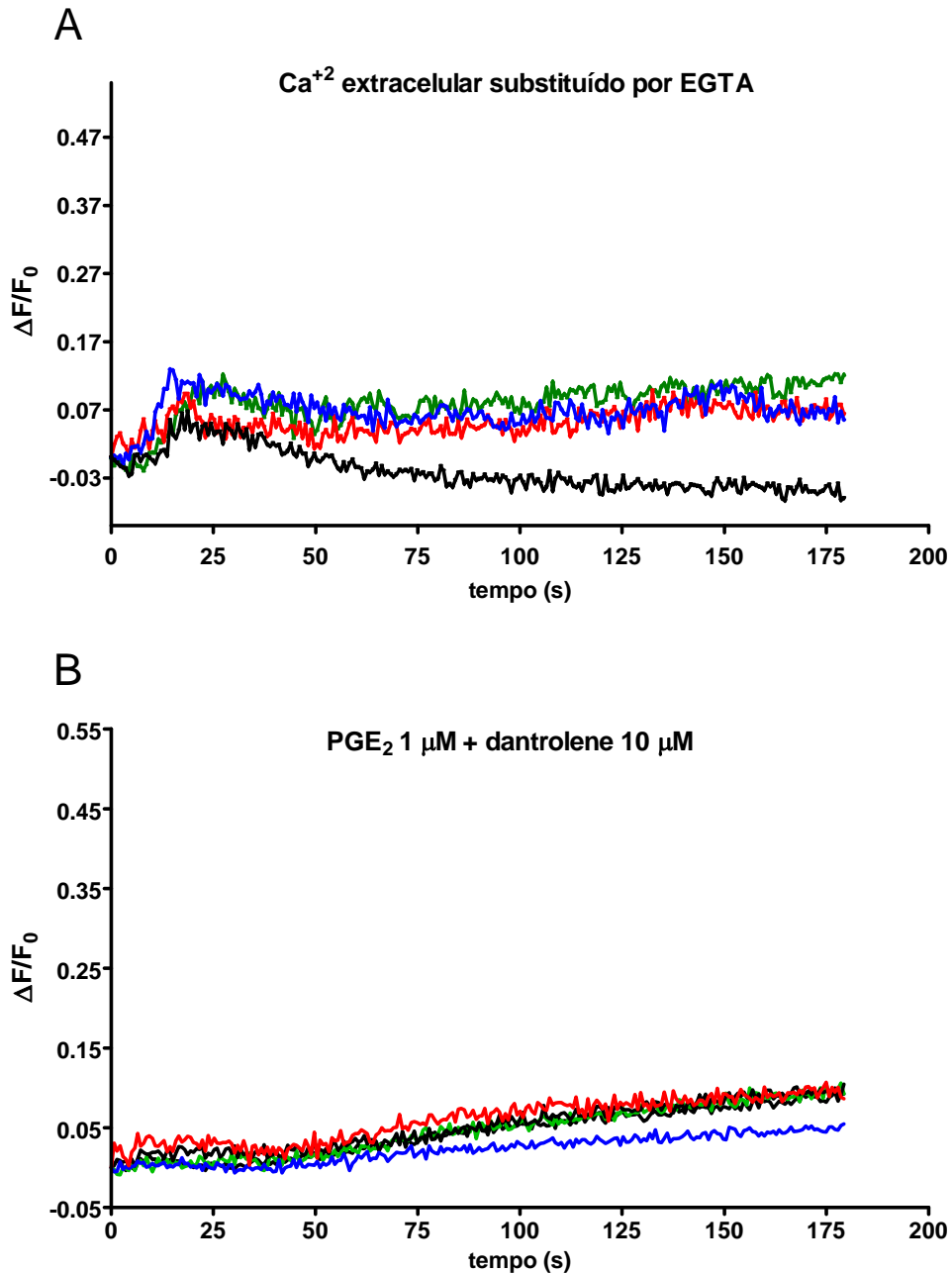


Figura 4.15: O CaCl_2 presente na solução tampão Hank's foi substituído pelo quelante de Ca^{+2} EGTA. A PGE_2 ($1 \mu\text{M}$) foi adicionada às culturas e, os níveis de fluorescência devido ao influxo de Ca^{+2} , avaliados. **PAINEL A:** pequeno aumento inicial dos níveis intracelulares de Ca^{+2} , sugerindo que o Ca^{+2} extracelular é responsável por parte do aumento de Ca^{+2} neuronal induzido por PGE_2 . **PAINEL B: Efeito do dantrolene sobre o aumento de Ca^{+2} intracelular induzido pela PGE_2 .** Culturas de neurônios do GRD foram pré-incubadas durante 5 minutos com o antagonista de receptores rianodine dantrolene ($10 \mu\text{M}$). Em seguida, a PGE_2 ($1 \mu\text{M}$) foi adicionada e, as alterações nos níveis intracelulares de Ca^{+2} , observadas. Em ambos os experimentos, após a adição de PGE_2 , a solução tampão Hank's foi trocada completamente e adicionou-se capsaicina ($1 \mu\text{M}$) para verificar a viabilidade das células (controle positivo). Apenas os neurônios responsivos à capsaicina foram considerados no experimento.

4.16 Efeito do NMDA (250 μM) em neurônios do GRD em cultura com tampão Hank's sem magnésio (Mg^{+2}).

Conforme observado nestes primeiros experimentos *in vitro*, a adição de NMDA às culturas ativa os neurônios, o que foi evidenciado pelo influxo de Ca^{+2} e conseqüente fluorescência. A literatura descreve os NMDARs como canais normalmente bloqueados por um “*plug*” de magnésio (Mg^{+2}), que é removido após despolarização neuronal (BLEAKMAN et al., 2006; DINGLELINE et al., 1999; YAMAKURA; SHIMOJI, 1999). Neste experimento inicial, uma solução tampão Hank's sem Mg^{+2} foi utilizada. O NMDA (250 μM) foi adicionado às culturas de neurônios do GRD em conjunto com o co-agonista glicina, também considerado ser importante na ativação dos NMDARs (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004). O aumento na fluorescência das células causado pelo agonista NMDA (**figura 4.16, painel B**), mesmo sem ter havido despolarização neuronal, sugere que os neurônios do GRD possuem receptores NMDA.

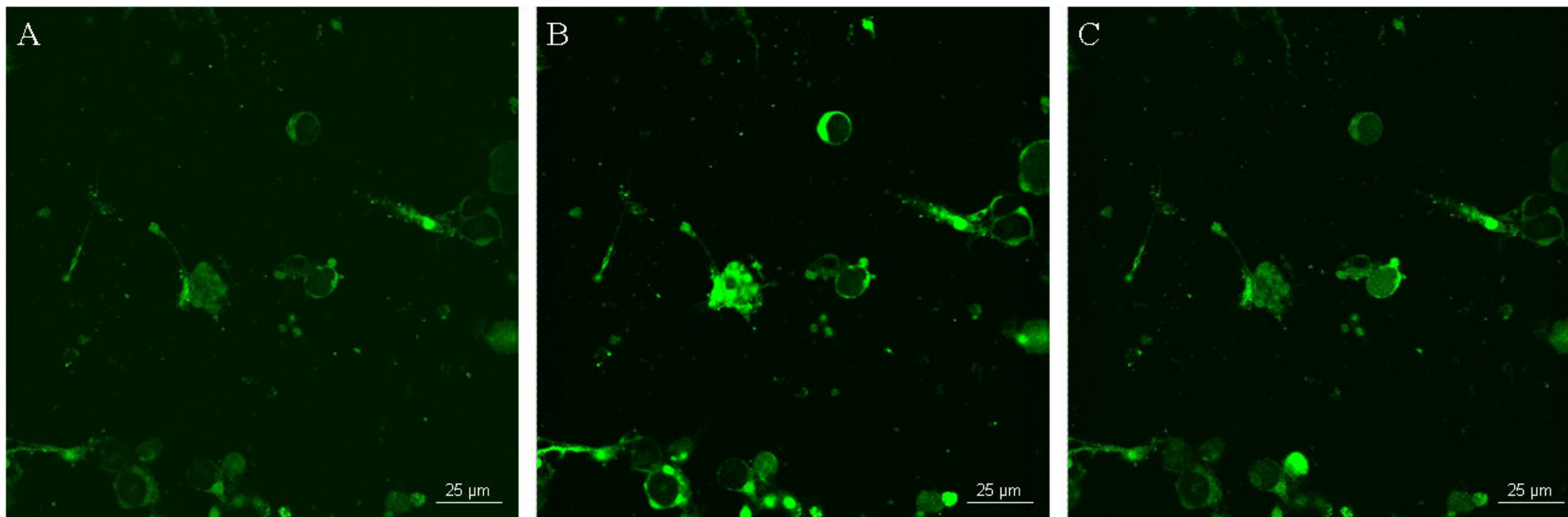


Figura 4.16: Efeito do NMDA sobre neurônios do GRD em cultura. Após a confecção das culturas, imediatamente foi realizado o tratamento com NMDA (250 μM). Os neurônios foram cultivados em meio tampão Hank's sem Mg^{+2} . O NMDA e o co-agonista glicina (10 μM) foram adicionados e, as alterações na fluorescência causadas pelo influxo de Ca^{+2} , avaliadas (**painel A: pré-NMDA+glicina; painel B: pós-NMDA+glicina**). O controle positivo, para verificar a viabilidade das células, foi realizado com a administração posterior de capsaicina (1 μM) e apenas os neurônios responsivos foram considerados no experimento (**painel C**).

4.17 Efeito do NMDA (250 μ M) em neurônios do GRD cultivados por três dias.

Já demonstramos que o NMDA ativa as células do GRD. Entretanto, em culturas de três dias pode ser observada a ativação em grande intensidade de células da glia presentes no GRD (células satélites) pelo NMDA. Ao prepararmos as culturas e as utilizarmos somente após três dias, verificamos diferenças na ativação das células ganglionares pelo NMDA. Quanto maior o tempo esperado para utilizar as culturas, maior proliferação das células satélites ocorreu (**figura 4.17a**). A comparação do **painel B** (administração de NMDA, 250 μ M) com o **painel C** (controle positivo com capsaicina) mostra maior ativação das células satélites que dos neurônios. Esse resultado sugere que o NMDA atua com mais intensidade nessas células gliais. O controle positivo para verificar a viabilidade das culturas (**painel C**) mostrou células diferentes sendo ativadas pela capsaicina (neurônios), enquanto que, o NMDA, ativou mais células da glia. Do mesmo modo, a cultura de células satélites isoladas (**figura 4.17b**) também respondeu ao NMDA, o que indica a presença de NMDARs nessas células, que podem ser ativadas por glutamato (GLU) liberado no GRD (**figura 4.17b, painéis E e F**).

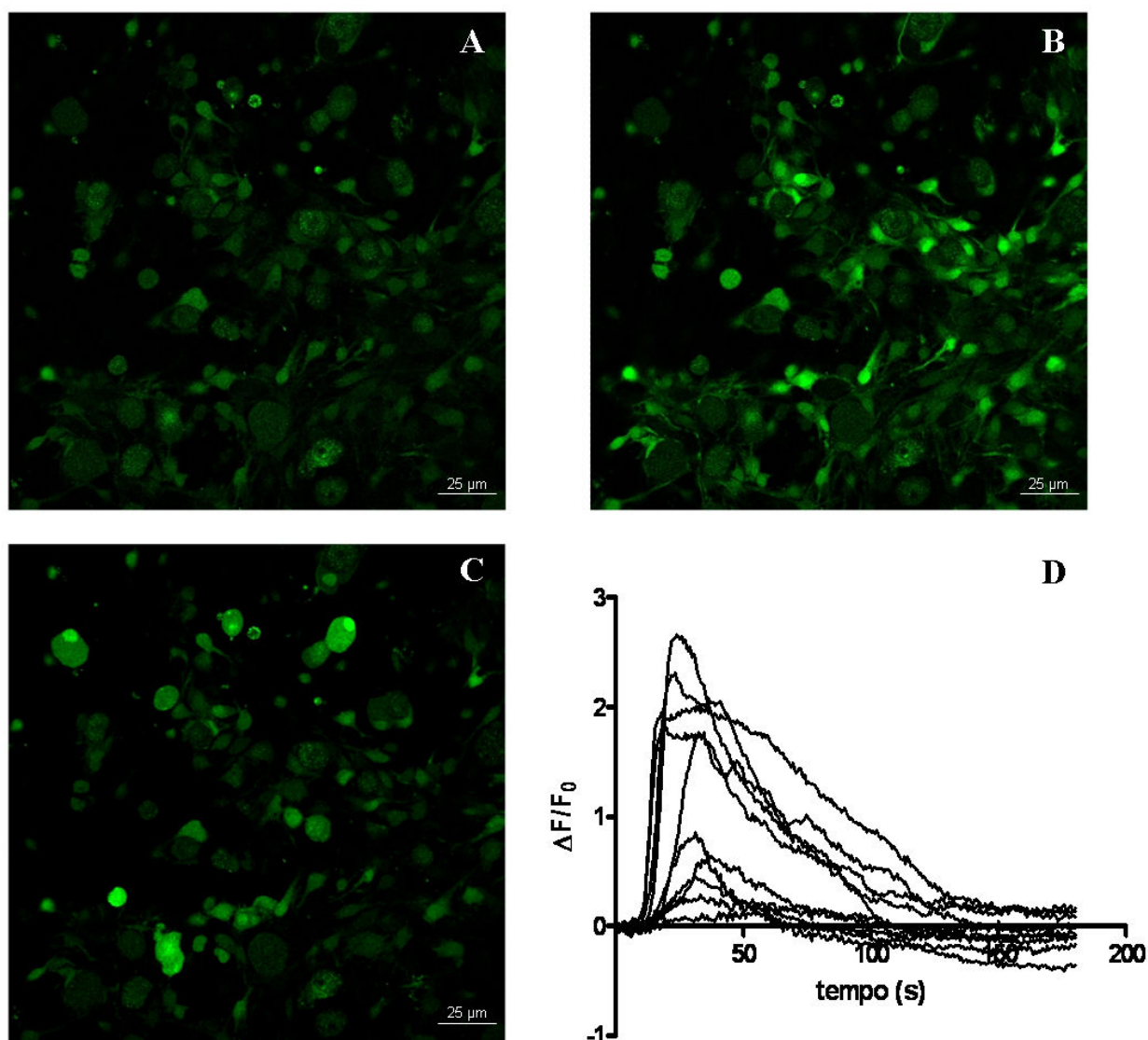


Figura 4.17a: Efeito do NMDA sobre culturas primárias de neurônios do GRD de três dias. As culturas de neurônios do GRD tratadas com NMDA (250 μM) três dias após a preparação. **PAINEL A:** fluorescência basal apresentada pelas células do GRD; **PAINEL B:** imediatamente após a adição de NMDA (250 μM) e fluorescência causada pelo influxo de Ca^{+2} ; **PAINEL C:** Controle positivo para verificar a viabilidade das células, realizado com a adição posterior de capsaicina (1 μM). Apenas os neurônios responsivos à capsaicina foram considerados no experimento; **PAINEL D:** variações na emissão de fluorescência do fluo-3 em função do tempo após a adição de NMDA nas culturas de neurônios do GRD.

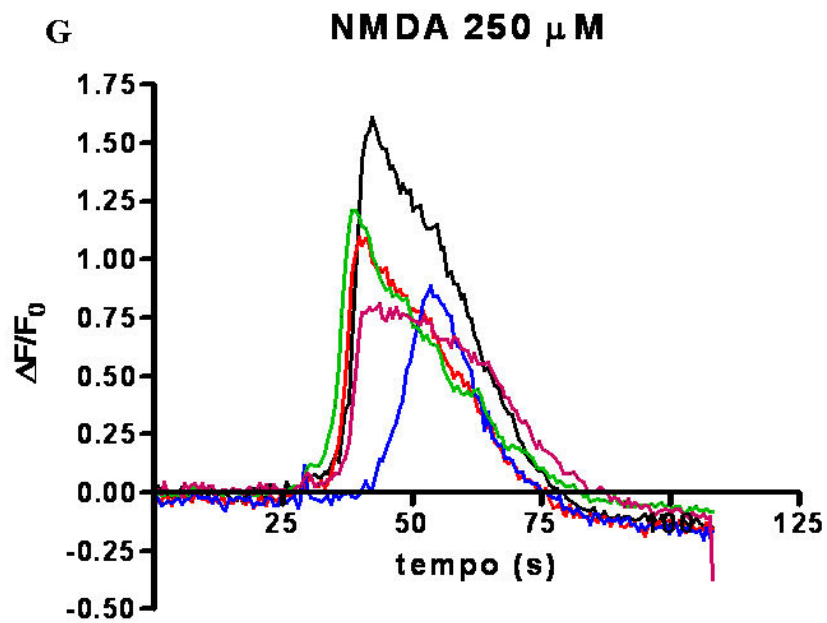
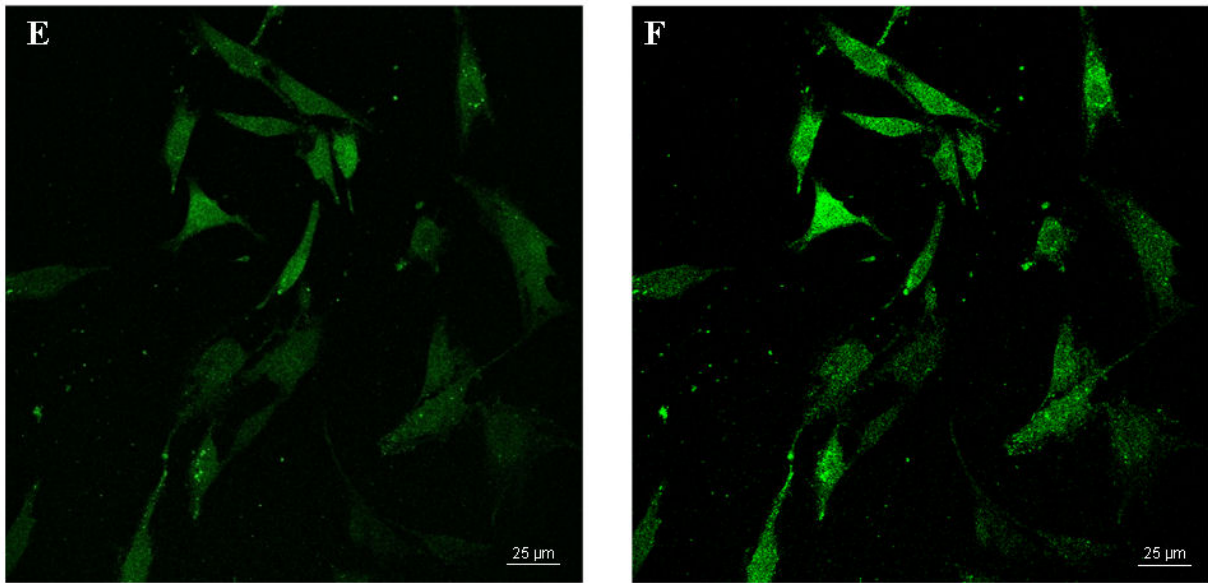


Figura 4.17b: Efeito do NMDA sobre células satélites isoladas. Células satélites foram isoladas de culturas de GRD e submetidas ao tratamento com NMDA (250 µM). **PAINEL E:** fluorescência basal apresentada pelas células satélites; **PAINEL F:** imediatamente após a adição de NMDA (250 µM) e aumento na fluorescência causada pelo influxo de Ca⁺²; **PAINEL G:** variações na emissão de fluorescência do fluo-3 em função do tempo após a adição de NMDA nas culturas de células satélites isoladas.

4.18 O corpo celular de neurônios do GRD contém vesículas para liberação de glutamato (GLU).

Os resultados anteriores sugerem que pode haver liberação de GLU por células do GRD, que ativaria NMDARs presentes nas células-satélites, já que estas foram ativadas por NMDA (experimento anterior, **figura 4.17b**). Uma das maneiras que utilizamos para evidenciar a presença de GLU nas células do GRD foi a marcação, com anticorpos específicos (VGLUT1), de vesículas transportadoras de GLU, por meio das quais pode haver liberação deste neurotransmissor para o meio extracelular. Assim, pudemos observar, por imunofluorescência, a intensa marcação destas estruturas, tanto nos corpos celulares dos neurônios quanto nas células satélites (**figura 4.18a, painéis A e B**). Mais ainda, a colocalização de marcadores para células satélites (**figura 4.18b, painel D**) e vesículas de GLU (**figura 4.18b, painel E**) sugere que estas células podem liberar o neurotransmissor (**figura 4.18b, painel F**). Esse dado também sugere que ambos os tipos de células do GRD (neurônios e células satélites) podem liberar GLU e ativar NMDARs. Entretanto, ainda são necessários outros experimentos para determinar qual tipo celular libera GLU e sua influência na sensibilização retrógrada.

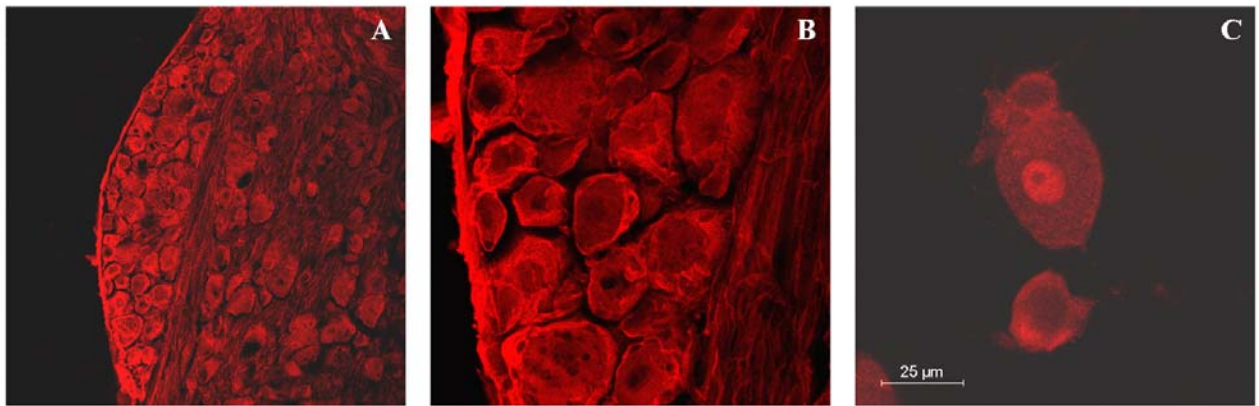


Figura 4.18a: Células do GRD contêm vesículas para transporte e liberação de glutamato. Células do GRD foram marcadas com anticorpo anti-VGLUT1 – um transportador vesicular de glutamato. As observações foram feitas por meio de um microscópio de imunofluorescência.

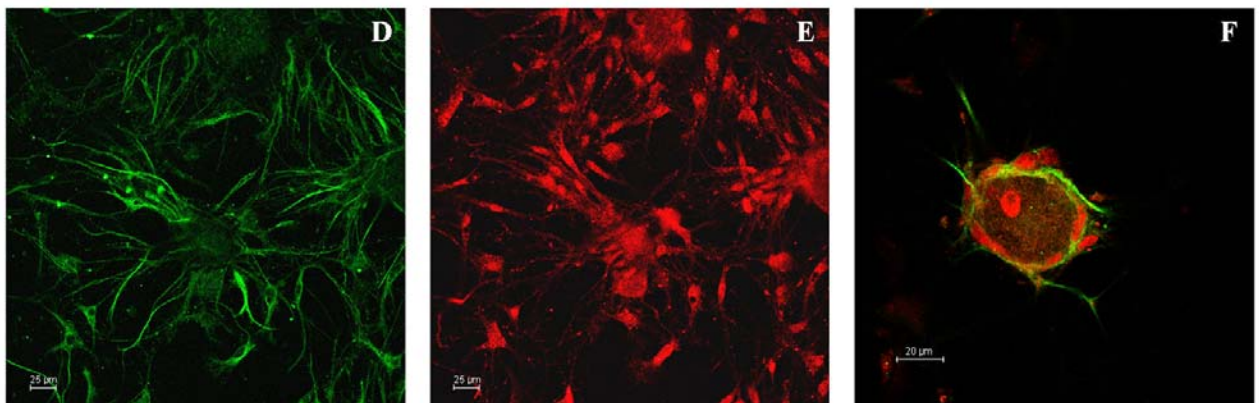


Figura 4.18b: Marcação com anticorpos para células satélites (cor verde, **painel D**), para vesículas transportadoras de GLU (cor vermelha, **painel E**) e co-localização das duas marcações (**painel F**). Além da observação de que tanto neurônios quanto células satélites possuem vesículas para transporte de GLU, é possível notar a relação bastante próxima entre esses dois tipos celulares no GRD.

4.19 NMDA induz oscilações de Ca^{+2} em células satélites.

A administração de NMDA ativa receptores presentes nas células satélites, um efeito que pode ser correlacionado à liberação de GLU por células próximas e ativação de NMDARs gliais. A possibilidade de que a entrada de Ca^{+2} através da abertura dos canais NMDA leva à ativação do fenômeno das oscilações de Ca^{+2} , um processo que contribuiria para a integração das extremidades opostas da célula neuronal, já havia sido comentada anteriormente (PARADA et al., 2003). Assim, caso os NMDARs fossem responsáveis pela ativação da CICR, bloqueadores da liberação de Ca^{+2} intracelular poderiam prevenir a ativação dessas células pelo NMDA. Neste experimento, administramos o antagonista de receptores rianodine dantrolene (10 μM) previamente à administração de NMDA (250 μM) em cultura de células satélites isoladas, e verificamos que ocorreu inibição das oscilações induzidas pelo NMDA. Esse fato relaciona diretamente a ativação de NMDARs gliais às oscilações de Ca^{+2} nestas células. Contudo, pode ser que a ocorrência de CICR nas células satélites seja importante para a liberação de mediadores que atuarão em receptores presentes nos corpos neuronais no GRD, auxiliando na manutenção do estado sensibilizado (**figura 4.19**).

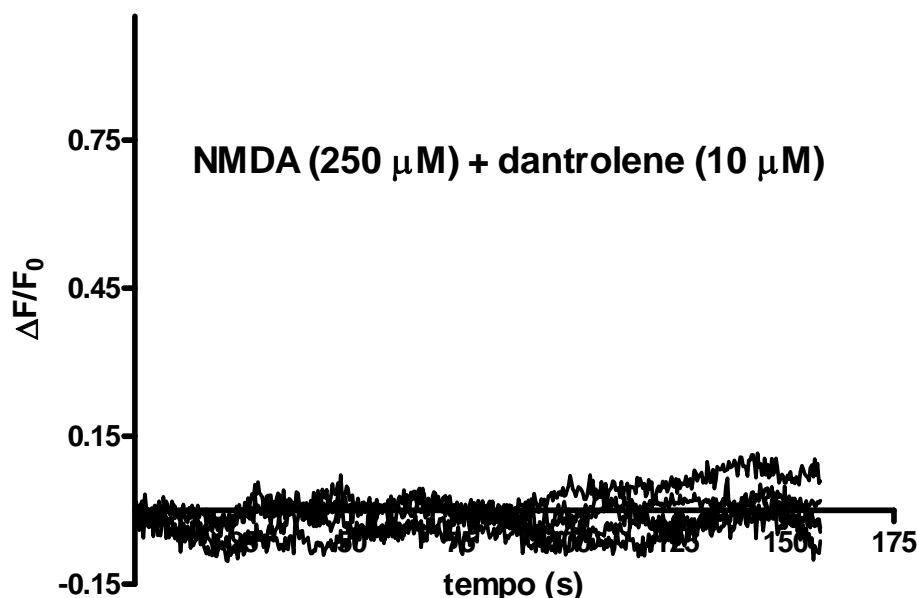


Figura 4.19: Bloqueio, pelo antagonista de receptores rianodine dantrolene, das oscilações de Ca^{+2} induzidas pelo NMDA em cultura de células satélites isoladas. As células satélites foram isoladas de culturas de células do GRD e submetidas ao tratamento com NMDA (250 μM). O tratamento com dantrolene (10 μM) inibiu as oscilações de Ca^{+2} representadas pela alteração na fluorescência das células.

4.20 Magnésio (Mg^{+2}) não bloqueia NMDARs presentes em células satélites isoladas cultivadas.

Os NMDARs são receptores ionotrópicos permeáveis preferencialmente ao Ca^{+2} , embora outros cátions também possam ser conduzidos através de seu poro. Porém, para que esses receptores funcionem, de modo a permitirem a passagem de íons para dentro das células, é necessário que haja remoção do “plug” de Mg^{+2} que impede que haja condutância através dos NMDARs. Tal “plug” é voltagem-sensível e a despolarização prévia do neurônio é condição fundamental para o funcionamento dos NMDARs. Com base nestes conceitos, e considerando que observamos a ativação destes receptores sem que tenha havido despolarização prévia (experimento mostrado na **figura 4.16**), adicionamos Mg^{+2} à solução tampão da cultura de células satélites isoladas, com o objetivo de verificarmos se a saturação do meio poderia bloquear os NMDARs gliais. Contudo, verificamos que não houve inibição da ativação dessas células pelo NMDA ($250 \mu M$), mesmo com uma grande quantidade de Mg^{+2} no meio circundante. Esse resultado sugere que os NMDARs gliais do GRD podem possuir subunidades NR3, as quais diminuem sua sensibilidade ao bloqueio por Mg^{+2} (**figura 4.20**).

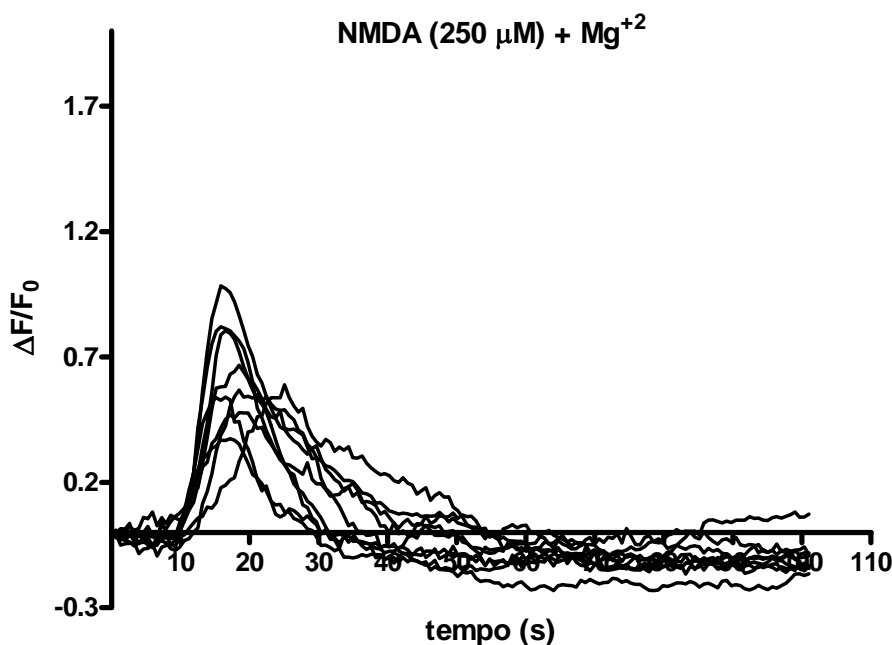


Figura 4.20: Efeito do NMDA em células satélites isoladas cultivadas em meio com Mg^{+2} . As culturas foram preparadas em meio tampão Hank's com Mg^{+2} . O NMDA ($250 \mu M$) foi adicionado e, as alterações na fluorescência causada pelo influxo de Ca^{+2} , avaliadas. O controle positivo para verificar a viabilidade das células foi realizado com a adição posterior de capsaicina ($1 \mu M$) e apenas os neurônios responsivos foram considerados no experimento.

4.21 As células satélites em cultura de neurônios do GRD apresentam oscilações de Ca^{+2} .

Observamos ao longo deste estudo várias evidências que indicam a participação do Ca^{+2} intracelular na hipernocicepção induzida pela PGE_2 , mais especificamente no fenômeno CICR (“*liberação de cálcio induzida por cálcio*”). A inibição da sensibilização à estimulação mecânica provocada pela injeção de PGE_2 na pata de ratos por antagonistas de receptores rianodine é um exemplo dessas evidências. Esses dados interessantes mostram ainda que a sensibilização neuronal associada à CICR não é um fenômeno localizado, mas, sim, um processo que se difunde pela célula neuronal inteira, integrando as diferentes regiões do neurônio primário. Os experimentos apresentados têm indicado que, entre a ativação de receptores periféricos pela PGE_2 e a ativação da CICR, está a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (NMDARs). Entretanto, a suspeita de que estes receptores poderiam estar localizados nas células satélites era outra possibilidade por nós aviltada, porém que “esbarrava” na falta de ferramentas farmacológicas que permitissem a inibição dessas células seletivamente. A realização de experimentos *in vitro*, com microscopia confocal, permitiu que verificássemos o comportamento dessas células durante a administração de drogas (ver experimentos anteriores), inclusive sua susceptibilidade à ativação por NMDA. Entre as observações que fizemos em culturas de células do GRD, verificamos um fenômeno curioso: as células satélite presentes nestas culturas apresentavam oscilações de Ca^{+2} sem a administração de estímulo algum. Esse dado (**figura 4.21a, painel A**) sugere que existe a liberação de algum mediador no meio extracelular que ativa essas células. Provavelmente a liberação de tal(is) mediador(es) seja feita pelo próprio corpo celular neuronal. Além disso, tais oscilações foram inibidas pelo antagonista de NMDARs D-AP-5 (100 μM) (**figura 4.21b, painel B [experimento-controle]** e **painel C [adição de D-AP-5]**) e pelo dantrolene (10 μM) (**figura 4.21c, painel D [experimento-controle]** e **painel E [adição de dantrolene]**). Os resultados indicam a possibilidade de tanto os neurônios quanto as próprias células satélites liberarem GLU no meio extracelular, ativando NMDARs nas células satélites, estimulando a CICR.

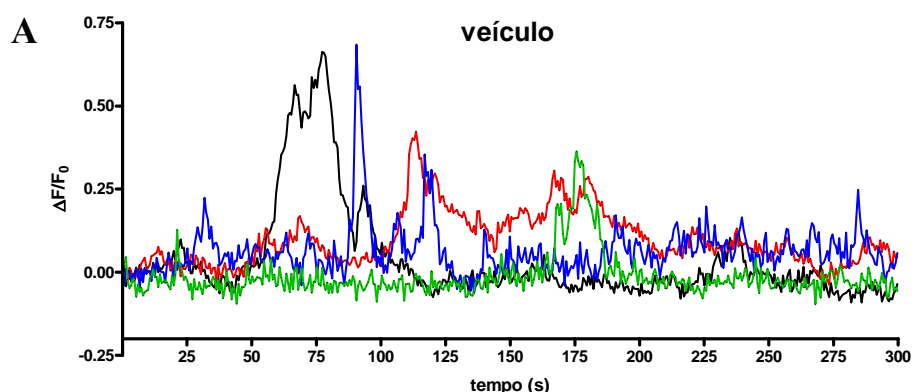


Figura 4.21a: Oscilações de Ca^{+2} em células satélites presentes em cultura de neurônios do GRD. As culturas foram preparadas e, os experimentos, realizados após 3 dias. Este tempo de espera possibilitou o crescimento das células satélites, facilitando as nossas observações. As variações na fluorescência, causadas pelo aumento de Ca^{+2} intracelular, foram quantificadas. Estas células não foram submetidas a tratamento farmacológico algum.

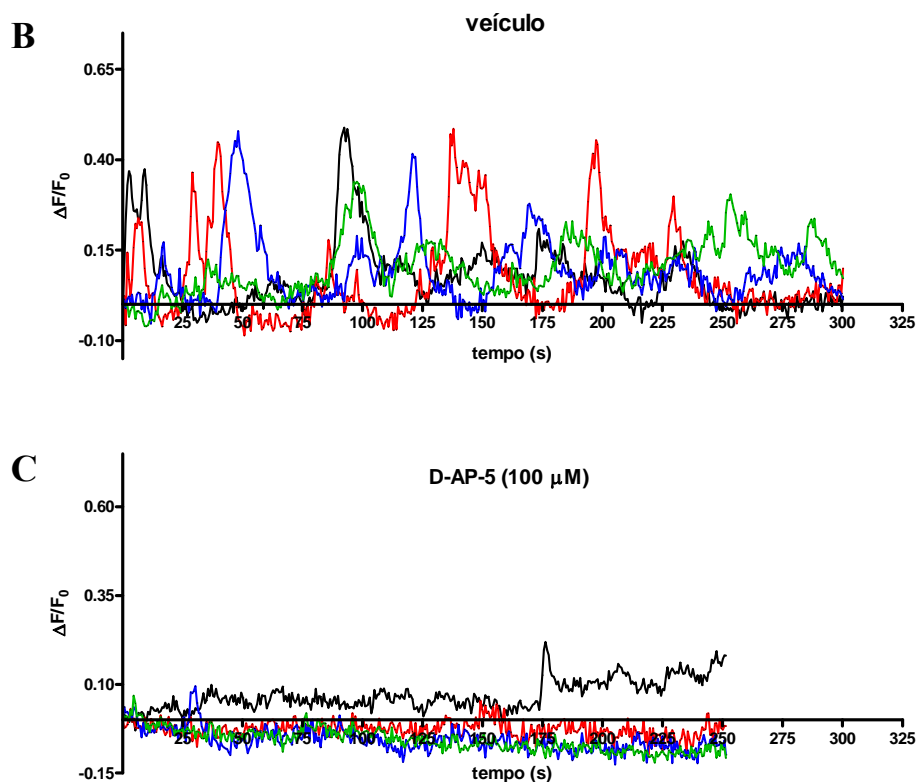


Figura 4.21b: Inibição, pelo antagonista de NMDARs D-AP-5, das oscilações de Ca^{+2} em células satélites em culturas de células do GRD. As condições de preparo e observação destas culturas foram as mesmas do experimento mostrado na **figura 4.21a**, com a diferença de que estas foram tratadas com veículo (**painel B**) ou D-AP-5 (**painel C**). **Painel B:** Administração do veículo nas culturas. Oscilações de Ca^{+2} apresentadas pelas células satélites; **Painel C:** Bloqueio das oscilações de Ca^{+2} pelo D-AP-5 (100 μM). O controle positivo para verificar a viabilidade das células foi realizado com a adição posterior de capsaicina (1 μM) (dado não mostrado), sendo apenas os neurônios responsivos considerados no experimento.

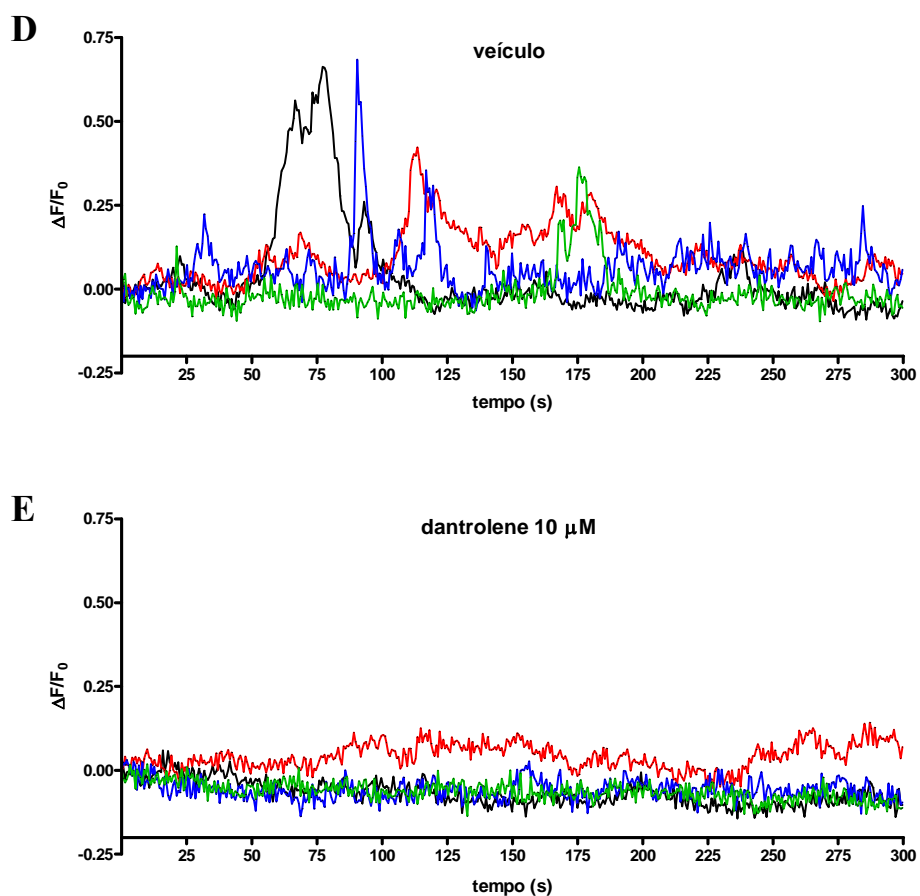


Figura 4.21c: Inibição, pelo antagonista de receptores rianodine dantrolene, das oscilações de Ca^{+2} em células satélites em culturas de células do GRD. As condições de preparo e observação destas culturas foram as mesmas do experimento mostrado na **figura 4.21a**, com a diferença de que estas foram tratadas com veículo (**painel D**) ou dantrolene (**painel E**). **Painel D:** Administração do veículo nas culturas. Oscilações de Ca^{+2} apresentadas pelas células satélites; **Painel E:** Bloqueio das oscilações de Ca^{+2} pelo dantrolene (10 μM). O controle positivo para verificar a viabilidade das células foi realizado com a adição posterior de capsaicina (1 μM) (dado não mostrado), sendo apenas os neurônios responsivos considerados no experimento.

4.22 Efeito do pré-tratamento com inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKC ϵ) e dependente de AMPc (PKA) administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernociceção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Dados obtidos em nosso laboratório mostram o aumento na expressão de proteínas quinases (PKC ϵ e PKA) no GRD após a administração de estímulos inflamatórios na pata de animais. Nesse sentido, essa ativação à distância poderia ser um dos mecanismos pelo qual ocorreria a integração/comunicação entre as diversas regiões do neurônio aferente primário. Ainda, esse fenômeno se encaixa muito bem em nosso estudo da sensibilização retrógrada. Assim, verificamos se antagonistas das proteínas quinases PKA e PKC ϵ administrados diretamente no GRD seriam efetivos em bloquear a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl., o que indicaria a presença de um mecanismo de ativação de tais proteínas que se difundiria pela célula, comunicando as diferentes regiões neuronais. O pré-tratamento i.gl. (cinco minutos) com o inibidor de PKC ϵ (PKC ϵ inib) na dose de 9 μ g inibiu parcialmente, e de maneira significativa (cerca de 32%), a hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl. (100 ng). Isso sugere que a ativação desta proteína quinase no GRD é importante para a hipernociceção neste momento da medida (terceira hora) (**figura 4.22, painel A**). O pré-tratamento i.gl. (30 minutos) com o inibidor de PKA H89 (dose de 27 μ g) (**figura 4.22, painel B**) não alterou a intensidade de hipernociceção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl., assim como o pré-tratamento i.gl. (10 minutos) com a droga, também antagonista da PKA, WIPTIDE (1 μ g) (**figura 4.22, painel C**). Estes resultados sugerem que a PKA presente no GRD pode não participar deste mecanismo de comunicação intraneuronal neste momento da hipernociceção (terceira hora), o que se correlacionaria diretamente com a falta de efeito do WIPTIDE, que atua sobre a PKA por bloquear o AMPc, inibindo, assim, sua ativação. Os controles realizados mostraram que a administração isolada tanto dos veículos (salina ou DMSO) quanto das drogas inibidoras das proteínas quinases no GRD não alteraram o limiar hipernociceptivo.

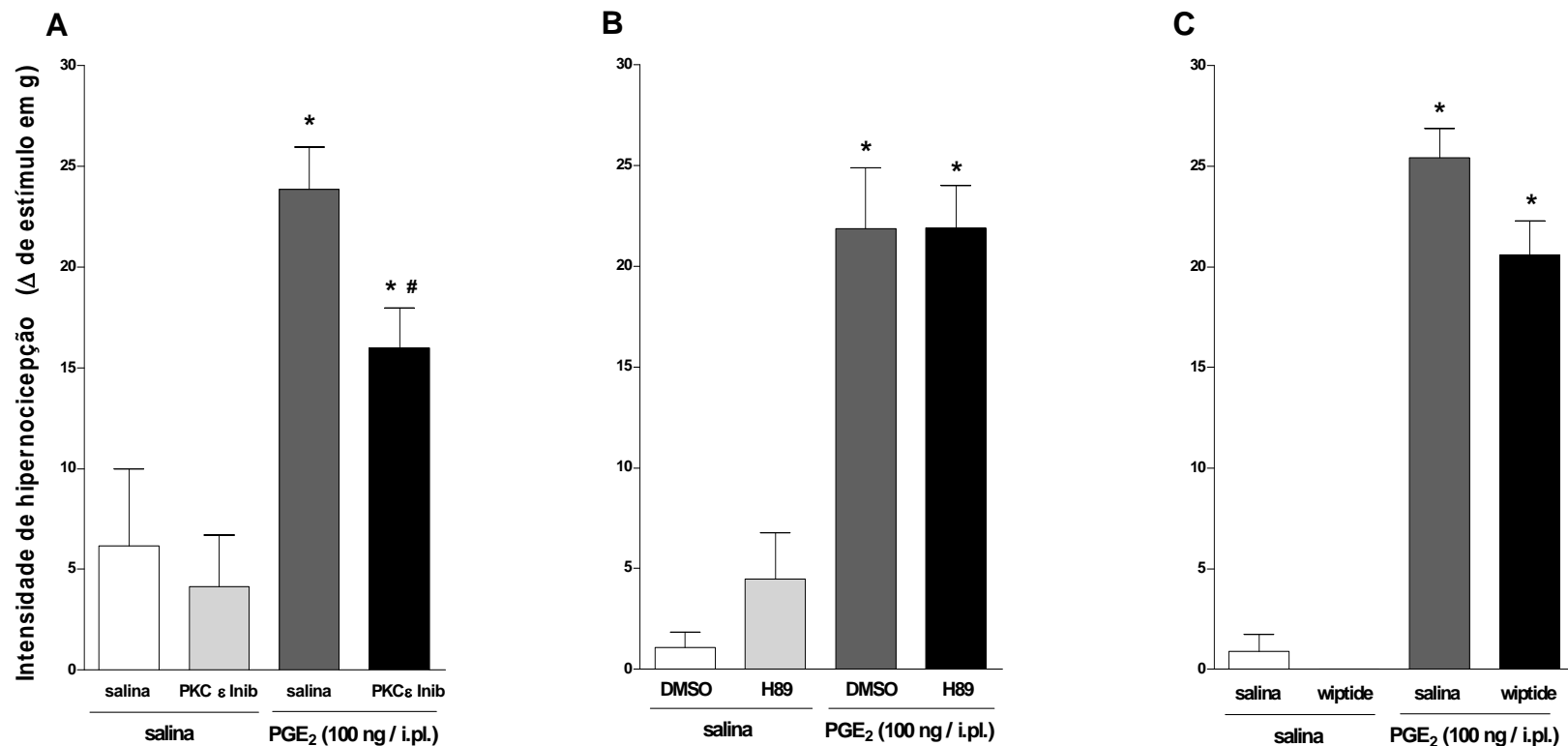


Figura 4.22: Efeito do inibidor de proteína quinase C epsilon (PKCε inib) (painel A) e dos inibidores da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e WIPTIDE (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂). A hipernocicepção foi induzida pela PGE₂ (100 ng, i.pl.). Os inibidores foram administrados diretamente no GRD (i.gl.), sendo que o pré-tratamento com o inibidor de PKCε (9 μg) foi realizado 5 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (**painel A**), o H89, 30 minutos antes (27 μg, **painel B**), e, o WIPTIDE, 10 minutos antes (1 μg, **painel C**). A hipernocicepção mecânica foi avaliada na terceira hora pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle e inibidor de PKCε sozinho. # indica p<0,001 em relação ao grupo PGE₂ sozinha; **Painel B:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle (DMSO) e H89 sozinho; **Painel C:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle e WIPTIDE sozinho (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.23 Efeito do pré-tratamento com inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKC ϵ) e dependente de AMPc (PKA) administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernociceção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.

Experimentos anteriores mostraram que a PGE₂ administrada via i.pl. pode ativar a PKC ϵ presente no GRD, uma vez que o inibidor específico de tal proteína, quando administrado via i.gl., bloqueou a hipernociceção mecânica periférica. Considerando a possibilidade de estar ocorrendo ativação de receptores ganglionares pelo GLU liberado neste local por ação da PGE₂ i.pl. - o que poderia ser o mecanismo pelo qual ocorreria a sensibilização retrógrada -, verificamos se a ativação de NMDARs ganglionares estimularia esta proteína quinase e também a PKA. Os protocolos do experimento anterior foram repetidos, apenas mudando-se o estímulo hipernociceptivo, que passou a ser o NMDA injetado por via i.t. (80 ng). O pré-tratamento i.gl. (cinco minutos) com o inibidor de PKC ϵ (PKC ϵ inib) na dose de 9 μ g inibiu em cerca de 80% a hipernociceção induzida pelo NMDA i.t., o que nos sugere que o GLU ativa esta proteína quinase no GRD (**figura 4.23, painel A**). O pré-tratamento i.gl. (30 minutos) com o inibidor de PKA H89 (dose de 27 μ g) (**figura 4.23, painel B**), ao contrário do que foi observado no experimento anterior, alterou de maneira significativa (cerca de 45%) a intensidade da hipernociceção mecânica induzida pelo NMDA i.t.. O mesmo ocorreu com o pré-tratamento i.gl. (10 minutos) com o WIPTIDE (1 μ g) (inibição de cerca de 43% da hipernociceção) (**figura 4.23, painel C**). Tais resultados sugerem que a PKA presente no GRD também pode ser ativada, via estimulação de NMDARs, pelo GLU liberado neste local, e participar diretamente da sensibilização retrógrada do neurônio aferente primário, assim como a PKC ϵ . A semelhança entre as inibições causadas pelo H89 e pelo WIPTIDE pode ser explicada pelo fato de as duas drogas bloquearem a PKA, embora por mecanismos diferentes (o WIPTIDE inibe a PKA por bloquear o AMPc. Por outro lado, sugere-se que o H89 bloqueia a PKA diretamente). Os controles realizados mostraram que a administração isolada tanto dos veículos (salina ou DMSO) quanto das drogas inibidoras das proteínas quinases no GRD não alteraram o limiar hipernociceptivo.

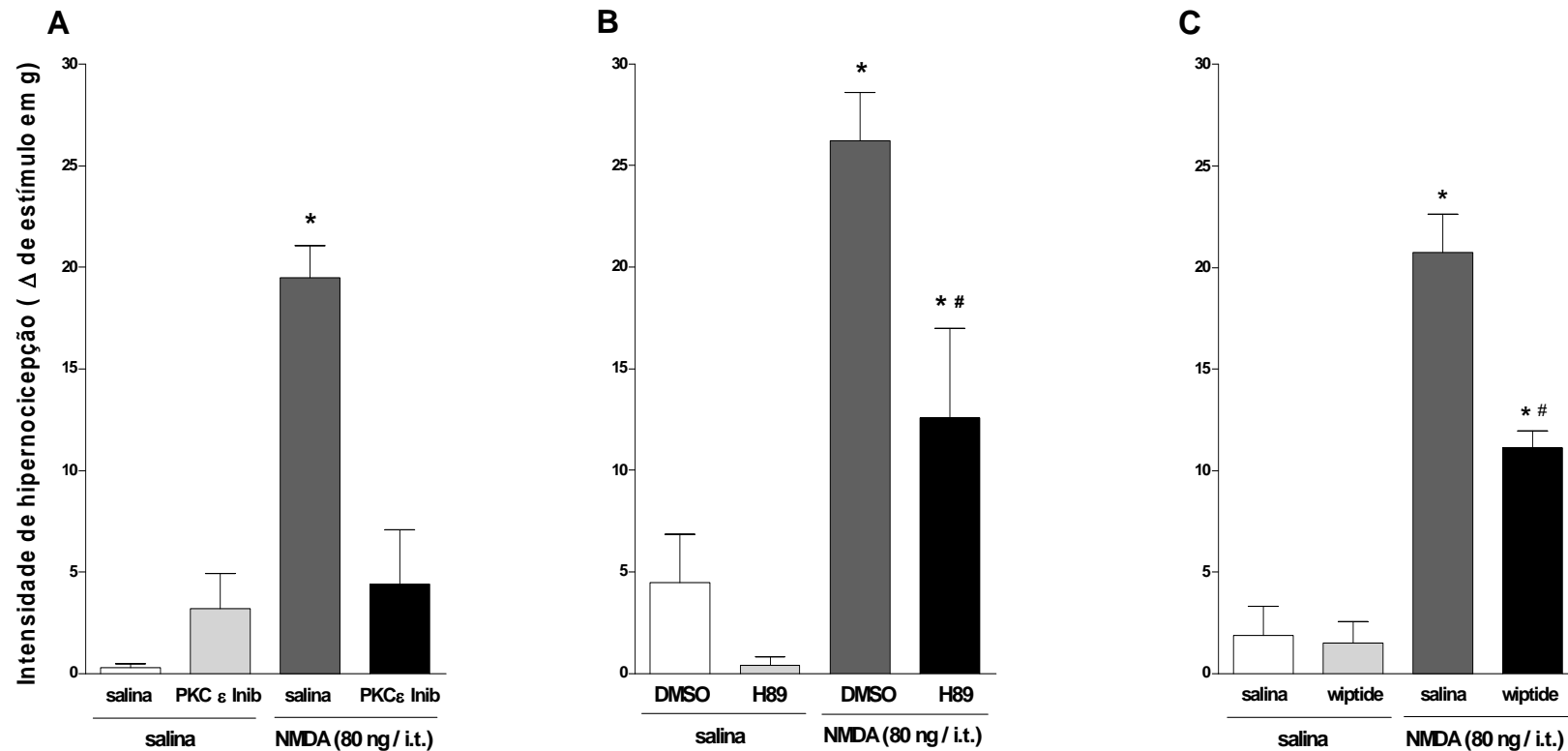


Figura 4.23: Efeito do inibidor de proteína quinase C epsilon (PKCε inib) (painel A) e dos inibidores de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e WIPTIDE (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA. A hipernocicepção foi induzida pelo NMDA (80 ng). Os inibidores foram administrados diretamente no GRD (i.gl.), sendo que o pré-tratamento com inibidor de PKCε (9 µg) foi realizado 5 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (painel A**), o H89, 30 minutos antes (27 µg, **painel B**), e, o WIPTIDE, 10 minutos antes (1 µg, **painel C**). A hipernocicepção mecânica foi avaliada na terceira hora pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indica p<0,001 em relação aos grupos controle, inibidor de PKCε sozinho e inibidor de PKCε+NMDA; **Painel B:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle (DMSO) e H89 sozinho, # indica p<0,001 em relação ao grupo NMDA sozinho; **Painel C:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos controle e WIPTIDE sozinho, # indica p<0,001 em relação ao grupo NMDA sozinho (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).**

4.24 Desenvolvimento do efeito dos inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKC ϵ) - PKC ϵ inhibitor - e dependente de AMPc (PKA) - H89 -, e do inibidor da enzima adenilato ciclase – SQ22536 - administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂).

Os experimentos anteriores demonstraram que a administração i.gl. do inibidor de PKC ϵ , mas não dos antagonistas de PKA H89 e WIPTIDE, bloqueia a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. na terceira hora, o que sugere a ativação destas proteínas em locais distantes do sítio do estímulo inflamatório. Em adição aos dados obtidos em nosso laboratório que mostravam o aumento na expressão de proteínas quinases (PKC ϵ e PKA) no GRD após a administração de estímulos inflamatórios na pata de animais, esses resultados sugerem a presença de um mecanismo de comunicação intraneuronal, que poderia ser o responsável, além das oscilações de Ca⁺², pela sensibilização do neurônio aferente primário como um todo. Levando em conta que foi detectado aumento na expressão de PKA no GRD durante a primeira hora pós-estímulo, enquanto a expressão de PKC ϵ esteve aumentada apenas na terceira hora (dados do laboratório), achamos relevante o acompanhamento do efeito dos inibidores dessas proteínas sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl.. Observamos que, na terceira e quarta horas medidas, houve bloqueio da hipernocicepção pelo pré-tratamento por via i.gl. (30 minutos) com o inibidor de PKC ϵ (9 μ g, **figura 4.24, painel A**). Uma vez que a administração i.pl. dessa droga bloqueou totalmente o desenvolvimento da hipernocicepção induzida pela PGE₂ (**figura 4.24, painel A, grupo ■**), podemos sugerir que a PKC ϵ é importante para sua indução no local do estímulo, entretanto, em fases mais tardias, sua presença no GRD pode ser fundamental. De maneira contrária, o inibidor da PKA H89 (27 μ g, i.gl., **figura 4.24, painel B**) não inibiu a hipernocicepção na terceira hora, porém seu efeito inibidor foi verificado durante a primeira e segunda hora pós-estímulo. Após esse tempo, os valores da hipernocicepção tenderam a se igualar aos valores–controle (**figura 4.24, painel B, grupo ◇**). Essa proteína quinase é ativada pelo AMPc e a administração i.gl. do inibidor da enzima adenilato ciclase SQ22536 (25 μ g, **figura 4.24, painel C**), responsável pela formação de AMPc, também bloqueou a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl., entretanto essa inibição foi total. Em conjunto, os dados sugerem que a PKC ϵ presente no GRD é importante para a hipernocicepção induzida pela PGE₂ em fases mais tardias, enquanto que a PKA ganglionar seria importante em fases iniciais. Já a adenilato ciclase - enzima cuja ativação leva à ativação da PKA – ganglionar parece ser importante desde o

início da ação da PGE₂. Além disso, esses dados indicam haver uma inter-relação entre essas proteínas durante a hipernocicepção induzida pela PGE₂, sendo que essa inter-relação parece acontecer em locais diferentes no neurônio primário.

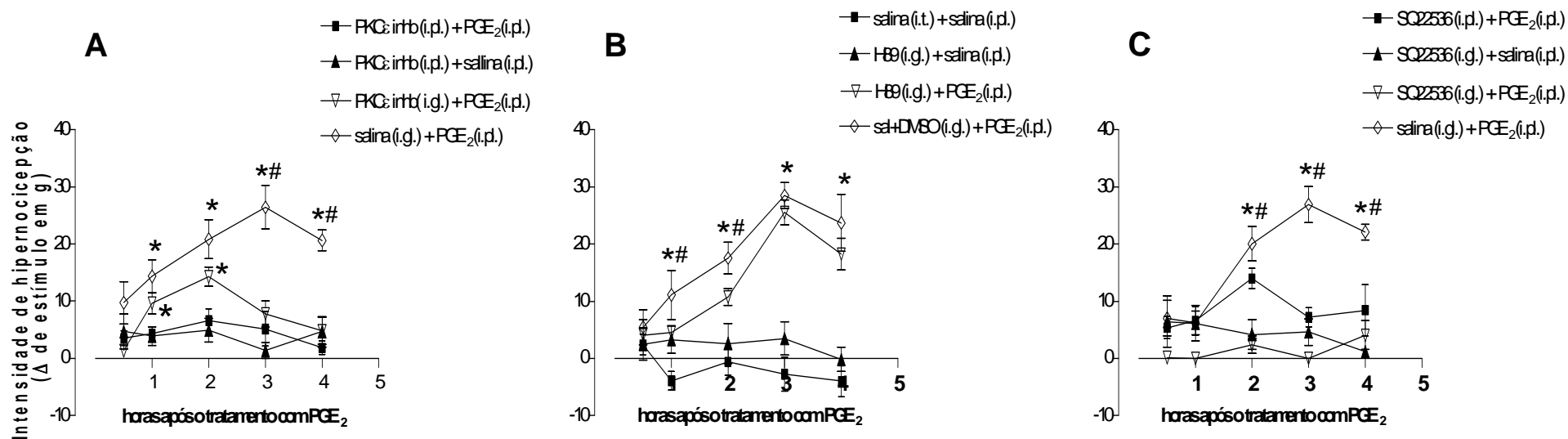


Figura 4.24: Efeito em função do tempo do inibidor de proteína quinase C epsilon (*PKCε inh*) (painel A), do inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e do inibidor da enzima adenilato ciclase SQ22536 (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernociceção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E₂ (PGE₂). A hipernociceção foi induzida pela PGE₂ (100 ng, i.pl.). Os inibidores foram administrados diretamente no GRD (i.gl.), sendo que o pré-tratamento com o inibidor de PKCε (9 µg) foi realizado 5 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (**painel A**), o H89 (27 µg), 30 minutos antes (**painel B**), e, o SQ22536 (25 µg), 30 minutos antes (**painel C**). A hipernociceção mecânica foi avaliada até a quarta hora pós-PGE₂ pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos ■, ▲, ▼ e ◇ representam a média ± epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos PKCεinh (i.pl.)+PGE₂ (i.pl.) e PKCεinh (i.pl.)+salina (i.pl.); # indica p<0,001 em relação ao grupo PKCεinh (i.gl.)+PGE₂ (i.pl.); **Painel B:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos salina (i.t.)+salina (i.pl.) e H89 (i.gl.)+salina (i.pl.); # indicam p<0,001 em relação ao grupo H89 (i.gl.)+PGE₂ (i.pl.); **Painel C:** * indicam p<0,001 em relação aos grupos SQ22536 (i.pl.)+PGE₂ (i.pl.) e SQ22536 (i.gl.)+salina (i.pl.); # indicam p<0,001 em relação ao grupo SQ22536 (i.gl.)+PGE₂ (i.pl.) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.25 Desenvolvimento do efeito dos inibidores das proteínas quinases C epsilon (PKC ϵ) – PKC ϵ inhibitor - e dependente de AMPc (PKA) – H89 -, e do inibidor da enzima adenilato ciclase – SQ22536 - administrados no gânglio da raiz dorsal (GRD) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA.

Dados anteriores mostraram que a PGE₂ administrada por via i.pl. ativa as proteínas quinases C ϵ e A no GRD. Do mesmo modo, foi demonstrado que o NMDA administrado por via i.t. também ativa essas proteínas, levando à hipernocicepção. Contudo, esses resultados prévios apenas haviam mostrado a relação do NMDA com a ativação desses segundos-mensageiros no GRD na terceira hora pós-estímulo inflamatório. Uma vez que estamos avaliando também a relação dos NMDARs ganglionares com a hipernocicepção retrógrada, fizemos, nos mesmos moldes do experimento anterior, o acompanhamento do efeito dos inibidores dessas proteínas e da enzima adenilato ciclase sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela administração i.t. de NMDA (80 ng). Verificamos que o pré-tratamento i.gl. (cinco minutos) com o inibidor de PKC ϵ (9 μ g, **figura 4.25, painel A**) inibiu totalmente a hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t., indicando um papel fundamental desta proteína no GRD durante a hipernocicepção induzida pelo NMDA. Por outro lado, o pré-tratamento i.gl. (30 minutos) com o inibidor de PKA H89 (27 μ g, **figura 4.25, painel B**), bloqueou a hipernocicepção de maneira significativa apenas na terceira hora, porém este bloqueio não foi total, assim como aconteceu com o SQ22536, cujo bloqueio da hipernocicepção apenas foi significativo na terceira e quarta horas (25 μ g, **figura 4.25, painel C**). Esses resultados sugerem que a adenilato ciclase pode ser ativada via estimulação de NMDARs por GLU liberado no GRD. Em seqüência, haveria ativação da PKA presente nesta região do neurônio. Assim pode-se dizer que a adenilato ciclase e a PKA participam diretamente da sensibilização retrógrada do neurônio aferente primário, assim como a PKC ϵ . Entretanto, o fato da inibição da adenilato ciclase e da PKA ganglionares não bloquear totalmente a hipernocicepção induzida pelo NMDA, mas apenas em fases mais tardias, ao contrário da PKC ϵ , sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos neste efeito do NMDA. Porém, aparentemente, a ativação de PKC ϵ no GRD pode ser fundamental para o início da hipernocicepção induzida pelo NMDA, como sugerido em alguns trabalhos da literatura (PARADA et al., 2005). Os controles realizados mostraram que a administração isolada tanto dos veículos (salina ou DMSO) quanto das drogas inibidoras das proteínas quinases no GRD não alteraram o limiar hipernociceptivo.

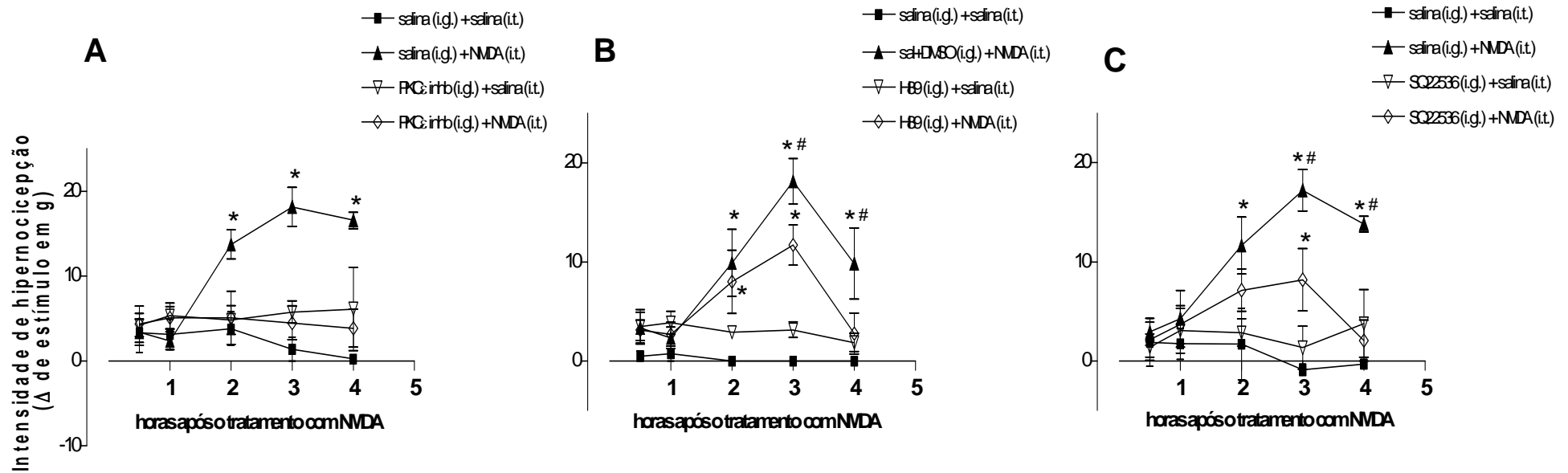


Figura 4.25: Efeito em função do tempo do inibidor de proteína quinase C epsilon (*PKCε inh*) (painel A), do inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) H89 (painel B) e do inibidor da enzima adenilato ciclase SQ22536 (painel C) administrados no gânglio da raiz dorsal (i.gl.) sobre a hipernociceção mecânica induzida pela injeção intratecal (i.t.) de NMDA. A hipernociceção foi induzida pelo NMDA (80 ng, i.t.). Os inibidores foram administrados diretamente no GRD (i.gl.), sendo que o pré-tratamento com o inibidor de PKCε (9 µg) foi realizado 5 minutos antes do estímulo hipernociceptivo (**painel A**), o H89 (27 µg), 30 minutos antes (**painel B**), e, o SQ22536 (25 µg), 30 minutos antes (**painel C**). A hipernociceção mecânica foi avaliada até a quarta hora pós-NMDA pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos ■, ▲, ▼ e ◇ representam a média ± epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.gl.)+salina (i.t.), salina (i.gl.)+NMDA (i.t.) e PKCεinh(i.gl.)+salina (i.t.); **Painel B:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.gl.)+salina (i.t.) e H89 (i.gl.)+salina (i.t.); # indicam $p < 0,001$ em relação ao grupo H89 (i.gl.)+NMDA (i.t.); **Painel C:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.gl.)+salina (i.t.) e SQ22536 (i.gl.)+salina (i.t.); # indicam $p < 0,001$ em relação ao grupo SQ22536 (i.gl.)+NMDA (i.t.) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.26 A hipernociceção induzida pela proteína quinase C (PKC), pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) ou pelo análogo de AMPc dbAMPc é mantida pela ativação de receptores NMDA no GRD.

Demonstramos que hipernociceção induzida pela PGE₂ i.pl. está relacionada à ativação de NMDARs localizados no GRD, e que a inibição destes receptores bloqueia, temporariamente, a hipernociceção. Esses dados indicam que os NMDARs ganglionares são responsáveis pela manutenção do estado sensibilizado durante o desenvolvimento do fenômeno. Também observamos que existe relação entre a PGE₂, a estimulação de segundos-mensageiros intracelulares (PKC, PKA e AMPc) e a ativação dos NMDARs. Para verificarmos em qual momento a ativação desses segundos-mensageiros leva à ativação de NMDARs ganglionares, administramos cada um deles por via i.pl. e observamos qual efeito o antagonista de NMDARs D-AP-5 (9 µg), administrado no GRD, teria sobre a hipernociceção induzida. O pré-tratamento com D-AP-5 em todos os casos (**figura 4.26, painel A**: hipernociceção induzida pelo agonista específico de PKCε ψεRACK [1 µg / 100 µl, i.pl.]; **painel B**: hipernociceção induzida pela subunidade catalítica de PKA [1U / 100 µl, i.pl.]; e **painel C**: hipernociceção induzida pelo análogo de AMPc dbAMPc [100 µg / 50 µl, i.pl.]) bloqueou a hipernociceção mecânica. Entretanto, nos casos da PKCε e do AMPc, o bloqueio dos NMDARs inibiu a sensibilização durante todo o período observado (**figura 4.26, painéis A e C, respectivamente**), ao contrário da PKA, cujo bloqueio dos NMDARs apenas inibiu a hipernociceção a partir da segunda hora (**figura 4.26, painel B**). Isso nos sugere que os processos mediados pela PKA talvez sejam importantes em fases mais tardias do desenvolvimento da hipernociceção, sendo que, a partir desse tempo, a sensibilização passa a ser mantida pela ativação dos receptores ganglionares (provavelmente NMDARs gliais), com liberação de outro (ou até do mesmo) mediador, que manterá o estado sensibilizado neuronal (a sensibilização retrógrada propriamente dita).

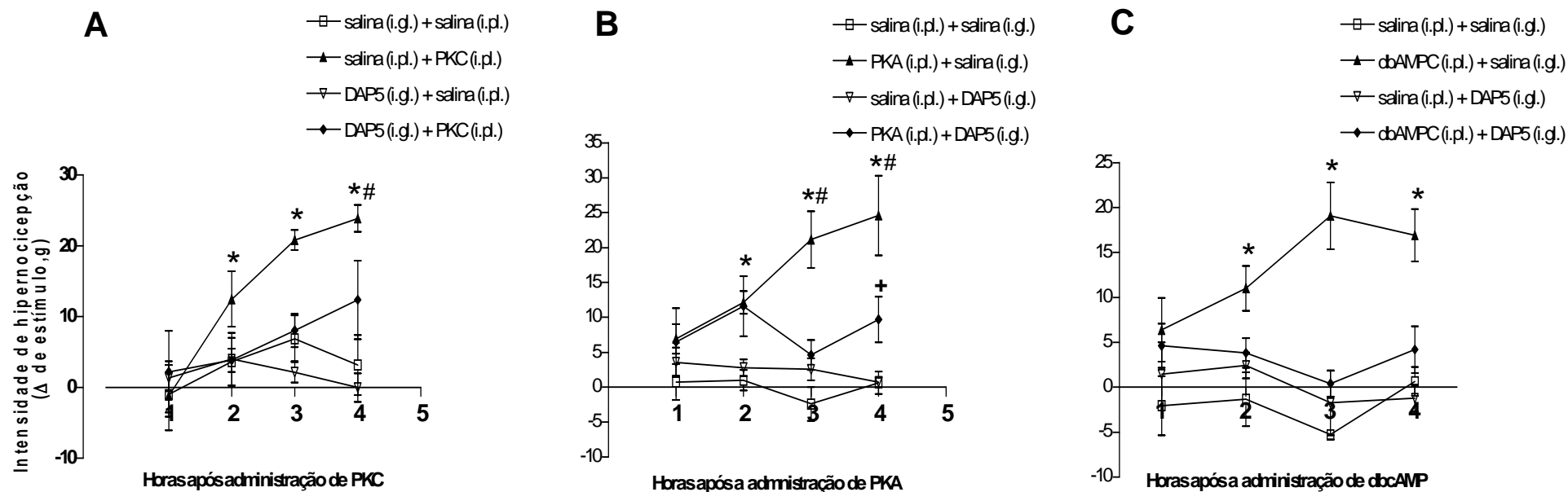


Figura 4.26: Efeito do antagonista de receptores NMDA D-AP-5 administrado no GRD (i.g.) sobre a hipernociceção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) do agonista específico de PKC ϵ ψ RACK (painel A), da subunidade catalítica de proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (painel B) ou do análogo de AMPc dbAMPc (painel C). A hipernociceção foi induzida pela PKC ϵ ψ RACK (1 μ g, i.pl.) (painel A), pela subunidade catalítica de PKA (1U / 100 μ l, i.pl.) (painel B) ou pelo dbAMPc (100 μ g, i.pl.) (painel C). O antagonista de NMDARs D-AP-5 (9 μ g) foi administrado diretamente no GRD (i.g.) 30 minutos antes dos estímulos inflamatórios. A hipernociceção mecânica foi avaliada até a quarta hora pelo teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os símbolos \square , \blacktriangle , \blacktriangledown e \blacklozenge representam a média \pm epm de 5 animais por grupo. **Painel A:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.g.)+salina (i.pl.) e DAP5 (i.g.)+salina (i.pl.); # indica $p < 0,001$ em relação ao grupo DAP5 (i.g.)+PKC (i.pl.); **Painel B:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.pl.)+DAP5 (i.g.) e salina (i.pl.)+salina (i.g.); # indicam $p < 0,001$ em relação ao grupo PKA (i.pl.)+DAP5 (i.g.); + indica $p < 0,001$ em relação aos grupos PKA (i.pl.)+salina (i.g.); salina (i.pl.)+DAP5 (i.g.) e salina (i.pl.)+salina (i.g.); **Painel C:** * indicam $p < 0,001$ em relação aos grupos salina (i.pl.)+salina (i.g.); salina (i.pl.)+DAP5 (i.g.) e dbAMPc (i.pl.)+DAP5 (i.g.) (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

A *dor*, definida como a *percepção*, com tonalidade afetiva desagradável, aversiva ou oposta ao prazer, de uma *sensação* induzida por estímulos nociceptivos, é o principal tema deste estudo, que aborda, entre outros aspectos, fenômenos geralmente associados ao processo inflamatório e às vias neuronais de transmissão da dor. Considerando o estímulo nociceptivo em si, ou seja, aquele capaz de ativar as vias de transmissão nociceptivas, nosso foco se limitará às fibras nervosas de alto limiar de ativação (nociceptores). Estas fibras, bastante relacionadas ao fenômeno de hipernocicepção inflamatória, quando estimuladas, conduzem potenciais de ação que levarão a informação até os centros superiores, para ser então interpretada como a sensação *dor* ou *nocicepção*. Nesse sentido, foi amplamente demonstrado que alterações metabólicas nas células neuronais facilitam a detecção e condução da informação nociceptiva, havendo aumento na intensidade da sensação dolorosa. Esse fenômeno, já comentado no capítulo de introdução deste trabalho, denominado *hiperalgesia* ou *hipernocicepção*, foi abordado sob o ponto de vista neurofisiológico, com ênfase no papel de receptores presentes nos corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) e no efeito autócrino da liberação do neurotransmissor glutamato (GLU, um dos mais importantes neurotransmissores do sistema nervoso) neste sítio.

Um dos mecanismos envolvidos na hipernocicepção de origem inflamatória foi descrito primeiramente na última década do século passado (FERREIRA; LORENZETTI, 1994, 1996) e denominado “sensibilização retrógrada do neurônio aferente primário”. Neste estado, inicialmente considerado como ocorrendo no terminal central dos neurônios aferentes, haveria liberação de GLU, que ativaria receptores do tipo N-metil-D-Aspartato (NMDARs) localizados na membrana pré-sináptica, levando à sensibilização no sentido eferente da célula neuronal. Em outras palavras, seria uma espécie de mecanismo de “retroalimentação” positiva, que manteria o neurônio em um estado “mais ativável”, após um processo inflamatório periférico. Além disso, características estruturais e funcionais desses receptores, que possuem importante papel na transmissão espinal da informação nociceptiva de origem inflamatória (REN et al., 1992; AANONSEN et al., 1990; MALMBERG; YAKSH, 1992; MINAMI et al., 1994; URBAN; GEBHART, 1999; WOOLF; DOUBELL, 1994), influenciariam diretamente determinados aspectos desse fenômeno. Por exemplo, a fosforilação de estruturas fundamentais para a presença da hiperalgesia, como os canais de sódio Nav1.8, foi claramente relacionada à ativação de NMDARs durante a sensibilização neuronal (PARADA et al., 2003). Dessa forma, nosso estudo tem como objetivo principal

contribuir para o maior entendimento sobre o papel destes receptores na hipernocicepção retrógrada do neurônio sensorial primário e, em sentido mais amplo, colaborar para o aumento do conhecimento sobre a fisiologia da dor de origem inflamatória.

Considerando que as prostaglandinas (PGs) induzem a liberação de neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos (MILLAN, 1999), possibilitando a transmissão da informação aos neurônios de segunda ordem, mas também induzindo, via GLU (atuando no terminal pré-sináptico), sensibilização retrógrada (FERREIRA; LORENZETTI, 1996), sugeriu-se a participação significativa de receptores glutamatérgicos na hipernocicepção periférica. Além disso, um subtipo específico de receptor glutamatérgico pré-sináptico, os NMDARs, seria fundamental para a indução e a manutenção desta hipernocicepção inflamatória. Essa premissa foi baseada na demonstração de que a administração intratecal (i.t.) do agonista desses receptores (NMDA) causava sensibilização mecânica bilateral de longa duração (FERREIRA; LORENZETTI, 1994, 1996), de modo semelhante à PGE₂ i.t.. Mais ainda, foi demonstrado também que o sítio desta hipernocicepção era o neurônio primário, já que esta era inibida por morfina administrada na pata dos animais.

Entretanto, dados obtidos em nosso laboratório mostraram que drogas administradas por via i.t. poderiam atingir diretamente os GRDs dos neurônios aferentes primários, exercendo efeito nestas estruturas. Embora o GRD seja considerado apenas o centro metabólico de suporte para as células neuronais aferentes, este fato, aliado à sua localização, protegida (sob os processos ósseos vertebrais) e estratégica (devido à sua metade proximal estar dentro do espaço subaracnóide e sua metade distal estar localizada fora da barreira meníngea (PORRECA et al., 1999; MICHAEL et al., 1997)), sugere um papel diferenciado desta estrutura. A excitabilidade dos corpos celulares presentes nos GRDs indica que potenciais de ação podem ser gerados nesta região (DEVOR, 1999), o que não é uma característica comum em outros neurônios. Além disso, o corpo celular dos neurônios do GRD é ricamente dotado de moléculas receptoras para mediadores inflamatórios e capsaicina (SHINDER; DEVOR, 1994), o que indica que esta estrutura pode ter alguma função na produção da informação sensorial relacionada aos tecidos circundantes. Desta forma, devido à possibilidade de responderem a estímulos vindos tanto do espaço subaracnóide quanto dos tecidos periféricos, alguns estudos realizados com injeções intratecais podem ter interpretações diferentes das apresentadas. Com relação aos experimentos que demonstraram inicialmente a sensibilização retrógrada, estes foram realizados por meio de injeções intratecais das drogas agonistas e antagonistas, de modo que levantamos a hipótese de que tais

drogas poderiam estar agindo diretamente nos GRDs, em adição aos receptores presentes no terminal pré-sináptico. Nossos resultados mostraram que nossa hipótese é relevante, uma vez que a hipernocicepção induzida pelo NMDA administrado por via intraganglionar (i.gl.) se apresentou semelhante, tanto na intensidade quanto no desenvolvimento temporal, à hipernocicepção induzida pelo NMDA administrado por via i.t. (**figura 4.1b**), apesar de haver diferença na dose efetiva em induzir hipernocicepção no GRD (240 ng) em relação à dose efetiva na medula espinal (80 ng) (**figura 4.1a, painéis B e A**, respectivamente). Tal diferença poderia ser explicada talvez por uma ativação tanto de receptores pré-sinápticos quanto pós-sinápticos pelo NMDA administrado via i.t.. Porém, o fato de o desenvolvimento da hipernocicepção induzida pelo NMDA i.gl. ou i.t. ter se apresentado semelhante ao da induzida pela PGE₂ administrada na pata dos animais, poderia levar à suposição de que o NMDA estimularia a liberação de PGs no local administrado, que atuariam nos respectivos receptores, causando a sensibilização retrógrada. Com base no conceito de que o mecanismo de ação das drogas semelhantes à aspirina (antiinflamatórios não-esteroidais – AINEs) é a inibição da síntese de PGs, prevenindo assim a sensibilização dos nociceptores (ROBERTS; MORROW, 2001), o bloqueio da sua síntese deveria inibir, caso isso realmente ocorresse, a hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t. ou i.gl.. Nossos resultados demonstraram, contudo, que isso não ocorre, uma vez que a mesma não foi prevenida pelo pré-tratamento com o inibidor não-seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) indometacina, administrado via intraperitoneal (i.p., **figura 4.2, painel A**) ou i.t. (**figura 4.2, painel B**). Novamente, considerando a possibilidade dos NMDARs estarem não apenas localizados nos terminais pré-sinápticos mas, sim, nos GRDs, aventamos a hipótese de uma participação de extrema relevância destes receptores ganglionares neste processo retrógrado. Com base nesta premissa, administramos o antagonista específico de NMDARs D-AP-5 diretamente no GRD, que bloqueou a hipernocicepção induzida pela administração i.pl. de PGE₂ (**figura 4.4, painel A**) ou pelo NMDA administrado na medula espinal (**figura 4.4, painel B**). Isso nos sugere fortemente que: A) a PGE₂ induz liberação de GLU no GRD, que agiria em receptores também aí localizados, e B) o NMDA administrado por via i.t. agiria em receptores ganglionares para induzir hipernocicepção. Esse resultado está em harmonia com os dados apresentados por Parada et al. (PARADA et al., 2003), nos quais os NMDARs pré-sinápticos contribuiriam para a sensibilização retrógrada, já que estes autores mostraram a presença funcional de tais receptores nos GRDs durante a hipernocicepção inflamatória. Embora outros autores também tenham demonstrado a presença destes receptores nos neurônios primários (LIU et al., 1994; LIU et al., 1997; HERRERO et al., 1992), sua localização especificamente

no GRD e susceptibilidade a drogas que podem ter efeito analgésico mostram sua importância funcional durante a hipernocicepção. Ainda, aparentemente também há expressão de NMDARs nos corpos celulares que, além de serem transportados para os terminais neuronais, podem permanecer na membrana das células no GRD, sendo ativados durante o processo de sensibilização neuronal.

Por outro lado, a literatura recente tem demonstrado que as células de suporte neuronal, as chamadas *células da glia*, também podem participar do processo sensorial. Estas células eram consideradas, até pouco tempo atrás, apenas coadjuvantes das vias sensoriais, pois controlariam o microambiente ao redor dos neurônios, com papel limitado à regulação da transmissão sináptica por removerem o excesso de neurotransmissores liberados nas sinapses (HAYDON, 2001; NEDERGAARD et al., 2003). Porém, sua importante posição durante estados patológicos como dor e inflamação, demonstrada por diversos autores recentemente, acrescentou mais uma variável aos estudos da transmissão nociceptiva (ALDSKOGIUS; KOZLOVA, 1998; WATKINS; MAIER, 2002). Desta forma, achamos interessante a verificação da possível participação de tais células na sensibilização retrógrada, uma vez que, estando localizadas extremamente próximas aos neurônios, poderiam liberar mediadores que ativariam receptores neuronais. A demonstração da presença de mediadores como o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) (OHTORI et al., 2004; SHIMFELD et al., 1999) e PGs (VESIN et al., 1995) e seus respectivos receptores nestas células gliais periféricas (HANANI, 2005) reforçou nossa suspeita sobre a possibilidade destas serem ativadas no GRD, liberando mediadores que sensibilizam os neurônios primários. Com isso em mente, administramos, via i.t., o inibidor de metabolismo de células da glia fluorocitrato, para verificarmos se haveria alteração na hipernocicepção induzida pelo NMDA i.gl., cujos receptores estão, segundo nosso **experimento 4.4**, diretamente relacionados à hipernocicepção induzida tanto pela PGE₂ i.pl. quanto pelo NMDA i.t.. Contudo, apesar de não termos observado alterações na intensidade da hipernocicepção, o que significaria que tais células realmente não participam da sensibilização induzida pelo NMDA i.gl. (**figura 4.3**), não havíamos levado em conta que as células da glia que envolvem os neurônios na medula espinal são diferentes das células gliais presentes nos GRDs, conhecidas como *células satélites*. Nosso experimento-controle realmente não mostrou alteração nestas células ao redor do GRD (cultura de neurônios do GRD e células satélites não alteradas pelo fluorocitrato; dados não mostrados), mas nos justificamos pelo fato de que não há drogas inibidoras exclusivas para células satélites disponíveis no mercado, o que impede a realização de tal controle. Entretanto, e uma vez que este dado era de extrema importância para nossos resultados, posteriormente introduzimos a

metodologia de microscopia confocal em nossos protocolos, pois isso possibilitaria a observação da ativação de tais células da glia. Até então, porém, podíamos apenas afirmar que células da glia comuns não participam da hipernocicepção induzida pela administração de NMDA diretamente no GRD (i.gl.).

Em uma segunda etapa de nossos experimentos, visamos verificar a importância dos NMDARs ganglionares não apenas na *manutenção* da hipernocicepção induzida pela PGE₂, mas também na sua *indução*. Se antes os experimentos haviam demonstrado que os NMDARs presentes no GRD, e não no terminal pré-sináptico, como antes se supunha, eram importantes na hipernocicepção avaliada na terceira hora, nossos resultados mais recentes mostraram que o papel desses receptores glutamatérgicos é fundamental durante todo o processo de sensibilização neuronal periférica, principalmente pela sua propriedade de induzir sensibilização retrógrada. A inibição do desenvolvimento da hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂ i.pl. pelo pré-tratamento i.gl. com o antagonista de NMDARs D-AP-5 (**figura 4.5**) sugere fortemente que a ativação desses receptores no início dos eventos que culminam na sensibilização neuronal é condição essencial para o restante do processo. Mais ainda, estes experimentos mostraram que, uma vez cessado o efeito do D-AP-5, há tendência de retorno da hipernocicepção (**figuras 4.5 e 4.6**), o que indica que pode estar havendo liberação constante de GLU e ativação de NMDARs ganglionares durante todo o tempo de duração da hipernocicepção. Interessantemente, a duração da ação do D-AP-5 administrado via i.t. foi menor que a da mesma droga administrada via i.gl., o que indica que, apesar das drogas administradas por via i.t. atingirem e exercerem ação sobre o GRD, a administração de drogas diretamente no GRD pode levar a efeitos mais duradouros devido à maior concentração da droga nas células ganglionares. Essa pode ser uma explicação para a diferença de tempo de efeito do D-AP-5 i.t. e i.gl.. Ainda, nossa suspeita sobre a participação dos NMDARs ganglionares na manutenção da hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. foi reforçada por nosso **experimento 4.7**, que foi baseado em evidências da literatura que mostraram a diferença no tempo de duração da hipernocicepção induzida pela administração na planta da pata de ratos no tecido subcutâneo (s.c.) de PGE₂ e no tecido dérmico (i.d.) (VIVANCOS et al., 2003). Embora seja possível que as fibras neuronais que inervam o tecido superficial sejam diferentes das que inervam os tecidos profundos, de modo que seriam, como neste caso, diferentemente susceptíveis à ação de drogas, o fato é que, pelo menos neste momento, os resultados apontam para uma diferença nos mecanismos celulares envolvidos neste efeito. Em relação à ativação de NMDARs, os dados mostraram que no caso das injeções s.c. de PGE₂ o componente retrógrado de sensibilização parece ser atuante (**figura**

4.7, painel A), enquanto que, de maneira contrária, quando a PGE₂ é administrada por via i.d., isso não acontece (**figura 4.7, painel B**). Uma vez que a hipernocicepção induzida pela PGE₂ s.c. dura cerca de seis horas, atingindo o pico de intensidade na terceira hora, e a induzida pela PGE₂ i.d. induz hipernocicepção com duração de apenas uma hora, com intensidade máxima atingida aos 15 minutos, que não é bloqueada pelo D-AP-5 i.gl., é-nos confortável propor que o mecanismo de ação desta PGE₂ i.d. seja NMDARs-independente, ao contrário do primeiro caso. Além disso, pode ser que a liberação de GLU ocorra continuamente durante a sensibilização neuronal induzida pela injeção s.c. de PGE₂, mantendo o estado sensibilizado do neurônio primário. Vale ainda dizer que os mecanismos limitantes desse efeito ainda são desconhecidos e certamente serão alvo de estudos futuros.

A participação de diversos subtipos de receptores glutamatérgicos na transmissão da informação nociceptiva e hipernociceptiva é tema vários trabalhos (REN et al., 1992; YAMAMOTO; YAKSH, 1992), entretanto, a sensibilização retrógrada é considerada ser dependente da ativação específica de NMDARs pré-sinápticos e, segundo nossas observações, dependente de NMDARs localizados no GRD. Antagonistas de receptores AMPA não foram efetivos em bloquear a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. (FERREIRA; LORENZETTI, 1994), o que indica estes receptores ou não estariam envolvidos na sensibilização induzida pela PGE₂ i.pl., ou não estariam presentes no neurônio aferente primário. Porém, alguns estudos mostraram a presença funcional desses receptores no terminal pré-sináptico de neurônios aferentes (SPRENGEL, 2006), embora em outras circunstâncias. Dessa forma, para verificarmos se receptores AMPA localizados no GRD estão envolvidos na sensibilização induzida pela PGE₂ i.pl., administramos a droga antagonista de receptores AMPA DNQX por via i.t. ou i.gl. (**figura 4.8b**). No entanto, observamos apenas o bloqueio da hipernocicepção pelo DNQX i.t., o que indica que somente receptores AMPA pós-sinápticos estariam envolvidos na transmissão da informação hipernociceptiva, enquanto os responsáveis pela sensibilização retrógrada são, de fato, os NMDARs localizados no GRD. Esses dados estão em concordância com o **experimento 4.8a**, que mostrou que a administração do agonista de receptores AMPA no GRD não induz hipernocicepção, ao contrário da administração de AMPA por via i.t. (**figura 4.8a**).

Até o momento nosso achado principal foi a presença de NMDARs no GRD e a sua participação na hipernocicepção retrógrada. Contudo, considerando que estes receptores são compostos por diversas subunidades, que influenciam suas propriedades funcionais, procuramos verificar qual a relevância destas na sensibilização induzida pela PGE₂. A literatura descreve a existência de sete tipos de unidades estruturais (NR1, NR2a-d e NR3a-b),

que se combinam de maneira tetramérica, formando os NMDARs (DAS et al., 1998; LYNCH et al., 1994; MCBAIN; MAYER, 1994; PEREZ-OTANO et al., 2001). Estes receptores têm sido consideravelmente estudados devido ao seu papel tanto no desenvolvimento quanto no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), além de sua participação em processos patológicos e neurodegenerativos (MELZACK et al., 2001). Além disso, tiveram seu papel na sensibilização neuronal periférica evidenciado em trabalhos que mostraram a inibição da hipernocicepção induzida por carragenina ou PGE₂ por antagonistas de NMDARs como o D-AP-5 (competitivo) e o MK801 (não-competitivo) (FERREIRA; LORENZETTI, 1996; 1994). Embora alguns trabalhos tenham determinado a presença de subunidades específicas destes receptores em certos tecidos, como o hipocampo (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004) e o próprio GRD (LI et al., 2004), o papel específico de cada uma destas subunidades nos fenômenos mediados pela ativação destes receptores ainda não está descrito. Neste sentido, nosso próximo passo foi bloquearmos temporariamente a expressão (*knock down*) de cada uma destas subunidades por meio da administração de oligodeoxinucleotídeos-antisenses (ODN-AS) especificamente desenhados para cada subunidade, para avaliarmos a relevância de cada uma destas na hipernocicepção mecânica induzida pela PGE₂. Porém, previamente foi necessária a padronização da leitura da expressão de RNAm para cada uma das mesmas, para que pudéssemos determinar a expressão de cada subtipo no GRD (**figura 4.9, painel B**) e, após o tratamento com ODN-AS, conferir se os mesmos realmente inibiram a expressão destas estruturas (**figura 4.10, painel B**). Como controle positivo, aplicamos a mesma metodologia em tecido recolhido do cerebelo de ratos, descrito em vários trabalhos possuir NMDARs compostos por todas as subunidades (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004) (**figura 4.9, painel A**). De fato, a presença de todas as subunidades também foi verificada no GRD (**figura 4.9, painel B**), embora isso não signifique que todas participem do fenômeno de sensibilização retrógrada.

O *knock down* temporário por meio da administração dos ODN-AS contra cada uma das subunidades de NMDARs diretamente no GRD mostrou que algumas dessas subunidades parecem ter mais importância para a hipernocicepção retrógrada que outras. Ao contrário dos experimentos nos quais o *knock down* é realizado por meio da administração i.t. de ODN-AS, que podem atuar nos neurônios secundários, a administração dos ODN-AS diretamente no GRD depletou essas estruturas apenas nos neurônios primários. Os nossos resultados sugeriram que as subunidades NR1, NR2b, NR2d e NR3a participam da hipernocicepção, apesar do *knock down* das duas últimas subunidades ter inibido a hipernocicepção induzida

pela PGE₂ administrada na pata dos animais de maneira menos intensa (**figura 4.10, painel A**).

Esse resultado pode ser interpretado com base em trabalhos que indicam que a subunidade NR1 é essencial para o funcionamento dos NMDARs (PAOLETTI; NEYTON, 2007; MONYER et al., 1992). Assim, já era esperado que sua depleção diminuísse a hipernociceção induzida pela PGE₂ i.pl.. Da mesma maneira, a depleção das subunidades NR2b também diminuiu a intensidade de hipernociceção à estimulação mecânica, o que também está de acordo com estudos que mostram que esta subunidade está relacionada à transmissão da informação (hiper)nociceptiva periférica (LI et al., 2004; BENNETT et al., 2000; CAIRNS et al., 2003; VACCARINO et al., 1997). Já com relação às subunidades NR2d e NR3a, não há trabalhos que indiquem sua participação na hipernociceção periférica, sendo esse resultado primeiramente observado por nós (**figura 4.10, painel A**).

Segundo alguns estudos, NMDARs que contém a subunidade NR2d parecem possuir cinética diferente de funcionamento, produzindo respostas mais lentas, levando a um estado refratário mais prolongado (CULL-CANDY; LESZKIEWICZ, 2004). Como isto pode influenciar na transmissão da informação nociceptiva nos neurônios periféricos ainda não é conhecido, embora tenha sido descrito que os NMDARs que possuem as subunidades NR2c e NR2d apresentam baixa condutância de Ca⁺² e menor sensibilidade ao bloqueio por Mg⁺² (WYLLIE et al., 1998). Do mesmo modo, e de maneira interessante, as subunidades NR3 também parecem diminuir a sensibilidade ao bloqueio pelo Mg⁺². Foi demonstrado que, quando estas subunidades (NR3a ou NR3b) são co-expressas com a subunidade NR1, os NMDARs podem se tornar mais fáceis de serem ativados, possibilitando a entrada de cátions, o que poderia aumentar a excitabilidade das células (CHATTERTON et al., 2002). Sob esse ponto de vista, pode-se então explicar o fato da administração do agonista NMDA diretamente no GRD induzir hipernociceção sem que tenha havido despolarização prévia (necessária para a remoção do “plug” de Mg⁺²): os NMDARs ganglionares possuem subunidades NR3, provavelmente do subtipo NR3a (pois o *knock down* da subunidade NR3b não alterou a hipernociceção induzida pela PGE₂), em sua composição.

Ferreira et al. (FERREIRA; LORENZETTI, 1996) já haviam demonstrado que a administração i.t. de PGE₂ induz hipernociceção passível de ser bloqueada por morfina ou dipirona injetados na pata dos animais. Isso levantou a hipótese de que existe um mecanismo de comunicação entre as extremidades da célula neuronal, de modo que eventos que ocorrem em um terminal interagem com eventos presentes no terminal oposto. Em outras palavras, os neurônios sensoriais primários funcionariam como *unidades integradas* e, durante a

sensibilização, esse mecanismo estaria funcionando constantemente. Assim, com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que, na realidade, a sensibilização retrógrada é uma parte do fenômeno de hipernocicepção. Mais ainda, os processos a ela associados são justamente o mecanismo de integração neuronal sugerido até o momento.

Com relação a essa integração dos segmentos neuronais (terminais periféricos, corpos celulares e terminais centrais), a presença de um sistema de comunicação rápido por meio do fenômeno das oscilações de cálcio (Ca^{+2}), ou CICR (do inglês *calcium-induced-calcium-release*), foi sugerida (PARADA et al., 2003). Neste processo, uma modesta elevação na concentração de Ca^{+2} intracelular é amplificada por uma liberação secundária de Ca^{+2} de estoques intracelulares, que se propaga pela célula continuamente (USACHEV; THAYER, 1999). A entrada de Ca^{+2} na célula por ativação de NMDARs poderia induzir a CICR em neurônios (LAZAREWICZ et al., 1998) sensoriais primários, sendo este, portanto, um possível mecanismo para transmissão retrógrada do sinal glutamatérgico. Apesar do papel desempenhado pela CICR em neurônios primários não estar totalmente claro, este processo foi observado em culturas de gânglios das raízes dorsais (USACHEV; THAYER, 1997; AYAR; SCOTT, 1999; CURRIE; SCOTT, 1992; CURRIE et al., 1992; CURRIE et al., 1995) e diversos estudos sugeriram envolvimento da mobilização de Ca^{+2} na sensibilização. Trabalhos realizados *in vivo* demonstraram que vários dos mediadores responsáveis pela sensibilização do neurônio primário, como a PGE_2 , a bradicinina e a serotonina, induzem influxo de Ca^{+2} (LINHART et al., 2003). Diante disso, propusemos que este sistema poderia ser o responsável pela sensibilização neuronal como um todo, integrando os vários segmentos de sua estrutura, explicando o fato da PGE_2 sensibilizar o neurônio aferente independente do local de sua administração, como demonstrado em trabalhos de nosso laboratório.

A ocorrência de CICR pode promover a sensibilização do nociceptor e agentes que bloqueiam a oscilação de Ca^{+2} podem apresentar efeitos analgésicos, sendo inclusive este um dos possíveis mecanismos pelo qual a administração de morfina ou dipirona na periferia inibe a sensibilização retrógrada induzida por PGE_2 i.t. (FERREIRA; LORENZETTI, 1996) ou por ativação de NMDARs (PARADA et al., 2003). Se a PGE_2 sensibiliza o neurônio como um todo via mecanismos iônicos, como a CICR, a antinocicepção promovida pela morfina pode ocorrer interrompendo este fenômeno. Assim, verificamos a possibilidade de indução da CICR pela ativação de NMDARs, já que estes são canais com alta permeabilidade ao Ca^{+2} que, uma vez ativados, podem levar ao aumento na concentração intracelular de Ca^{+2} (MAYER; WESTBROOK, 1987) suficiente para iniciar as correntes oscilatórias.

A partir de nossa hipótese principal de que a estimulação de ondas de Ca^{+2} (CICR) é um dos mecanismos pelo qual a ativação de NMDARs induz a sensibilização retrógrada, e pelo fato de que a injeção i.pl. de PGE_2 causa sensibilização via ativação destes receptores, investigamos se a hipernocicepção causada pela PGE_2 está relacionada à indução da CICR. Os dados obtidos mostraram que o Ca^{+2} intracelular presente no local do estímulo parece ser importante para o início do fenômeno (**figura 4.11, painel A**), mas não para sua manutenção (**figura 4.11, painel B**). Além disso, o fato de que os receptores que controlam o nível dos estoques de Ca^{+2} intracelular participam da hipernocicepção induzida tanto pela PGE_2 i.pl. quanto pelo NMDA i.t. (**figura 4.12**) indica mais uma vez que pode haver relação entre esses eventos. O bloqueio pelo dantrolene de canais rianodine, também descritos como participantes da CICR (AYAR; SCOTT, 1999; DAYANITHI et al., 2006), no GRD, ou seja, longe do local do estímulo, inibiu a hipernocicepção e a sensibilização retrógrada (**figura 4.12, painéis A e C**), o que indica que os mesmos são ativados durante o fenômeno e permanecem assim, talvez justamente induzindo a CICR. Em conjunto, os dados desse experimento mostram que a PGE_2 i.pl. realmente induz liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares no GRD (**figura 4.12, painéis A e B**). Entretanto, uma vez que o bloqueio desses canais rianodine também inibiu a hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t. (**figura 4.12, painel C**), é possível que haja uma interação entre a região periférica neuronal e o GRD por meio da liberação ganglionar de GLU estimulada pela PGE_2 , que ativaria os NMDARs ganglionares, permitindo a entrada de Ca^{+2} , levando à ativação da CICR via receptores rianodine.

O envolvimento do aumento de Ca^{+2} intracelular na sensibilização de neurônios do GRD por PGE_2 também foi observado em experimentos realizados *in vitro*, por meio de microscopia confocal. Se os experimentos anteriores utilizando o quelante de cálcio BAPTA-AM e dantrolene mostraram inibição do efeito da PGE_2 por essas drogas, sugerindo que esta induz influxo e aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular, os experimentos *in vitro* mostraram que, de fato, a PGE_2 induz oscilações de Ca^{+2} nos neurônios (**experimento 4.14**), e, mais ainda, que esse Ca^{+2} é proveniente tanto do meio extracelular (**figura 4.15, painel A**) quanto intracelular (**figura 4.14, painéis B e C**), originado da liberação de estoques do retículo endoplasmático. Assim, é bastante plausível sugerirmos a associação do fenômeno das oscilações de Ca^{+2} (USACHEV; THAYER, 1999; JOHENNING et al., 2002; RIZZUTO, 2001) ao mecanismo de integração entre as diversas regiões da célula neuronal, o que já havia sido sugerida por Parada et al. (PARADA et al., 2003), que especulou sobre a relação desse fenômeno com a sensibilização retrógrada, associando-o, ainda, aos NMDARs. Aliás, em nossos experimentos, os neurônios cultivados também foram ativados pela administração de

NMDA (250 μ M) (**figura 4.13b**), uma demonstração bastante contundente no que se refere à presença de NMDARs nos corpos celulares dos neurônios do GRD.

Até o momento, nossa hipótese de que o fenômeno de sensibilização retrógrada poderia ocorrer por meio de uma seqüência de eventos, como a ativação de receptores prostanóides na periferia, liberação de glutamato (GLU) – não no terminal sináptico apenas, mas no GRD – e ativação (autócrina ou parácrina) de NMDARs presentes no GRD, com indução de oscilações de Ca^{+2} e hipernocicepção difusa por todo o neurônio primário, parecia estar correta. Entretanto, surpreendemo-nos com a observação de que, em culturas de três dias de células do GRD, a aplicação do agonista NMDA induzia ativação mais intensa de células não-neuronais (ou seja, células da glia que envolvem os corpos celulares - as células satélites) que dos neurônios presentes nas culturas (**figura 4.17a, painéis A, B e D**). Isso foi possível devido ao fato de que o maior tempo de espera para uso das culturas possibilitou o crescimento dessas células gliais. Mais ainda, em culturas de células satélites isoladas, o NMDA (250 μ M) também causou despolarização (**figura 4.17b, painéis E, F e G**), mostrando que essas células expressam NMDARs, que poderiam ser justamente os receptores ativados pelo GLU liberado pelos corpos celulares neuronais no GRD. Inclusive, correlacionando com nossos experimentos de *knock down* de subunidades de NMDARs (ver acima), a técnica de administração de drogas por nós utilizada (injeção intraganglionar – (FERRARI et al., 2007)) pode ter depletado as subunidades presentes nas células satélites, já que estas estão em íntimo contato com os corpos celulares neuronais e provavelmente foram atingidas pelos ODN-AS injetados.

Para verificarmos se os corpos celulares dos neurônios podem liberar GLU, realizamos a marcação com anticorpos para vesículas transportadoras de GLU, responsáveis pela liberação do neurotransmissor para o meio extracelular. De fato, a marcação foi intensa (**figura 4.18a**), sugerindo que os neurônios podem liberar GLU no GRD. Além disso, também fizemos marcações para células satélites e para vesículas de GLU, co-localizando estas duas marcações posteriormente (**figura 4.18b**). A co-localização dessas duas marcações, além de mostrar que as células satélites também contêm vesículas de GLU, mostrou a íntima relação entre estas e os corpos neuronais (**figura 4.18b, painel F**). Assim, podemos sugerir que existe a possibilidade de liberação de GLU pelos neurônios e ativação de NMDARs gliais. Inclusive, com base nestas observações, pode ser que o mediador liberado pelas células satélites após a ativação de NMDARs seja o próprio GLU, já que essas células também possuem vesículas para liberação desse neurotransmissor.

A ativação de NMDARs leva ao influxo de Ca^{+2} nas células, o que ativaria o fenômeno CICR, levando à liberação de neurotransmissores ou, ainda, ser ele próprio o fenômeno responsável pela sensibilização da célula neuronal como um todo. A administração do agonista NMDA nas culturas de células satélites causou oscilações de Ca^{+2} (**figura 4.19**) que foram inibidas pelo tratamento das culturas com dantrolene. Esse fato correlaciona muito bem a ativação de NMDARs à CICR nas células satélites, fato este não demonstrado anteriormente.

Também é oportuno lembrar que os NMDARs são canais iônicos permeáveis preferencialmente ao íon Ca^{+2} (MONYER et al., 1992; LEE et al., 2004), e que, em estado de repouso, se encontram bloqueados por um “*plug*” de Mg^{+2} voltagem-sensível (BLEAKMAN et al., 2006; DINGLELINE et al., 1999; YAMAKURA; SHIMOJI, 1999). Dessa forma, para que seja ativado, é necessário que haja despolarização prévia, liberando o Mg^{+2} , permitindo a passagem de íons para dentro da célula. Um fato curioso que observamos foi que, em culturas de células satélites, a adição de Mg^{+2} ao meio de cultura não alterou o efeito indutor de oscilações de Ca^{+2} induzido pela administração de NMDA (**figura 4.20**). Na verdade, o que esperávamos era um bloqueio dos NMDARs pelo Mg^{+2} em excesso. No entanto, o fato de nada ter ocorrido sugere fortemente o que já havíamos referido acima, que é a presença de NMDARs formados pelas subunidades NR3, as quais parecem diminuir a sensibilidade dos NMDARs ao bloqueio pelo Mg^{+2} (CHATTERTON et al., 2002). Com relação ao seu papel na hipernocicepção, é provável que a subunidade que nos interessa e que está presente nestas células gliais seja a NR3a, cujo *knock down* inibiu de maneira significativa a hipernocicepção induzida pela PGE_2 i.pl. (**figura 4.10, painel A**).

Outro fato que nos chamou a atenção foi que, em culturas de células do GRD, as células satélites exibem oscilações de Ca^{+2} o tempo todo (**figura 4.21a**). Ainda, tais oscilações foram bloqueadas pelo D-AP-5 (100 μM) (**figura 4.21b, painel C**) e pelo dantrolene (10 μM) (**figura 4.21c, painel E**), adicionados na cultura. Em uma análise primária, uma vez que essas culturas possuem tanto corpos neuronais quanto células satélites, isso nos sugere que deve haver uma espécie de liberação tônica de GLU (que pode ser tanto pelos neurônios quanto pelas próprias células satélites), que ativaria constantemente os NMDARs gliais, causando influxo de Ca^{+2} e ativação de receptores rianodine, estimulando a CICR. Porém a função destas oscilações de Ca^{+2} constantes nas células satélites deve ser investigada em outra oportunidade.

Todos estes resultados nos sugerem que existe a liberação de GLU pelo neurônio primário, atuando em NMDARs presentes nas células satélites, com conseqüente entrada de

Ca⁺² e ativação da CICR. Se antes tivemos dificuldades para determinarmos o papel das células satélites no fenômeno da hipernocicepção retrógrada, o uso da microscopia confocal superou tal obstáculo além de se mostrar uma ferramenta experimental bastante útil, já que somente os experimentos comportamentais não foram suficientes para demonstrarmos nossas proposições. A ativação dessas células, representada pelo influxo de Ca⁺² e fluorescência, pode ser correlacionada com a ativação neuronal e hipernocicepção observadas nos experimentos comportamentais. Até o momento, os resultados aqui apresentados são bastante indicativos dessa relação supracitada “liberação de GLU pelo neurônio aferente no GRD – ativação de NMDARs nas células satélites – estimulação da CICR – sensibilização retrógrada”. No entanto, a determinação do mediador liberado pelas células satélites é um objetivo a ser trabalhado posteriormente.

Embora este mecanismo de CICR tenha sido nossa primeira proposta de mecanismo pelo qual ocorreria comunicação entre as diferentes regiões da célula neuronal durante a hipernocicepção inflamatória, a ativação de segundos-mensageiros intracelulares, como proteínas quinases, por exemplo, em diferentes intervalos de tempo, sugere uma espécie de “conversa” entre esses mensageiros, que atuariam em conjunto, ou em seqüência, durante a sensibilização neuronal.

Trabalhos demonstrando a participação de proteínas quinases (PKA – proteína quinase dependente de AMPc – e PKC – proteína quinase C) ativadas por mediadores inflamatórios na indução de hiperalgisia (CUNHA et al., 1999) deram impulso aos estudos que relacionam a ativação de segundos-mensageiros intracelulares a eventos que culminam em mudanças no fluxo iônico através da membrana neuronal e conseqüente alteração do limiar de ativação dos neurônios sensoriais. Embora os eventos moleculares associados à hipersensibilidade mecânica induzida por mediadores inflamatórios ainda não estejam totalmente compreendidos, as evidências experimentais de aumento intracelular de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e Ca⁺² (HINGTGEN et al., 1995) após a administração de PGE₂ (FERREIRA; NAKAMURA, 1979) levaram a estudos posteriores focalizando os segundos-mensageiros intracelulares que levariam às últimas instâncias da sensibilização dos nociceptores.

Uma vez que os receptores para prostanóides estão acoplados à enzima adenilato-ciclase (HINGTGEN et al., 1995; AANTAA et al., 1995; NAMBA et al., 1994), a qual, uma vez ativada, converte adenosina-difosfato (ADP) em AMPc, foi sugerida a participação do AMPc na sensibilização do neurônio sensorial primário. Isso foi claramente evidenciado por

meio de modelos experimentais de hipernocicepção mecânica (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; TAIWO; LEVINE, 1991). Além disso, observou-se que o H89, um inibidor da enzima proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (LYNN; O'SHEA, 1998), inibe a hiperálgia induzida por PGE₂ i.pl. de maneira dose-dependente (CUNHA et al., 1999). Portanto, sugere-se que a PGE₂ produz hipernocicepção mecânica devido ao aumento de AMPc (FERREIRA; NAKAMURA, 1979), que ativaria a PKA no neurônio sensorial primário (CUNHA et al., 1999), levando à ativação ou fosforilação de canais iônicos e/ou modulação de estruturas citosólicas que controlam os níveis intracelulares de Ca⁺² (OUSEPH et al., 1995; LYNN; O'SHEA, 1998; SLUKA et al., 1997; TAIWO et al., 1992; WANG et al., 1996). Estes dados, aliados a demonstrações obtidas em nosso laboratório do aumento de expressão da PKA nos GRDs 1 hora após a administração de PGE₂ (dados não publicados), sugerem também que eventos intracelulares iniciados em uma extremidade neuronal podem ser ativados subsequente, de maneira a ativar eventos em regiões distantes do local inicial onde ocorreu o estímulo, como em um mecanismo de comunicação intracelular. Entretanto, 3 horas após a administração i.pl. de PGE₂, não foi detectado tal aumento na expressão desta proteína quinase no GRD, o que estaria em harmonia com resultados nossos que demonstraram que a administração i.gl. de H89 não inibe a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. (**figura 4.22, painel B**), ao menos na terceira hora pós-estímulo. O mesmo foi observado com outro inibidor de PKA, o WIPTIDE, que, quando administrado por via i.gl., não inibiu a hipernocicepção induzida pela PGE₂ na terceira hora (**figura 4.22, painel C**). Embora possa parecer redundância utilizar dois inibidores para a PKA, convém lembrar que o mecanismo de ação das duas drogas é diferente, de modo que o H89 inibe diretamente a PKA, enquanto o WIPTIDE inativa o AMPc (CHENG et al., 1986), responsável pela ativação desta proteína quinase, o que nos leva a sugerir que a ausência de efeito sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. pode ter ocorrido pelo simples fato de que os níveis de AMPc no GRD não eram suficientes para ativar a PKA neste momento da hipernocicepção (terceira hora). De modo contrário, quando a hipernocicepção foi induzida pela administração i.t. de NMDA, observamos inibição parcial, embora significativa, pelo H89 administrado por via i.gl. (cerca de 46%) (**figura 4.23, painel B**). Este dado sugere que a ativação de receptores ganglionares após a administração de PGE₂ i.pl. ocorreria nas primeiras horas, ou seja, haveria liberação de GLU no GRD, ativação de NMDARs ganglionares e subsequente ativação de PKA, o que poderia ser um dos mecanismos de manutenção da hipernocicepção. Mais ainda, a inibição da hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t. pelo WIPTIDE i.gl. (cerca de 43%) (**figura 4.23, painel C**) nos sugere que, além

da ativação de proteínas quinases subsequentes à ativação de NMDARs ganglionares, pode estar ocorrendo também ativação da enzima adenilato-ciclase, responsável pela síntese de AMPc. Entretanto, é conveniente observar que o fato desta inibição ser apenas parcial mostra que outros processos celulares podem estar envolvidos neste efeito da PGE₂.

Ainda com relação à participação de proteínas quinases na comunicação intraneuronal, dados de nosso laboratório mostraram, além do aumento da expressão de PKA no GRD durante a primeira hora após a administração de PGE₂, o aumento de PKC epsilon (PKCε), a qual já havia sido demonstrada ser uma isoforma de PKC importante para a hipernocicepção periférica (PARADA et al., 2005). Embora seu aumento durante a primeira hora fosse menor que o da PKA, na terceira hora sua expressão no GRD estava aumentada, de modo que é possível que tal aumento represente uma ativação subsequente que percorra a célula neuronal, comunicando as diferentes regiões celulares. Neste sentido, nossos resultados também estão de acordo, já que a administração i.gl. de um inibidor específico para PKCε inibiu, também de forma parcial (cerca de 32%), a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl. (**figura 4.22, painel A**). Contudo, quando verificamos o efeito deste inibidor sobre a hipernocicepção induzida pelo NMDA i.t., a inibição foi de cerca de 75%, ou seja, bem mais intensa (**figura 4.23, painel A**), o que nos leva a suspeitar que sua participação na hipernocicepção induzida pela NMDA i.t. (ou i.gl., se considerarmos nossas observações) é mais importante que a da PKA – pelo menos na terceira hora pós-estímulo. Além disso, a PGE₂ poderia induzir a liberação de GLU no GRD, que ativaria NMDARs e, em seqüência, a PKCε ganglionar, mostrando a importante relação existente entre a PGE₂ i.pl., a ativação de NMDARs ganglionares e a ativação de segundos-mensageiros intracelulares. Convém notar, entretanto, que a participação das ondas de Ca⁺² neste processo de comunicação intracelular não está descartada, uma vez que a inibição observada pela administração de inibidores destas proteínas quinases não foi total, sugerindo a existência de outras vias participantes da hipernocicepção induzida em nosso modelo.

Os experimentos supracitados (**experimentos 4.22 e 4.23**) mostram que existem diferenças na atuação dos segundos-mensageiros ativados pela PGE₂ ou pelo NMDA dependendo do período da hipernocicepção avaliado. Assim, a PKCε parece ser importante na terceira hora, e, a PKA, nas primeiras horas de indução do fenômeno. Já a adenilato ciclase talvez seja importante para o início dos processos no GRD. Uma vez que a PKA age no local do estímulo inflamatório, fosforilando canais iônicos (BHAVE et al., 2002), e é dependente de AMPc, formado pela adenilato ciclase local, podemos sugerir que o estímulo inflamatório ativa esta enzima, ativando também a PKA local. Isso poderia causar uma seqüência de

eventos que culminaria na ativação destas mesmas proteínas (adenilato ciclase e PKA) no GRD, e, finalmente, ativação da PKC ϵ . Assim, experimentos adicionais são necessários para estabelecer esse processo de “conversação intraneuronal”, o qual pode envolver, também, a ativação de NMDARs ganglionares.

A série seguinte de experimentos mostrou a ativação desses mensageiros após administração i.t. de NMDA. Apesar de pouco concludentes, parece, a princípio, que a hipernocicepção induzida pelo NMDA é dependente, em primeira instância, de PKC ϵ (**figura 4.25**). Caso isso seja realidade, poderemos dizer que a sensibilização retrógrada nesse caso pode ser extremamente dependente da expressão dessa proteína quinase no GRD. Contudo, se seguirmos esse raciocínio, encontraremos uma contradição com os resultados obtidos pela administração do inibidor de PKC ϵ sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂ i.pl., na qual a PKC ϵ apenas parece ser importante na terceira hora. Poderíamos ter então mais de um mecanismo de comunicação intraneuronal funcionando? É bastante provável que sim, podendo ser, inclusive, a CICR.

Observando amplamente os resultados obtidos, nossos experimentos têm indicado que a sensibilização retrógrada é um fenômeno que pode envolver a ativação de mensageiros intracelulares em diferentes etapas do processo, mas, em resumo, ocorreria liberação de GLU no GRD, que ativaria NMDARs ganglionares, gerando a entrada de Ca⁺² na célula e ativando segundos-mensageiros como a PKC ϵ ou receptores rianodine, iniciando (ou complementando) o processo de comunicação intracelular, o qual, em última instância, culminaria na hipernocicepção e sua longa duração. A ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA localizados nos corpos celulares de neurônios do GRD foi verificada *in vitro*, por meio da observação de aumento de fluorescência causado pelo influxo de Ca⁺² (**experimento 4.13**). Embora estejamos dando continuidade nos experimentos com culturas de neurônios, já verificamos que realmente a ativação de NMDAR causa aumento nos níveis de Ca⁺² intracelular, o que poderia ser suficiente para iniciar a CICR. Entretanto, a participação das células da glia – no caso, células satélites – no fenômeno de sensibilização neuronal por ação do GLU em células do GRD não pode ser ignorada, já que também verificamos aumento de fluorescência após administração de NMDA à cultura dessas células (**figuras 4.13a e 4.13b**). Uma vez que a literatura tem apresentado cada vez mais evidências da participação dessas células em processos como a hipernocicepção inflamatória e outros fenômenos que envolvem alteração no metabolismo neuronal, nossos experimentos caminharam para a verificação de seu possível envolvimento na sensibilização retrógrada do neurônio aferente primário.

Nosso passo seguinte visou a possibilidade de ativação de NMDARs por segundos-mensageiros envolvidos na hipernocicepção de origem inflamatória. Já havíamos observado que o NMDA administrado por via i.t. ativa a PKC ϵ , levando à hipernocicepção. Neste sentido, o desenvolvimento da hipernocicepção induzida pela administração do agonista específico de PKC ϵ ψ εRACK foi prevenido pelo D-AP-5 injetado no GRD (9 μ g), apesar de ter havido certa tendência de retorno da hipernocicepção após a terceira hora, o que correlaciona-se com o tempo de efeito do D-AP-5 (**figura 4.26, painel A**). Assim, o que pode estar havendo é a liberação de GLU pelo neurônio primário no GRD, ativando NMDARs ganglionares, o que manteria o estado sensibilizado neuronal, em um mecanismo de “retroalimentação”. Em outras palavras, haveria a sensibilização retrógrada. No caso da hipernocicepção induzida pela administração da subunidade catalítica de PKA, o pré-tratamento com D-AP-5 não bloqueou a hipernocicepção até a segunda hora. Entre a segunda e a terceira horas houve inibição, havendo tendência de retorno da sensibilização após esse período (**figura 4.26, painel B**). Esse fato pode significar que a hipernocicepção induzida pela PKA pode não ser dependente de NMDARs ganglionares. Porém, tendo em vista algumas linhas de pesquisa que sugerem que a PKA pode ativar a PKC, pode ser que a inibição da hipernocicepção coincida justamente com o momento no qual a PKA ativa a PKC, sendo esta, sim, capaz de induzir hipernocicepção dependente de NMDARs ganglionares. De modo diferente, a hipernocicepção induzida pelo análogo de AMPc dbAMPc foi totalmente bloqueada pelo D-AP-5 i.gl. (**figura 4.26, painel C**). Essa inibição total nos sugere que o AMPc induz hipernocicepção totalmente dependente de NMDARs ganglionares, de maneira semelhante à PKC ϵ . De qualquer maneira, ainda nos parece que os NMDARs ganglionares são importantes para a manutenção e desenvolvimento da hipernocicepção induzida pela PGE₂.

Mais uma vez salientamos que as células da glia no GRD (células satélites) parecem ter papel fundamental na manutenção da dor inflamatória, inclusive em seu desenvolvimento. As evidências apresentadas na literatura sobre a participação das células gliais na dor e nocicepção são mais associadas à glia espinal e às dores de origem neuropática. Poucos trabalhos mostram o envolvimento das células-satélites na hipernocicepção inflamatória aguda, embora alguns estudos tenham mostrado a produção e liberação de mediadores inflamatórios, inclusive citocinas (HANANI, 2005), por essas células. Em nosso estudo procuramos entender como essas células, localizadas em contato íntimo com os corpos neuronais no GRD, participam do processo de hipernocicepção retrógrada (termo este que significa “no sentido contrário”, dando a entender que a ativação de NMDARs longe das

terminações periféricas ativa processos que induzem sensibilização que se difunde até a região terminal do neurônio nociceptor). Como mencionado acima, a participação destas células ganglionares gliais foi um dado surpreendente para nós, o que levou nosso trabalho a outros rumos. Em conclusão, enfatizamos novamente que esses resultados podem trazer uma nova visão com relação ao envolvimento tanto das células da glia quanto de todo o GRD na hipernocicepção inflamatória, contribuindo, assim, para a melhor compreensão da dor aguda como um todo.

6 CONCLUSÕES

- A administração intraplantar de PGE₂ induz ativação de receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal;
- A hipernocicepção mecânica induzida pela administração de NMDA por via intratecal ocorre por ativação de receptores presentes no gânglio da raiz dorsal;
- Estes receptores NMDA estão localizados nas células-satélites;
- Uma vez que o GLU é liberado pelos corpos celulares, estes receptores NMDA são ativados e ocorre influxo de cálcio nestas células, disparando as ondas de cálcio (CICR);
- A ativação de receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal estimula a ativação de segundos-mensageiros intracelulares, como a PKA e a PKC, neste local;
- A estimulação da CICR e ativação de segundos-mensageiros intracelulares no gânglio da raiz dorsal contribuem para a sensibilização do neurônio aferente primário como um todo.

REFERÊNCIAS

- AANONSEN, L.M.; LEI, S.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, v.41, n.3, p.309-21, 1990.
- AANTAA, R.; MARJAMAKI, A.; SCHEININ, M. Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. **Ann Med**, v.27, n.4, p.439-49, 1995.
- AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. **Neurol Sci**, v.24 Suppl 2, p.S57-60, 2003.
- ALDSKOGIUS, H.; KOZLOVA, E.N. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. **Prog Neurobiol**, v.55, n.1, p.1-26, 1998.
- AULT, B. et al. Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. **J Physiol**, v.307, p.413-28, 1980.
- AYAR, A.; SCOTT, R.H. The actions of ryanodine on Ca²⁺-activated conductances in rat cultured DRG neurones; evidence for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.359, n.2, p.81-91, 1999.
- BARDONI, R. et al. Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. **J Neurosci**, v.24, n.11, p.2774-81, 2004.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J Comp Neurol**, v.277, n.2, p.302-12, 1988.
- BENNETT, A.D.; EVERHART, A.W.; HULSEBOSCH, C.E. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. **Brain Res**, v.859, n.1, p.72-82, 2000.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**, v.67, n.1, p.67-186, 1987.
- BHAVE, G. et al. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. **Neuron**, v.35, n.4, p.721-31, 2002.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E.S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol**, v.17, n.5, p.592-604, 2006.

BONICA, J.J. **The management of pain**. 2ed. Philadelphia, 1990.

BOYCE, S. et al. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. **Neuropharmacology**, v.38, n.5, p.611-23, 1999.

BROUGHTON, G., 2ND; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7 Suppl, p.12S-34S, 2006.

CAIRNS, B.E. et al. Activation of peripheral NMDA receptors contributes to human pain and rat afferent discharges evoked by injection of glutamate into the masseter muscle. **J Neurophysiol**, v.90, n.4, p.2098-105, 2003.

CARDENAS, C.G.; DEL MAR, L.P.; SCROGGS, R.S. Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons differentiated by membrane properties. **J Neurophysiol**, v.74, n.5, p.1870-9, 1995.

CASADO, M.; DIEUDONNE, S.; ASCHER, P. Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors at the parallel fiber-Purkinje cell synapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.21, p.11593-7, 2000.

CASADO, M.; ISOPE, P.; ASCHER, P. Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. **Neuron**, v.33, n.1, p.123-30, 2002.

CHAHL, L.A.; IGGO, A. The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous afferent nerve activity. **Br J Pharmacol**, v.59, n.2, p.343-7, 1977.

CHATTERTON, J.E. et al. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. **Nature**, v.415, n.6873, p.793-8, 2002.

CHENG, H.C. et al. A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem**, v.261, n.3, p.989-92, 1986.

CHENG, J.K.; JI, R.R. Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain. **Neurochem Res**, 2008.

CHUNG, H.J. et al. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. **J Neurosci**, v.24, n.45, p.10248-59, 2004.

COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Rev**, v.46, n.2, p.205-29, 1994.

CULL-CANDY, S.G.; LESZKIEWICZ, D.N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Sci STKE**, v.2004, n.255, p.re16, 2004.

CUMMINS, T.R. et al. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. **J Neurosci**, v.19, n.24, p.RC43, 1999.

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.127, n.3, p.671-8, 1999.

CURRIE, K.P. et al. Activation of Ca(2+)-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by a sperm factor and cyclic ADP-ribose. **Mol Biol Cell**, v.3, n.12, p.1415-25, 1992.

CURRIE, K.P.; SCOTT, R.H. Calcium-activated currents in cultured neurones from rat dorsal root ganglia. **Br J Pharmacol**, v.106, n.3, p.593-602, 1992.

CURRIE, K.P.; WOOTTON, J.F.; SCOTT, R.H. Activation of Ca(2+)-dependent Cl⁻ currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen. **J Physiol**, v.482 (Pt 2), p.291-307, 1995.

CURTIS, D.R.; PHILLIS, J.W.; WATKINS, J.C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. **J Physiol**, v.150, p.656-82, 1960.

CURTIS, D.R.; WATKINS, J.C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **J Neurochem**, v.6, p.117-41, 1960.

DAS, S. et al. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. **Nature**, v.393, n.6683, p.377-81, 1998.

DAYANITHI, G. et al. Intracellular Ca²⁺ regulation in rat motoneurons during development. **Cell Calcium**, v.39, n.3, p.237-46, 2006.

DE BIASI, S.; RUSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.20, p.7820-4, 1988.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v.Suppl 6, p.S27-35, 1999.

DIB-HAJJ, S.D. et al. Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. **FEBS Lett**, v.462, n.1-2, p.117-20, 1999.

DINGLEDINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v.51, n.1, p.7-61, 1999.

DODGE, M.E.; RAHIMTULA, M.; MEAROW, K.M. Factors contributing to neurotrophin-independent survival of adult sensory neurons. **Brain Res**, v.953, n.1-2, p.144-56, 2002.

DUGGAN, A.W. The differential sensitivity to L-glutamate and L-aspartate of spinal interneurons and Renshaw cells. **Exp Brain Res**, v.19, n.5, p.522-8, 1974.

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

EVANS, A.R.; VASKO, M.R.; NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J Physiol**, v.516 (Pt 1), p.163-78, 1999.

EVANS, R.H. et al. Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. **Br J Pharmacol**, v.67, n.4, p.591-603, 1979.

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

FERRARI, L.F. **Neurônio aferente primário: uma unidade funcional integrando a periferia e a medula espinal**. 2004. 113 ff. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação) -

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2004.

FERREIRA, S.H. **Prostaglandins: peripheral and central analgesia**. New York: Raven Press, 1983. p. 627-634.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v.33, n.11, p.1479-85, 1994.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. **Inflamm Res**, v.45, n.10, p.499-502, 1996.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v.18, n.2, p.179-90, 1979.

FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v.216, n.5118, p.868-73, 1967.

FITZGERALD, E.M. et al. cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. **J Physiol**, v.516 (Pt 2), p.433-46, 1999.

FURUKAWA, H. et al. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. **Nature**, v.438, n.7065, p.185-92, 2005.

GOLD, M.S. et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.3, p.1108-12, 1996a.

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. **J Neurosci**, v.18, n.24, p.10345-55, 1998.

GOLD, M.S.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Characterization of six voltage-gated K⁺ currents in adult rat sensory neurons. **J Neurophysiol**, v.75, n.6, p.2629-46, 1996b.

HALLIWELL, J.V. **K⁺ channels in the central nervous system**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1990. 348-381.

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

HANDWERKER, H.O. **Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors**. New York: Raven Press, 1976. 41-45.

HANNINGTON-KIFF, F. **Antisymphathetic Drugs Limb**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989. 754-766.

HARDINGHAM, G.E. et al. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. **Nature**, v.385, n.6613, p.260-5, 1997.

HAYASHI, T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. **Keio J. Med.**, v.3, p.192–193, 1954.

HAYDON, P.G. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nat Rev Neurosci**, v.2, n.3, p.185-93, 2001.

HERRERO, I.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; SANCHEZ-PRIETO, J. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. **Nature**, v.360, n.6400, p.163-6, 1992.

HILLE, B. **Ionic basis of resting and action potentials**. Washington, D.C.: American Physiological Society, 1977a. 99-136.

HILLE, B. Ionic channels of nerve: questions for theoretical chemists. **Biosystems**, v.8, n.4, p.195-9, 1977b.

HILLE, B. **Voltage-Gated Calcium Channels**. 3rd. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc, 2001. 95-129.

HINGTGEN, C.M.; WAITE, K.J.; VASKO, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. **J Neurosci**, v.15, n.7 Pt 2, p.5411-9, 1995.

HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **J Physiol**, v.117, n.4, p.500-44, 1952.

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

HUANG, L.Y.; NEHER, E. Ca(2+)-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. **Neuron**, v.17, n.1, p.135-45, 1996.

IMMKE, D.C.; GAVVA, N.R. The TRPV1 receptor and nociception. **Semin Cell Dev Biol**, v.17, n.5, p.582-91, 2006.

JENSEN, K. et al. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v.25, p.313-323, 1986.

JIANG, X. et al. Prostaglandin E2 inhibits the potassium current in sensory neurons from hyperalgesic Kv1.1 knockout mice. **Neuroscience**, v.119, n.1, p.65-72, 2003.

JOHENNING, F.W. et al. Distinct intracellular calcium transients in neurites and somata integrate neuronal signals. **J Neurosci**, v.22, n.13, p.5344-53, 2002.

JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v.325, n.6104, p.529-31, 1987.

JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Voltage-dependent block by intracellular Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. **Biophys J**, v.57, n.5, p.1085-90, 1990.

JU, G. et al. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystinin-immunoreactive ganglion cells. **Cell Tissue Res**, v.247, n.2, p.417-31, 1987.

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

KASAI, M.; MIZUMURA, K. Effects of PGE(2) on neurons from rat dorsal root ganglia in intact and adjuvant-inflamed rats: role of NGF on PGE(2)-induced depolarization. **Neurosci Res**, v.41, n.4, p.345-53, 2001.

KHASAR, S.G.; GOLD, M.S.; LEVINE, J.D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. **Neurosci Lett**, v.256, n.1, p.17-20, 1998.

KHASAR, S.G.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.D. Comparison of intradermal and subcutaneous hyperalgesic effects of inflammatory mediators in the rat. **Neurosci Lett**, v.153, n.2, p.215-8, 1993.

KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J Neurophysiol**, v.81, n.3, p.1104-12, 1999.

KLECKNER, N.W.; DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science**, v.241, n.4867, p.835-7, 1988.

KOERBER, H.R. et al. Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. **J Neurosci**, v.14, n.6, p.3655-71, 1994.

KOHAMA, I.; ISHIKAWA, K.; KOCSIS, J.D. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. **J Neurosci**, v.20, n.4, p.1538-49, 2000.

LAI, S.K. et al. Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat neostriatum after a single dose of antisense oligonucleotide specific for N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit. **Neuroscience**, v.98, n.3, p.493-500, 2000.

LAZAREWICZ, J.W. et al. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated, calcium-induced calcium release in rat dentate gyrus/CA4 in vivo. **J Neurosci Res**, v.51, n.1, p.76-84, 1998.

LEE, I.O. et al. NMDA-R1 antisense oligodeoxynucleotides modify formalin-induced nociception and spinal c-Fos expression in rat spinal cord. **Pharmacol Biochem Behav**, v.79, n.1, p.183-8, 2004.

LEWIN, G.R.; RITTER, A.M.; MENDELL, L.M. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. **J Neurosci**, v.13, n.5, p.2136-48, 1993.

LI, J. et al. Electrophysiological characterization of N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia neurons. **Pain**, v.109, n.3, p.443-52, 2004.

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

LIU, H. et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.18, p.8383-7, 1994.

LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v.386, n.6626, p.721-4, 1997.

LOH, L. et al. Effects of regional guanethidine infusion in certain painful states. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.34, n.5, p.446-451, 1980.

LOH, L.; NATHAN, P.W. Painful peripheral states and sympathetic blocks. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.41, n.7, p.664-71, 1978.

LYNCH, D.R. et al. N-methyl-D-aspartate receptors: different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. **Mol Pharmacol**, v.45, n.3, p.540-5, 1994.

LYNN, B.; O'SHEA, N.R. Inhibition of forskolin-induced sensitisation of frog skin nociceptors by the cyclic AMP-dependent protein kinase A antagonist H-89. **Brain Res**, v.780, n.2, p.360-2, 1998.

MA, W.; EISENACH, J.C. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. **Eur J Neurosci**, v.15, n.6, p.1037-47, 2002.

MACDERMOTT, A.B. et al. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. **Nature**, v.321, n.6069, p.519-22, 1986.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v.257, n.5074, p.1276-9, 1992.

MARTIN, W.J. et al. Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C γ immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. **Neuroscience**, v.88, n.4, p.1267-74, 1999.

MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. **J Physiol**, v.394, p.501-27, 1987.

MCBAIN, C.J.; MAYER, M.L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev**, v.74, n.3, p.723-60, 1994.

MCCULLOCH, R.M. et al. The differential sensitivity of spinal interneurons and Renshaw cells to Kainate and N-methyl-D-aspartate. **Exp Brain Res**, v.21, n.5, p.515-8, 1974.

MCLENNAN, H.; HUFFMAN, R.D.; MARSHALL, K.C. Patterns of excitation of thalamic neurons by amino-acids and by acetylcholine. **Nature**, v.219, n.5152, p.387-8, 1968.

MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurons in pain. **Pain**, v.43, n.3, p.269-72, 1990a.

MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci**, v.13, n.6, p.199-201, 1990b.

MELZACK, R. et al. Central neuroplasticity and pathological pain. **Ann N Y Acad Sci**, v.933, p.157-74, 2001.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.32, n.4, p.197-200, 1994.

MICHAEL, G.J. et al. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. **J Neurosci**, v.17, n.21, p.8476-90, 1997.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, n.1, p.1-164, 1999.

MILNE, R.J. et al. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. **Pain**, v.11, n.2, p.163-83, 1981.

MINAMI, T. et al. Involvement of glutamate receptors in allodynia induced by prostaglandins E2 and F2 alpha injected into conscious mice. **Pain**, v.57, n.2, p.225-31, 1994.

MÖLLER, K.Ä.; JOHANSSON, B.; BERG, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v.84, p.41-47, 1998.

MONYER, H. et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. **Science**, v.256, n.5060, p.1217-21, 1992.

MURRAY, C.W.; COWAN, A.; LARSON, A.A. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. **Pain**, v.44, n.2, p.179-85, 1991.

NAGY, G.G. et al. Synaptic distribution of the NR1, NR2A and NR2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in the rat lumbar spinal cord revealed with an antigen-unmasking technique. **Eur J Neurosci**, v.20, n.12, p.3301-12, 2004.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v.135, p.145-53, 1987.

NAMBA, T. et al. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. **J Biol Chem**, v.269, n.13, p.9986-92, 1994.

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neurosci**, v.26, n.10, p.523-30, 2003.

NEVEU, D.; ZUCKER, R.S. Postsynaptic levels of $[Ca^{2+}]_i$ needed to trigger LTD and LTP. **Neuron**, v.16, n.3, p.619-29, 1996.

NICOL, G.D.; VASKO, M.R.; EVANS, A.R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. **J Neurophysiol**, v.77, n.1, p.167-76, 1997.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. **The human nervous system structure and function**. 5^a ed. New York: Williams & Wilkins, 1996, 123-37.

NOWYCKT, M. **Voltage-gated ion channels in dorsal root ganglion neurons**. New York: Oxford University Press, 1992, p. 97-115.

OCAÑA, M. et al. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v.186, p.377-378, 1990.

OCAÑA, M. et al. Subgroups among μ -opioid receptor agonist distinguished by ATP-sensitive K⁺ channel-acting drugs. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, p.1296-1302, 1995.

OHTORI, S. et al. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. **Spine**, v.29, n.10, p.1082-8, 2004.

OUSEPH, A.K.; KHASAR, S.G.; LEVINE, J.D. Multiple second messenger systems act sequentially to mediate rolipram-induced prolongation of prostaglandin E2-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuroscience**, v.64, n.3, p.769-76, 1995.

OVERBERGH, L. et al. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **J Biomol Tech**, v.14, n.1, p.33-43, 2003.

PAARMANN, I. et al. Expression of 15 glutamate receptor subunits and various splice variants in tissue slices and single neurons of brainstem nuclei and potential functional implications. **J Neurochem**, v.74, n.4, p.1335-45, 2000.

PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v.7, n.1, p.39-47, 2007.

PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**, v.31, n.2, p.263-76, 1987.

PARADA, C.A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.5, p.2923-8, 2003.

PARADA, C.A.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**, v.113, n.1-2, p.185-90, 2005.

PAULSEN, R.E. et al. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. **J Neurochem**, v.48, n.5, p.1377-85, 1987.

PEREZ-OTANO, I. et al. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. **J Neurosci**, v.21, n.4, p.1228-37, 2001.

PERL, E.R. **Sensitization of nociceptors and its relation to sensation**. New York: J.J. Bonica and Albe-Fessard, 1976. 17-34.

PITTALUGA, A.; RAITERI, M. Release-enhancing glycine-dependent presynaptic NMDA receptors exist on noradrenergic terminals of hippocampus. **Eur J Pharmacol**, v.191, n.2, p.231-4, 1990.

POOLE, S. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v.126, n.3, p.649-56, 1999a.

POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hyperalgesia from subcutaneous cytokine. **Cytokines and Pain**, p.59-85, 1999b.

PORRECA, F. et al. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.14, p.7640-4, 1999.

PRADO, W.A. **Medicamentos analgésicos de ação central**. São Paulo: Atheneu, 1999. 175-195.

REGAN, J.W. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. **Life Sci**, v.74, n.2-3, p.143-53, 2003.

REN, K. et al. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol**, v.219, n.2, p.235-43, 1992.

RENGANATHAN, M.; CUMMINS, T.R.; WAXMAN, S.G. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. **J Neurophysiol**, v.86, n.2, p.629-40, 2001.

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

RIZZUTO, R. Intracellular Ca(2+) pools in neuronal signalling. **Curr Opin Neurobiol**, v.11, n.3, p.306-11, 2001.

ROANE, D.S.; BOYD, N.E. Reduction of food intake and morphine analgesia by central glybenclamide. **Pharmacol Biochem Behav**, v.46, n.1, p.205-7, 1993.

ROBERTS, L.A.; CONNOR, M. TRPV1 antagonists as a potential treatment for hyperalgesia. **Recent Patents CNS Drug Discov**, v.1, n.1, p.65-76, 2006.

ROBERTS, L.J.; MORROW, J.D. New York: McGraw-Hill, 2001. 687-731.

ROBINSON-WHITE, A.; STRATAKIS, C.A. Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. **Ann N Y Acad Sci**, v.968, p.256-70, 2002.

RUDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. **Neuroscience**, v.25, n.3, p.729-49, 1988.

SAFRANOV, B.V.; BISCHOFF, U.; VOGEL, W. Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurons of the rat. **Journal of Physiology**, v.493, p.393-408, 1996.

SASAKI, Y.F. et al. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. **J Neurophysiol**, v.87, n.4, p.2052-63, 2002.

SATO, K. et al. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. **Neuroreport**, v.4, n.11, p.1263-5, 1993.

SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci Lett**, v.437, n.3, p.188-93, 2008.

SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J Neurophysiol**, v.60, n.6, p.2180-95, 1988.

SEWARD, E.P.; CHERNEVSKAYA, N.I.; NOWYCKY, M.C. Exocytosis in peptidergic nerve terminals exhibits two calcium-sensitive phases during pulsatile calcium entry. **J Neurosci**, v.15, n.5 Pt 1, p.3390-9, 1995.

SHIMFELD, C.; EASTY, D.L.; HILL, T.J. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in the mouse trigeminal ganglion: an in vivo study of virus antigen and cytokines. **J Virol**, v.73, p.1767– 1773, 1999.

SHIMOYAMA, N. et al. An antisense oligonucleotide to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subunit NMDAR1 attenuates NMDA-induced nociception, hyperalgesia, and morphine tolerance. **J Pharmacol Exp Ther**, v.312, n.2, p.834-40, 2005.

SHINDER, V.; DEVOR, M. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. **J Neurocytol**, v.23, n.9, p.515-31, 1994.

SHINOZAKI, H.; SHIBUYA, I. A new potent excitant, quisqualic acid: effects on crayfish neuromuscular junction. **Neuropharmacology**, v.13, n.7, p.665-72, 1974.

SLUKA, K.A. et al. Capsaicin-induced sensitization of primate spinothalamic tract cells is prevented by a protein kinase C inhibitor. **Brain Res**, v.772, n.1-2, p.82-6, 1997.

SMITH, C.H. et al. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J Immunol**, v.151, n.6, p.3274-82, 1993.

SMITH, J.A. et al. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. **Br J Pharmacol**, v.124, n.3, p.513-23, 1998.

SOUTHALL, M.D.; VASKO, M.R. Prostaglandin E(2)-mediated sensitization of rat sensory neurons is not altered by nerve growth factor. **Neurosci Lett**, v.287, n.1, p.33-6, 2000.

SOUZA, A.L. et al. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br J Pharmacol**, v.135, n.1, p.239-47, 2002.

SPRENGEL, R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Cell Tissue Res**, v.326, n.2, p.447-55, 2006.

STONE, L.S.; VULCHANOVA, L. The pain of antisense: in vivo application of antisense oligonucleotides for functional genomics in pain and analgesia. **Adv Drug Deliv Rev**, v.55, n.8, p.1081-112, 2003.

STRETTON, D. et al. Calcium-activated potassium channels mediate prejunctional inhibition of peripheral sensory nerves. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.4, p.1325-9, 1992.

TAIWO, Y.O. et al. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v.32, n.3, p.577-80, 1989.

TAIWO, Y.O.; HELLER, P.H.; LEVINE, J.D. Mediation of serotonin hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v.48, n.2, p.479-83, 1992.

TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, v.44, n.1, p.131-5, 1991.

TANIGUCHI, K. et al. Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br J Pharmacol**, v.122, n.5, p.809-12, 1997.

TEIXEIRA, M.M. et al. Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? **Trends Pharmacol Sci**, v.18, n.5, p.164-71, 1997.

TRACEY, D.J. et al. Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. **Neuroscience**, v.40, n.3, p.673-86, 1991.

URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.14, p.7687-92, 1999.

USACHEV, Y.M.; THAYER, S.A. All-or-none Ca²⁺ release from intracellular stores triggered by Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels in rat sensory neurons. **J Neurosci**, v.17, n.19, p.7404-14, 1997.

USACHEV, Y.M.; THAYER, S.A. Controlling the urge for a Ca(2+) surge: all-or-none Ca(2+) release in neurons. **Bioessays**, v.21, n.9, p.743-50, 1999.

VACCARINO, A.L. et al. A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. **Neurosci Lett**, v.236, n.2, p.117-9, 1997.

VERGONI, A.V.; SCARANO, A.; BERTOLINI, A. Pinacidil potentiates morphine analgesia. **Life Sci**, v.50, n.16, p.PL135-8, 1992.

VERRI, W.A., JR. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v.112, n.1, p.116-38, 2006.

VESIN, M.F. et al. Neuronal and glial prostaglandin D synthase isozymes in chick dorsal root ganglia: a light and electron microscopic immunocytochemical study. **J Neurosci**, v.15, n.1 Pt 1, p.470-6, 1995.

VIVANCOS, G.G.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **Br J Pharmacol**, v.138, n.7, p.1351-7, 2003.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v.23, p.175-266, 1896.

WANG, J.F. et al. Sensitization of C-fibres by prostaglandin E2 in the rat is inhibited by guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate), 2',5'-dideoxyadenosine and Walsh inhibitor peptide. **Neuroscience**, v.71, n.1, p.259-63, 1996.

WANG, S. et al. Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury. **J Neurosci**, v.25, n.2, p.488-95, 2005.

WATABE, A. et al. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. **J Biol Chem**, v.268, n.27, p.20175-8, 1993.

WATKINS, J.C. Metabolic regulation in the release and action of excitatory and inhibitory amino acids. **Biochem J**, v.128, n.3, p.71P-73P, 1972.

WATKINS, J.C. **The NMDA receptor concept: origins and development**. 2nd. Oxford: Oxford University Press, 1994. 1-30.

WATKINS, J.C. The Synthesis of Some Acidic Amino Acids Possessing Neuropharmacological Activity. **J Med Pharm Chem**, v.91, p.1187-99, 1962.

WATKINS, J.C.; EVANS, R.H. Excitatory amino acid transmitters. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.21, p.165-204, 1981.

WATKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol Sci**, v.11, n.1, p.25-33, 1990.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev**, v.82, n.4, p.981-1011, 2002.

WILD, K.D. et al. Opioid delta receptor subtypes are associated with different potassium channels. **Eur J Pharmacol**, v.193, n.1, p.135-6, 1991.

WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. **Mol Pharmacol**, v.44, n.4, p.851-9, 1993.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**, v.14, n.1, p.2-31, 1997.

WINTER, J. Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones. **Neurosci Lett**, v.241, n.1, p.21-4, 1998.

WOOD, J.B., JP; OKUSE, K; BAKER, MD. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. **J Neurobiol.**, v.61, n.1 p.55-71, 2004.

WOOLF, C.J.; DOUBELL, T.P. The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. **Curr Opin Neurobiol**, v.4, n.4, p.525-34, 1994.

WYLLIE, D.J.; BEHE, P.; COLQUHOUN, D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. **J Physiol**, v.510 (Pt 1), p.1-18, 1998.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog Neurobiol**, v.59, n.3, p.279-98, 1999.

YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. **Pain**, v.49, n.1, p.121-8, 1992.

YAO, Y.; MAYER, M.L. Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. **J Neurosci**, v.26, n.17, p.4559-66, 2006.

ZHAO, Z. et al. Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. **Neuroscience**, v.97, n.4, p.743-8, 2000.

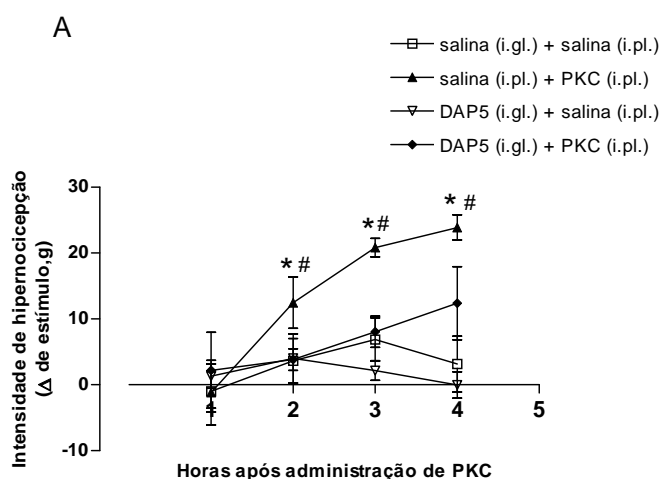
ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-10, 1983.

ERRATA

Ferrari, L. F. Participação dos receptores de glutamato tipo NMDA pré-sinápticos na sensibilização dos neurônios aferentes primários. 2008. 160 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

ERRATA

- Folha 80, linha 9: onde se lê “(...) aos 15 minutos (PARADA et al., 2003).”, leia-se “(...) aos 15 minutos (VIVANCOS et al., 2003).”
- Folha 92, Figura 4.12, Painel A: no esquema de administração das drogas (parte superior da figura), onde se lê “2,5 horas”, leia-se “3 horas”.
- Folha 92, Figura 4.12, Painel C: no esquema de administração das drogas (parte superior da figura), onde se lê “2,5 horas”, leia-se “3 horas”.
- Folha 92, Figura 4.12, Legenda, linha 4: onde se lê “(...) foi realizada na terceira hora no teste (...)”, leia-se “(...) foi realizada na terceira hora após a administração de PGE₂ (**painéis A e B**) ou NMDA (**painel C**) no teste (...)”.
- Folha 122, Figura 4.26, Painel A:



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)