

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

**RICARDO KUSUDA**

**Expressão de microRNAs no sistema nociceptivo**  
**de camundongos**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**RICARDO KUSUDA**

**Expressão de microRNAs no sistema nociceptivo  
de camundongos**

**Dissertação de mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto da Universidade de São Paulo  
como requisito para a obtenção do  
grau de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Fisiologia**

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme de  
Araújo Lucas**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Ricardo Kusuda

Expressão de microRNAs no sistema

nociceptivo de camundongos

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em:

**Banca examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação. A decisão de seguir uma carreira acadêmica não é fácil. O início é sempre árduo e mais difícil ainda é conseguir caminhar no dia-a-dia com passos largos. Para isso, contar com a ajuda do próximo torna-se uma questão preponderante rumo ao êxito. Logo, considero-me um afortunado. Muitas pessoas importantes fazem parte da minha vida. Cada uma contribui da sua forma, desde aquelas mais simples que suprem os aspectos mais básicos, àquelas que me auxiliam na complexidade dos assuntos nos quais estou envolvido. A importância é a mesma. Por isso, não citarei nomes aqui. Não gostaria de ser injusto ao me esquecer de alguém neste momento em que a pressa está se fazendo necessária. Mais do que verbalizar ou deixar por escrito, penso que a gratidão é devidamente expressa pelas atitudes e pelos olhares. Espero estar conseguindo fazer isso devidamente. Tanto ajudar, como deixar ser ajudado, é um exercício diário de humildade. Assim, eu gostaria que VOCÊ, que me ajudou de alguma forma, sentisse o que estou tentando lhe dizer no mais profundo de minhas palavras, na maior expressão de minhas atitudes e no mais singelo de meus olhares. E quando a humildade me faltar, peço a Deus que me “puxe a orelha” e diminua minha arrogância para que eu possa reconhecer e lhe dar o SEU devido valor.

OBRIGADO

Dedico esta dissertação que é fruto de meu trabalho, que compila todos os meus esforços e que me faz sentir feliz de estar fazendo algo realmente útil...

à minha família (Pai, Mãe e Irmão), pelo apoio INCONDICIONAL em todos os momentos de minha vida.

à minha namorada (Carla), pela cumplicidade sentimental e científica que faz do nosso relacionamento algo muito especial; e sua família, pelo apoio e acolhimento.

a todos os meus professores, pelo incentivo e por terem doado seu tempo contribuindo para minha formação.

aos meus orientadores (Profa. Maria Cristina e Prof. Guilherme), pelo incentivo e dedicação que são fundamentais para a minha carreira.

às minhas amigas (Flaviane, Paula e Sônia), pelo apoio, companheirismo e esforços os quais foram essenciais para a realização deste trabalho.

a todos aqueles que acreditam em mim e no meu potencial, mesmo me conhecendo muito pouco.

## RESUMO

KUSUDA, R. **Expressão de microRNAs no sistema nociceptivo de camundongos**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

MicroRNAs (miRs) representam uma nova classe de RNAs não codificadores (ncRNA) que agem como potentes reguladores da expressão de diversos genes. A identificação e caracterização da ação de miRs têm oferecido uma visão completamente nova dos mecanismos de regulação pós-transcricional, influenciando diversos mecanismos celulares como diferenciação, crescimento, apoptose, metabolismo e atividade sináptica. A descoberta dos miRs e de seus mecanismos de ação têm alterado fundamentalmente a nossa compreensão da fisiologia de órgãos e sistemas e da fisiopatologia de diversas doenças. A expressão de miRs ocorre de maneira específica nos diferentes tecidos, sendo que, no sistema nervoso, miRs foram descritos no córtex, cerebelo e no mesencéfalo. Este estudo investigou a expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal onde a informação nociceptiva é inicialmente processada. Foi analisada a expressão de miR-1, miR-16, miR-122a e miR-206 que possuem complementaridade parcial ao gene *bdnf*. O BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) é um fator neurotrófico responsável pela manutenção das características fenotípicas de diferentes populações neuronais no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal, participando tanto da transmissão da informação nociceptiva, quanto dos mecanismos de plasticidade neural induzidos pela lesão de nervo periférico ou doença inflamatória crônica.

Utilizando *RT-PCR* em tempo real, foram investigados (1) a expressão destes miRs após estimulação aguda de fibras nociceptivas do tipo C, (2) o perfil temporal e especificidade tecidual de expressão de miRs após a lesão parcial e (3) axotomia de nervo periférico, e (4) durante inflamação crônica no gânglio da raiz dorsal de no corno dorsal da medula espinal de camundongos. As amostras foram normalizadas com o controle endógeno snoR-202. Com exceção do miR-122a, todos os demais miRs encontraram-se robustamente expressos tanto no gânglio da raiz dorsal como no corno dorsal da medula espinal. Todos os modelos foram capazes de induzir alterações na expressão dos miRs que apresentaram ora redução, ora aumento dependendo do tecido, da duração ou da qualidade da estimulação, caracterizando um alto grau de especificidade espacial e temporal no sistema nociceptivo. Nossos resultados sugerem a participação destes miRs nos diferentes mecanismos de regulação gênica associados, tanto à dor nociceptiva, quanto à fisiopatologia da dor crônica.

Palavras-Chave: MicroRNA, miR-1, miR-16, miR-122a, miR-206, nocicepção, dor crônica, dor aguda, dor inflamatória, dor neuropática, gânglio da raiz dorsal, corno dorsal da medula espinal



## ABSTRACT

KUSUDA, R. **MicroRNAs expression in the nociceptive system of mice.** Thesis (Master's degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008

MicroRNAs (miRs) represent a new class of non-coding RNAs (ncRNA) that show their action as powerful regulators of several genes. The identification and characterization of miRs activity have offered a completely new view of post-transcriptional regulation, making influences in cellular mechanisms of differentiation, development, apoptosis, metabolism and synaptic activity. The miRs discovering and their mechanisms of action have altered fundamentally our understanding on the physiology of organs and systems as well as the pathophysiology of many diseases. MiRs expression occurs in a specific manner in different tissues. In the nervous system, they have been found in cortex, cerebellum and midbrain. This work was aimed to investigate the expression of miRs in dorsal root ganglion and the spinal cord dorsal horn where the nociceptive information is primarily processed into the central nervous system. The expression of miR-1, miR-16, miR-122a and miR-206 were chosen because of their partial complementarities to the *bdnf* gene. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is responsible for keeping the phenotypic characteristics of the neural population in the dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn. It also plays a key role in the mechanisms of acute nociceptive processing and in the neuroplasticity induced by peripheral nerve injury and chronic inflammatory disease. Using Real Time RT-PCR, we investigated (1) the

expression pattern of these miRs in the dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn of mice following (1) acute C fibers stimulation, (2) partial peripheral nerve lesion, (3) complete nerve section, and (4) during chronic inflammation. Excepting for the miR-122a, all others miRs were found robustly expressed in the dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn. All the models used here were able to induce alterations in miRs expression profile resulting in reduction or enhancement depending on the tissue and duration or quality of the stimulation. This data shows a high degree of temporal and spatial specificity in the nociceptive system, suggesting that these miRs can participate in different regulatory mechanisms of genes associated with the pathophysiology of acute and persistent pain.

Key Words: MicroRNA, miR-1, miR-16, miR-122a, miR-206, nociception, chronic pain, acute pain, inflammatory pain, neuropathic pain, dorsal root ganglion, spinal cord dorsal horn.

## SUMÁRIO

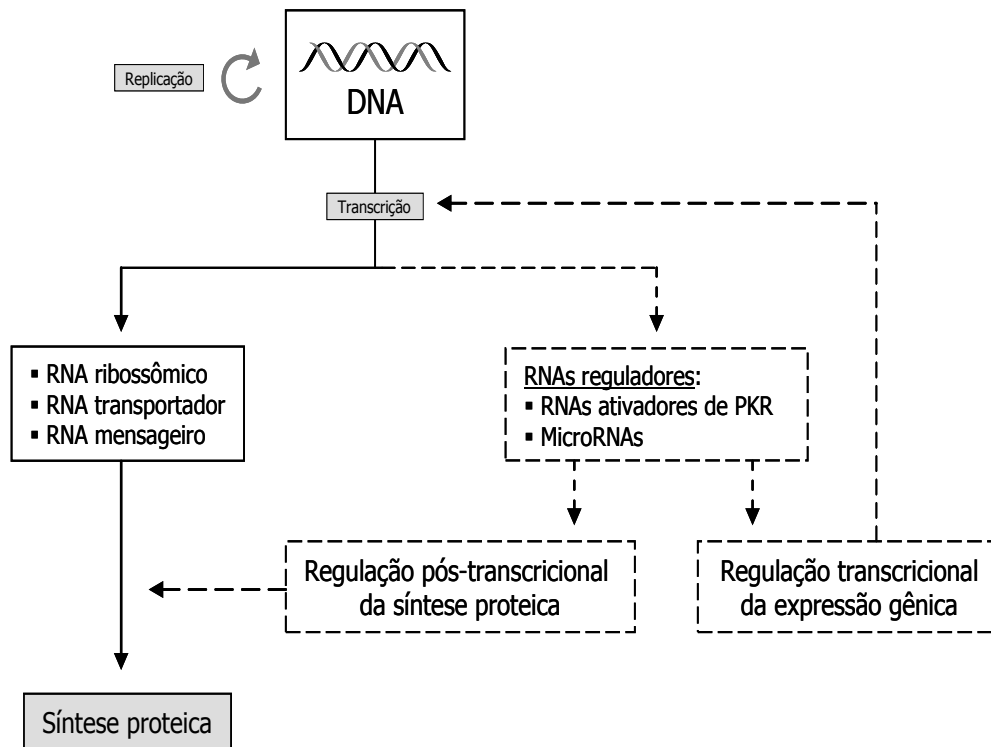
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Aspectos básicos sobre microRNAs.....	14
1.2 Biogênese de microRNAs.....	17
1.3 RISC e mecanismo de ação de microRNAs.....	19
1.4 Especificidade tecidual da expressão de microRNAs.....	20
1.5 Neurobiologia da dor nociceptiva.....	21
1.6 Ação de BDNF na neurobiologia da dor neuropática.....	24
1.7 Ação de BDNF na neurobiologia da dor inflamatória crônica.....	25
1.8 MicroRNAs e dor.....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 Modelo experimental de dor aguda.....	30
3.2 Modelos experimentais de dor crônica.....	31
3.2.1 Modelo experimental de dor crônica de origem inflamatória inflamação crônica.....	31
3.2.2 Modelo experimental de dor crônica de origem neuropática induzida por lesão parcial de nervo periférico.....	31
3.2.3 Modelo experimental de dor crônica induzida por axotomia de nervo periférico.....	32
3.3 Análise de comportamento.....	33
3.3.1 Monitoramento do comportamento nocifensivo durante estimulação aguda de fibras do tipo C .....	33

3.3.2	Monitoramento das alterações de sensibilidade após lesão de nervo periférico e injeção de CFA.....	33
3.4	Processamento de tecidos para quantificação relativa.....	34
3.4.1	Extração de RNA total.....	34
3.4.2	Transcrição reversa.....	35
3.4.3	Reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	36
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	39
4.1	Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à estimulação dolorosa aguda com capsaicina.....	40
4.2	Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à inflamação crônica induzida por CFA.....	43
4.3	Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão parcial do nervo periférico.....	45
4.4	Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à axotomia de nervo .....	48
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1990, quando o Projeto Genoma Humano foi iniciado, os pesquisadores tinham a ambição de identificar todos os genes contidos em uma célula humana (Collins, Patrinos *et al.*, 1998). Estimavam que o número total de genes fosse por volta de 100.000 ou mais. Ao término do projeto, os achados indicaram a existência de somente 20.000 a 25.000 genes responsáveis pela codificação de proteína, o que surpreendeu a todos, uma vez que este número representa 1,5% do genoma, muito menos do que o esperado (Finishing the euchromatic sequence of the human genome, 2004). O restante, cerca de 98%, foi considerado como “DNA-lixo”, já que consistia de regiões regulatórias, intrônicas ou geradoras de transcritos não-codificadores de proteínas, que até então, para os pesquisadores, não desempenhavam funções muito relevantes (Lander, Linton *et al.*, 2001). Esta visão estava norteada pelo “Dogma Central da Biologia Molecular” (Crick, 1958) cuja a postulação determinava que toda informação contida no DNA deveria ser transcrita em RNAs mensageiros e que posteriormente seriam traduzidos em proteínas. Assim, de acordo com esta hipótese de “um gene - uma proteína”, admitiu-se que a complexidade de um organismo poderia ser dada pelo número de proteínas codificadas no seu genoma. Mas o que faria uma célula de um organismo superior conter tanta informação que de nada serviria? Ao mesmo tempo em que essas descobertas eram lançadas na comunidade científica, outros pesquisadores tentavam dar uma resposta para tal indagação. Foi quando se começou a introduzir o conceito de RNAs não-codificadores de proteína (ncRNA) e sua relevância no estudo do genoma funcional (Eddy, 2001; Mattick, 2003). Já se sabia da existência de um grupo de ncRNAs constitutivamente expressos e participantes de processos celulares corriqueiros tendo como exemplos os RNAs ribossômicos, transportadores, teloméricos, entre outros. Porém, a classificação se estendeu para mais um grupo de

transcritos que são expressos principalmente na fase de desenvolvimento de um organismo, bem como durante o processo de diferenciação celular e que estão envolvidos na regulação da expressão de outros genes em nível de transcrição e tradução (Szymanski e Barciszewski, 2002). São os transcritos não-codificadores de proteínas denominados de RNAs reguladores ou ncRNAs (Fig.1). Nesta classe, incluem-se os microRNAs (miRs) responsáveis pela regulação da expressão gênica e que receberam atenção especial neste estudo. Esta evidência de um controle pós-transcricional acabou por transformar profundamente os conceitos em biologia molecular, deixando certa a grande importância funcional desta fração do DNA que aumenta ainda mais a complexidade dos organismos superiores.



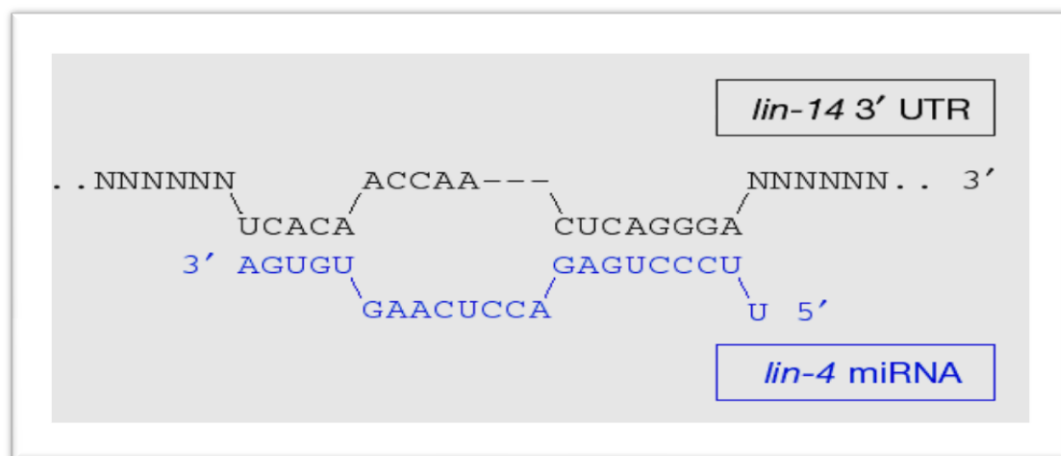
**Figura 1: Mecanismos de regulação da transcrição.** Estudos recentes revelaram que pouco mais de 1% do genoma humano é utilizado na produção de transcritos codificadores de proteínas. Por outro lado, mais de 90% dos transcritos da célula humana não codificam proteínas e são, por isso, chamados de RNAs não codificadores de proteínas (*non-coding RNA – ncRNAs*). Os ncRNAs são classificados em dois grupos: aqueles expressos constitutivamente e que participam indiretamente da síntese proteica, como é o caso dos RNAs ribossômicos, e um segundo grupo de transcritos, expressos em fases específicas do desenvolvimento de um organismo ou durante o processo de diferenciação celular, regulando a expressão de outros genes quer através da transcrição, quer da tradução. Por este motivo, estes ncRNAs são chamados de RNAs reguladores.

## 1.1 Aspectos básicos sobre microRNAs

Como já mencionado, os miRs representam uma nova classe de RNAs não-codificadores. São RNAs pequenos, contendo de 21-22 nucleotídeos e agem como potentes reguladores da expressão gênica. Uma vez que se determinou a sua ação, estas moléculas modificaram visão quanto aos mecanismos celulares de diferenciação, crescimento, apoptose, metabolismo e atividade sináptica (Lewis, Shih *et al.*, 2003; Meister, Landthaler *et al.*, 2004; Kosik e Krichevsky, 2005; Pasquinelli, Hunter *et al.*, 2005). Isto modificou também profundamente o nosso entendimento quanto à fisiologia dos órgãos e sistemas, assim como

a fisiopatologia das doenças (Chen, Li *et al.*, 2004; He e Hannon, 2004; He, Thomson *et al.*, 2005; Mattick, 2005; Mattick e Makunin, 2005; Mehler e Mattick, 2006; Schratt, Tuebing *et al.*, 2006).

No que arremete ao histórico dos miRs, faz-se sempre alusão a Victor Ambros e colaboradores que, em 1993 (Lee, Feinbaum *et al.*, 1993), descobriram o primeiro miR, em *Caenorhabditis elegans* para o qual deram o nome de lin-4. Trata-se de um marco na história dos miRs, pois, após este, muitos outros foram e ainda estão sendo descobertos, aumentando cada vez mais esta família. Mais do que simplesmente terem identificado a seqüência, ele observaram que este miR apresentava complementaridade parcial com a região 3'- UTR (*untranslated region*- uma região que não traduz proteína) do RNA mensageiro (RNAm) da proteína lin-14 (Fig. 2).



**Figura 2:** MicroRNA lin-4 com complementaridade parcial à região UTR 3' do RNA mensageiro para a proteína lin-14.

Mais surpreendente ainda foi a observação de que, devido a essa complementaridade parcial, ao se ligar ao RNAm de lin-14, o miR lin-4 formou um complexo



que resultou na inibição da tradução deste RNAm. Trata-se de uma evidência de regulação gênica por este miR que ocorre após a transcrição de *lin-14*. Lamentavelmente, essa descoberta não teve muita repercussão naquele momento, já que a comunidade científica inferiu que este fenômeno se restringia ao *Caenorhabditis elegans*. Tanto foi que o segundo miR, *let-7*, só foi descrito 7 anos depois e no mesmo animal. Ele apresentava as mesmas características do *lin-4*, em termos de mecanismo de atuação, mas dessa vez com complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNAm da proteína *lin-41* (Reinhart, Slack *et al.*, 2000; Lee e Ambros, 2001).

Contudo, o fenômeno continuava restrito àquela espécie até que, recentemente, surgiram relatos da existência de miRs em insetos e mamíferos (Ambros, 2001; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2001; Ambros, Lee *et al.*, 2003; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003; Ambros e Lee, 2004; Mattick, 2005). Após a compilação de todos estes achados e na conformidade do que foi visto, vários grupos de pesquisa entraram em consonância quanto ao caráter ecumênico, em termos de mecanismo de ação, da atuação dos miRs pela complementaridade ao RNAm alvo e a importância disso no controle das funções nas células eucariotas. Mais do que isso ainda, verificou-se que estes ncRNAs são filogeneticamente conservados e que são codificados por genes localizados nas regiões entre os genes codificadores de proteínas e por íntrons (Mattick e Gagen, 2001; Bartel, 2004; Bartel e Chen, 2004; Mattick, 2005; Mattick e Makunin, 2005; 2006).

## 1.2 Biogênese de microRNAs

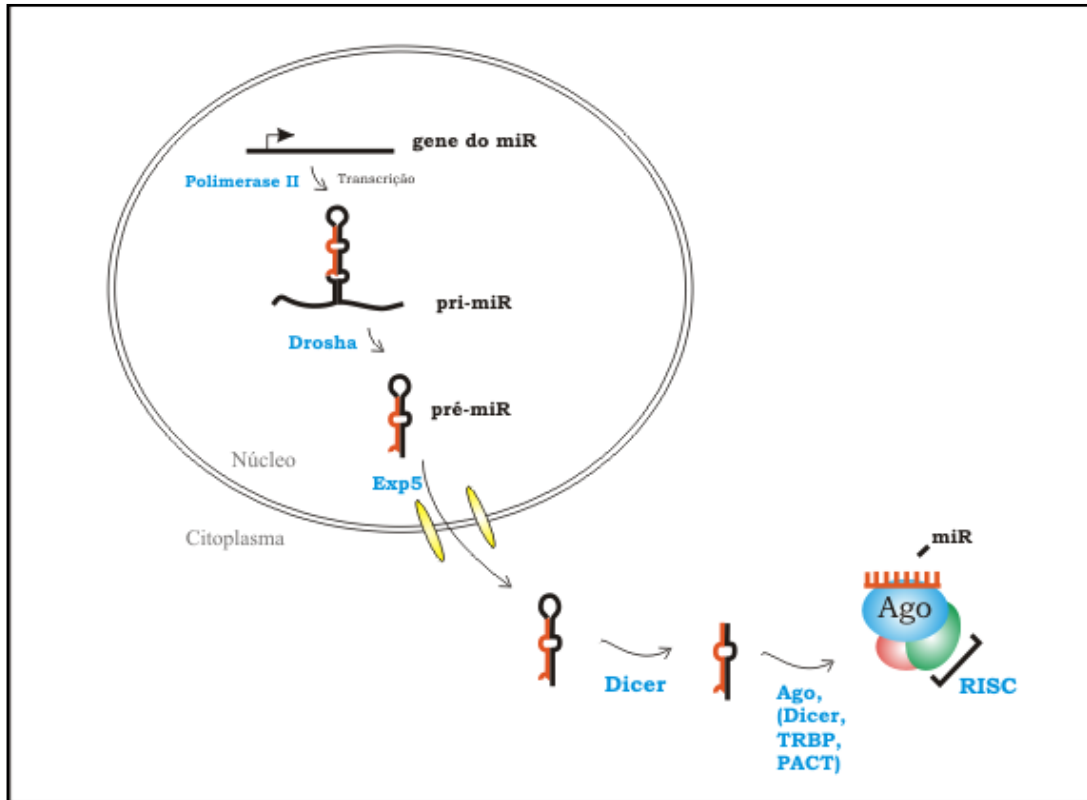
A síntese de um miR envolve vários passos de processamento coordenado e transporte intracelular (Fig. 3), alguns dos quais estão sob especial controle durante o desenvolvimento e diferenciação, ou em resposta a estímulos do meio ambiente (Bartel, 2004; Du e Zamore, 2005). Estes passos incluem: (1) a síntese do transcrito primário contendo um ou mais miRs, (2) processamento destes transcritos pela endonuclease chamada Drosha, RNase tipo III, para produzir um RNA tipo “*hairpin*” com aproximadamente 65 a 75 nucleotídeos (pré-miR), (3) transporte do pré-miR do núcleo para o citoplasma pelo fator de exportação exportina-5 (Exp-5), (4) clivagem do pré-miR no citoplasma pela RNase tipo III específica para dupla-fita, Dicer, em um RNA dupla-fita (dsRNA) de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento e (5) seleção de uma fita do duplex como miR e incorporação no complexo ribonucléico RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Murchison e Hannon, 2004; Kim, 2005).

**Drosha** é uma proteína nuclear (160 kD) da família de ribonucleases III que contém dois domínios *tandem* RNase III (RIIIDs) e um domínio de ligação ao RNA de dupla fita. O substrato principal para Drosha são os transcritos policistrônicos primários de miR (pri-miR) (Lee, Jeon *et al.*, 2002) que possuem normalmente mais de 10 kb, são transcritos por meio da atuação de RNA polimerase tipo II sobre os genes dos miRs (Cai, Hagedorn *et al.*, 2004; Lee, Kim *et al.*, 2004; Kim, 2005) e passam a apresentar uma estrutura de dupla hélice do tipo “*hairpin*” (~70 nucleotídeos). A atividade de Drosha depende da interação com a proteína DGCR8, formando um complexo protéico de 650kD. Ela forma uma espécie de microprocessador (Denli, Tops *et al.*, 2004; Gregory, Yan *et al.*, 2004) que reconhece o seu substrato interagindo com o pri-miR direta e especificamente (Han, Lee *et al.*, 2006). O

produto passa a ser o precursor do miR (pré-miR), o qual migra para o citoplasma por meio de um receptor-transportador situado na membrana nuclear denominado Exportina-5.

**Exportina 5** (Exp5), um membro da família das carioferinas de fatores nucleoplasmáticos, é responsável por exportar os pré-miRs do núcleo para o citoplasma (Bohnsack, Regener *et al.*, 2002; Yi, Qin *et al.*, 2003; Lund, Guttinger *et al.*, 2004). A separação espacial e conseqüente ação seqüencial de Drosha e Dicer, localizados no núcleo e citoplasma, respectivamente, promovem um processamento correto e eficiente de precursores na geração de miRs maduros. Sendo assim, a Exp5 facilita a biogênese de miRs por meio da monitoração da integridade dos pré-miRs e conseqüente liberação desses produtos de Drosha do núcleo para o citoplasma para serem processados por Dicer posteriormente (Lund e Dahlberg, 2006).

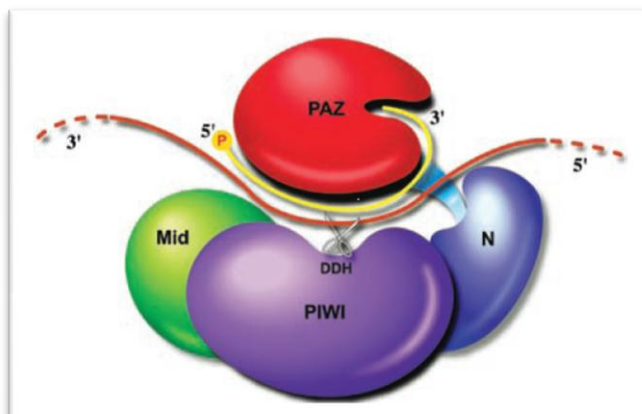
**Dicer** é uma ribonuclease do tipo RNase-III (~220 kDa) com múltiplos domínios sendo responsável por clivar RNAs de ~70 nucleotídeos (pré-miRs) em miRs maduros (Ketting, Fischer *et al.*, 2001; Knight e Bass, 2001). Os membros da família de RNase III mostram, dentre poucas nucleases, especificidade para RNAs de dupla fita (Nicholson, 1999), sendo que a clivagem ocorre, preferencialmente, em suas porções terminais (Zhang, Kolb *et al.*, 2002). Dicer e Exp5 são duas proteínas essenciais para a geração de miRs, pois exibem preferência específica quanto ao substrato em questão (Lund e Dahlberg, 2006).



**Figura 3:** Esquema simplificado da biogênese de microRNA em células eucarióticas.

### 1.3 RISC (RNA-induced silencing complex) e mecanismo de ação de microRNAs

O complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) possui um membro da família Argonata (proteína catalítica) e uma fita guia de RNA (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema da proteína Argonata representando um processo de clivagem de RNA mensageiro. Observa-se que o domínio PAZ ancora um si ou miR que servem de guia para o RNA mensageiro alvo posteriormente clivado pelo domínio PIWI.

O microRNA age como um guia de RISC para o seu alvo por meio da complementaridade de bases. Assim, uma vez incorporado no RISC citoplasmático, o miR especificará a clivagem do RNAm quando ocorrer complementaridade perfeita com o RNAm alvo ou repressão da tradução no caso de apresentar complementaridade parcial com o seu RNAm alvo (Hutvagner, Mclachlan *et al.*, 2001; Zeng, Wagner *et al.*, 2002; Doench, Petersen *et al.*, 2003).

#### **1.4 Especificidade tecidual da expressão de microRNAs**

A análise do perfil de expressão de miRs através de microarranjo de nucleotídeos em diferentes tecidos mostra que a expressão de diversos miRs é restrita a tecidos específicos (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2002; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003; Liu, Valencia-Sanchez *et al.*, 2005; Mehler e Mattick, 2006; Schratt, Tuebing *et al.*, 2006). Esta especificidade tecidual de expressão sugere que alguns miRs têm funções específicas em determinados tipos de células e órgãos. Em relação ao sistema nervoso, diversos miRs têm sido localizados na sua porção central, particularmente no córtex cerebral, no cerebelo e no mesencéfalo (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2002; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003; Liu, Valencia-Sanchez *et al.*, 2005; Mehler e Mattick, 2006; Schratt, Tuebing *et al.*, 2006). Não há, entretanto, qualquer descrição da presença ou atividade de miRs no gânglio da raiz dorsal ou na coluna dorsal da medula espinal, onde a informação nociceptiva é, inicialmente, processada pelo sistema nervoso (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2002; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003;

Kosik e Krichevsky, 2005; Schratt, Tuebing *et al.*, 2006). Entretanto, dados recentes evidenciam que os miRs 1, 16 122a e 206 apresentam seqüências complementares à região 3'-UTR do RNAm de BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003; Lewis, Shih *et al.*, 2003; Bentwich, 2005; Krek, Grun *et al.*, 2005), um fator trófico da família das neurotrofinas. BDNF é expresso em neurônios nociceptivos, tanto do gânglio da raiz dorsal, quanto da coluna dorsal da medula espinal (Ernfors, Rosario *et al.*, 1993; Cho, H. J., Kim, S. Y. *et al.*, 1997; Ha, Kim *et al.*, 2001; Anand, 2004; Lu, Pang *et al.*, 2005) e desempenha uma ação fundamental na transmissão da informação nociceptiva e nos mecanismos de origem e manutenção da dor crônica de origem neuropática e inflamatória (Kerr, Bradbury *et al.*, 1999; Schuman, 1999; Lever, Bradbury *et al.*, 2001; Pezet, Malcangio *et al.*, 2002; Lever, Cunningham *et al.*, 2003; Lucas, Hendolin *et al.*, 2003; Ji e Strichartz, 2004; Matayoshi, Jiang *et al.*, 2005). Juntos, estes dados sugerem de forma contundente uma possível ação de miRs na neurobiologia da dor nociceptiva e na fisiopatologia da dor persistente.

### 1.5 Neurobiologia da dor nociceptiva

Tanto a coluna dorsal da medula espinal quanto o gânglio da raiz dorsal são formados por neurônios ou células da glia, cuja função primordial está relacionada ao controle e transmissão da informação sensorial da periferia para o sistema nervoso central (Zimmermann, 2001; Tsuda, Inoue *et al.*, 2005; Zieglgansberger, Berthele *et al.*, 2005). Estas populações celulares são, particularmente, importantes para a transmissão da informação nociceptiva e a sua reorganização morfo-funcional representa base das alterações fisiopatológicas em estados de dor crônica (Millan, 1999; Zimmermann, 2001; Zieglgansberger, Berthele *et al.*, 2005; Ueda, 2006). A expressão de miRs em neurônios

centrais da medula espinal ou em neurônios periféricos, ou ainda em células da glia da coluna dorsal da medula espinal e do gânglio da raiz dorsal é ainda desconhecida, bem como o padrão de expressão de miRs em estados de dor crônica de origem neuropática decorrente da lesão do sistema nervoso periférico. Entretanto, a expressão acentuada de alguns genes nessas populações celulares após a lesão de nervo periférico sugere um papel potencial para miRs na plasticidade neuronal associada ao estabelecimento de neuropatia periférica.

Entre os diferentes mecanismos associados à transmissão da informação nociceptiva e à fisiopatologia da dor persistente decorrente de lesão do sistema nervoso periférico ou doença inflamatória crônica, destaca-se a ação de Fatores Tróficos. Estes fatores foram originalmente caracterizados como proteínas essenciais para a sobrevivência, diferenciação e crescimento de neurônios durante o desenvolvimento de mamíferos (Kuruvilla, Zweifel *et al.*, 2004; Zweifel, Kuruvilla *et al.*, 2005). Hoje, sabemos que estas proteínas também desempenham um papel crucial no funcionamento do sistema nervoso após o nascimento, quer mantendo as características fenotípicas de neurônios (Lu, 2004; Lu, Pang *et al.*, 2005), quer modulando o fluxo iônico através da membrana celular e iniciando potenciais de ação (Schuman, 1999; Blum, Kafitz *et al.*, 2002), ativando fatores de transcrição (Ma e Quirion, 2001; Miletic, Pankratz *et al.*, 2002; Miletic, Hanson *et al.*, 2004), ou, ainda, promovendo a neurogênese no animal adulto (Siuciak, Altar *et al.*, 1994; Sairanen, Lucas *et al.*, 2005). Dentre esses fatores, o BDNF desempenha um papel fundamental no processamento da informação nociceptiva, tanto em condições fisiológicas, quanto em estados de dor patológica.

O BDNF é um agonista de receptores trk-B que age de maneira bastante diferente dependendo das células em que estiver atuando. Infusões de BDNF junto à substância cinzenta periaquedutal e ao núcleo dorsal da rafe elevaram significativamente a latência da resposta à estimulação térmica dolorosa (Siuciak, Altar *et al.*, 1994). Por outro lado, agonistas do receptor trk-B (BDNF e NT-4) induzem hiperalgesia à estimulação térmica quando

injetados localmente na pele e também induzem a sensibilização de fibras nociceptivas aferentes ao mesmo tipo de estímulos (Shu, Llinas *et al.*, 1999). Foi também demonstrado que a administração de NGF leva a um aumento da síntese de BDNF em neurônios sensitivos primários que expressam *trk-A* (Apfel, Wright *et al.*, 1996), sendo que a maioria deles são fibras nociceptivas do tipo C. Há também evidências de que BDNF pode ser transportado anterogradamente para os terminais centrais que se projetam para as lâminas superficiais da coluna dorsal da medula espinal, localizado em vesículas sinápticas (Michael, Averill *et al.*, 1997). Duas hipóteses têm sido levantadas sobre o papel que BDNF poderia desempenhar na coluna dorsal: ele poderia modular os níveis basais da sensibilidade dolorosa de acordo com a intensidade e duração do estímulo do aferente primário para o neurônio de segunda ordem, ou poderia estar envolvido com a sensibilização central decorrente da estimulação crônica das vias somato-sensitivas (Apfel, Wright *et al.*, 1996; Kerr, Bradbury *et al.*, 1999; Blum, Kafitz *et al.*, 2002; Gomez-Pinilla, Ying *et al.*, 2004).

## 1.6 Ação de BDNF na neurobiologia da dor neuropática

A dor neuropática é uma síndrome crônica incurável que ocorre pela lesão do sistema nervoso e está associada a patologias como câncer, diabetes, herpes zoster e esclerose múltipla (Apfel, Wright *et al.*, 1996; Zimmermann, 2001; Gomez-Pinilla, Ying *et al.*, 2004; Zieglgansberger, Berthele *et al.*, 2005). Esta síndrome caracteriza-se por alodínia, hiperalgesia, dor espontânea, ativação repetida de nociceptores e expansão da área hipersensibilizada (Zimmermann, 2001; Scholz e Woolf, 2002; Zieglgansberger, Berthele *et al.*, 2005). Modelos experimentais têm revelado que esta síndrome é consequência, principalmente, de mudanças morfo-funcionais em neurônios e células gliais presentes no



gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal onde a informação nociceptiva é inicialmente processada pelo sistema nervoso. Entre estas alterações, destacam-se a ativação espontânea de nociceptores, a alteração das características fenotípicas de neurônios associados à transmissão nociceptiva, o aumento da atividade simpática sobre neurônios do gânglio da raiz dorsal, a redução da atividade inibitória de interneurônios espinais e a hiperatividade de células da glia resultando na hipersensibilização de neurônios do gânglio da raiz dorsal e da coluna dorsal da medula espinal (Millan, 1999; Moore, Baba *et al.*, 2000; Zimmermann, 2001; Scholz e Woolf, 2002; Ji e Strichartz, 2004; Marchand, Perretti *et al.*, 2005; Tsuda, Inoue *et al.*, 2005; Zieglgansberger, Berthele *et al.*, 2005; Ueda, 2006).

A lesão de nervo periférico provoca um aumento significativo do RNAm de BDNF tanto em neurônios primários, quanto em neurônios da coluna dorsal da medula espinal (Mannion, Costigan *et al.*, 1999; Thompson, Bennett *et al.*, 1999; Ha, Kim *et al.*, 2001; Lever, Bradbury *et al.*, 2001; Pezet, Malcangio *et al.*, 2002). Sabemos ainda que BDNF exerce uma ação crucial nos mecanismos de redução da atividade sináptica inibitória e na ativação de células da glia (Pezet, Malcangio *et al.*, 2002; Lever, Cunningham *et al.*, 2003; Malcangio e Lessmann, 2003; Coull, Beggs *et al.*, 2005; Tsuda, Inoue *et al.*, 2005; Hayward, 2006). Embora pouco conhecido, os mecanismos de desinibição sináptica na medula espinal após lesão de nervo periférico envolveriam a ação de BDNF sobre a atividade de GABA, glicina e NPY (Schuman, 1999; Cheng e Yeh, 2003; Lever, Cunningham *et al.*, 2003; Obata, Yamanaka, Dai, Mizushima, Fukuoka, Tokunaga e Noguchi, 2004; Obata, Yamanaka, Dai, Mizushima, Fukuoka, Tokunaga, Yoshikawa *et al.*, 2004), além de participar da redução do gradiente de íons Cl<sup>-</sup> através da redução da síntese do canal transportador de íons K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>, KCC2, tornando a inibição sináptica GABAérgica e glicinérgica menos eficiente ou, até mesmo, despolarizante (Coull, Beggs *et al.*, 2005). A lesão de nervo periférico provoca, também, a hiperatividade de células da microglia na coluna dorsal da medula espinal que, uma vez estimuladas por ATP,

aumentam a síntese e a liberação de BDNF (Hayward, 2006). Este aumento da liberação de BDNF pela glia colabora significativamente para a redução da atividade inibitória de GABA e glicina sobre a transmissão sináptica, facilitando a transmissão da informação nociceptiva e o estabelecimento da dor crônica (Hayward, 2006).

### **1.7 Ação de BDNF na neurobiologia da dor inflamatória crônica**

BDNF pode também estar envolvido na hipersensibilidade decorrente da inflamação crônica. Durante doença inflamatória persistente, há um aumento significativo da síntese de BDNF, tanto no gânglio da raiz dorsal, quanto na coluna dorsal da medula espinal. Em ambos os tecidos, este aumento é dependente da atividade de NGF, uma vez que a administração prévia de anticorpos anti-NGF inibe o aumento do RNAm de BDNF (Cho, H. J., Kim, J. K. *et al.*, 1997; Cho, H. J., Kim, S. Y. *et al.*, 1997; Mannion, Costigan *et al.*, 1999). Ocorre ainda um aumento na síntese do receptor trkB na coluna dorsal da medula espinal durante um processo inflamatório crônico de tecido periférico, acompanhando o aumento de BDNF no gânglio da raiz dorsal (Mannion, Costigan *et al.*, 1999). O bloqueio da atividade de BDNF pela injeção intratecal de dímeros protéicos contendo o domínio de ligação extracelular do receptor trk-B atenuou significativamente o desenvolvimento da hipersensibilidade ao estímulo mecânico provocado pela inflamação (Mannion, Costigan *et al.*, 1999).

Sabemos ainda que BDNF produzido no gânglio da raiz dorsal é transportado não só retrogradamente para a periferia, mas também anterogradamente para a medula espinal (Chao, 1992). O aumento do transporte anterógrado nos terminais centrais do gânglio da raiz dorsal durante o processo inflamatório persistente pode agir diretamente em

neurônios pós-sinápticos localizados na coluna dorsal da medula espinal (Lohof, Ip *et al.*, 1993; Lin, Wu *et al.*, 1998; Matayoshi, Jiang *et al.*, 2005). Além disso, o aumento da liberação de BDNF na medula espinal pode também modular a transmissão sináptica na medula espinal potencializando a atividade de receptores NMDA (Lohof, Ip *et al.*, 1993; Lin, Wu *et al.*, 1998; Matayoshi, Jiang *et al.*, 2005).

### 1.7 MicroRNAs e dor

Devido à recente descoberta e por se tratar de um assunto em plena ascensão, a literatura ainda é escassa quando se tenta relacionar microRNAs e sistema nociceptivo. A única evidência de que um estímulo nociceptivo pode afetar a expressão de miRs neste sistema foi dada por Gung Bai e colaboradores (Bai, Ambalavanar *et al.*, 2007). Em 2007, estes pesquisadores identificaram alterações na expressão de alguns miRs no gânglio trigeminal de ratos que foram submetidos à condição dolorosa de origem inflamatória por meio da injeção unilateral de *complete Freund's adjuvant* (CFA) no músculo masseter. Neste estudo, eles detectaram a expressão dos miRs-10a, -29a, 98, 99a, 124a, 134 e 138 no gânglio trigeminal e essa expressão diminuiu durante as primeiras 4 horas perdurando até 1 dia após a injeção. Trata-se do primeiro e único trabalho até o presente momento que mostrou um possível envolvimento de miRs na regulação gênica em neurônios durante uma condição dolorosa desencadeada por inflamação persistente. Isto sugere que miRs podem estar no controle de eventos moleculares de células do sistema nervoso central e periférico responsáveis pela propagação e processamento da informação nociceptiva.

Várias são as condições dolorosas que levam a uma ativação do sistema nociceptivo. Cada uma delas possui mecanismos específicos que são responsáveis por desencadear e/ou manter a dor. Como já foi mencionado, um dos mecanismos nociceptivos que atua tanto na dor aguda e principalmente na dor crônica diz respeito à ação de BDNF no sistema nociceptivo. Devido a essa importância, foram selecionados os miRs-1, -16, -122a e 206 para este estudo. Bancos de dados disponíveis na internet (ex: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) sugerem que estes miRs, dentre outros, possuem complementaridade parcial ao RNA mensageiro de BDNF, o que indica a existência de um possível controle deles sobre a produção desta proteína.

## 2. OBJETIVOS

Diante de tudo isso, este projeto objetivou em investigar os mecanismos moleculares associados à regulação da síntese de BDNF em tecidos envolvidos com o processamento do estímulo nociceptivo. Assim, foi feita a monitoração da especificidade tecidual e temporal da expressão de miRs que possuem complementaridade parcial ao RNA mensageiro de BDNF (miRs-1, -16, 122a e -206) no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal após estimulação nociceptiva aguda e em modelos experimentais de dor crônica. Foram investigados especificamente:

- I. A expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal após a estimulação nociceptiva aguda;
- II. O padrão de expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal em modelo experimental de dor crônica de origem inflamatória periférica;
- III. O perfil temporal da expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal após modelo experimental de dor crônica de origem neuropática ocasionada por lesão parcial de nervo periférico;
- IV. O perfil temporal da expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal em modelo experimental de dor crônica de origem neuropática ocasionada por transecção total de nervo periférico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C com peso entre 25 e 30g adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Durante o experimento, eles foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, livre acesso à comida e água.

#### 3.1 Modelo experimental de estimulação aguda de fibras nociceptivas do tipo C

A estimulação aguda de aferentes primários não-mielinizados (fibras do tipo C) foi feita pela injeção subcutânea de capsaicina 2 e 10  $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$  (Sigma) na região dorsal da pata posterior dos animais, unilateralmente. A capsaicina é um composto (8-metil-N-vanilil-1-6-nonamida) derivado da pimenta chili, agonista de receptores vanilóides (TRPV1) presentes seletivamente neste tipo de fibra. Esta substância, imediatamente após ser injetada nos tecidos, causa uma sensação de ardência e queimação. Determinou-se uma duração para o estímulo de 10 minutos. Após esse tempo, os animais foram rapidamente sacrificados para coleta dos tecidos de interesse para análise. Os animais do grupo controle receberam injeção da solução veículo (5% etanol, 5% Tween-20 e 90% salina).

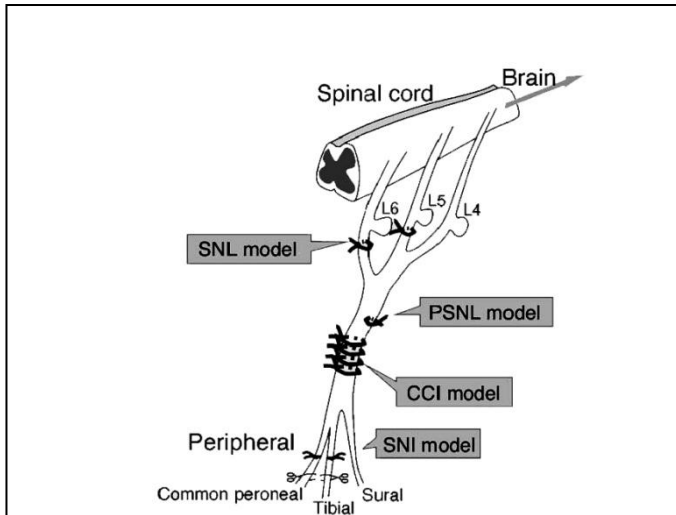
### **3.2 Modelos experimentais de dor crônica**

#### **3.2.1 Modelo experimental de dor crônica de origem inflamatória periférica**

A doença inflamatória crônica foi induzida pela injeção unilateral de 20  $\mu$ L de Adjuvante Completo de Freund (CFA, fragmentos da forma inativada de micobactéria, *Mycobacterium tuberculosis*), obtido da companhia Sigma, na região dorsal da pata posterior dos animais. O desenvolvimento da hipersensibilidade ao estímulo mecânico foi monitorado 12 horas e 1, 3 e 7 dias após a injeção de CFA. Para o grupo controle, injetou-se 20  $\mu$ L de veículo (óleo mineral).

#### **3.2.2 Modelo experimental de dor crônica de origem neuropática induzida por lesão parcial de nervo periférico**

Para o modelo de dor neuropática induzida por lesão de nervo periférico (Seltzer, Dubner *et al.*, 1990; Malmberg e Basbaum, 1998), os camundongos foram anestesiados com quetamina (0,3 mL) e xilazina (0,1 mL) subcutaneamente. O ato cirúrgico consistiu de incisão na coxa esquerda dos animais seguida da ligadura parcial do nervo isquiático (fig. 5). Para isso, foi utilizado fio de sutura de seda (8-0) que, com a realização de um nó cirúrgico, comprimiu-se cerca de 2/3 do nervo. A sutura de pele foi feita com grampo metálico. Os animais (grupos de 6 a 8) foram sacrificados 1, 3, 7 e 14 dias após a lesão. Como controle, foram utilizados animais submetidos à lesão fictícia em que foi feito somente o acesso cirúrgico, sendo que o nervo isquiático permaneceu intacto.



**Figura 5:** Esquema representando os vários modelos de indução de neuropatia periférica por ligadura do nervo isquiático. O modelo de Seltzer, também chamado de lesão parcial de nervo isquiático está indicado na figura como *PSNL (partial sciatic nerve ligation) model*.

### 3.2.3 Modelo experimental de dor crônica de origem neuropática induzida por axotomia de nervo periférico

Este tipo de lesão de nervo periférico foi realizado pela transecção completa do nervo isquiático, unilateralmente. Um segmento de aproximadamente 2 mm foi retirado e ambos os cotos que foram ligados com fio de sutura 8-0 não-absorvível. Após a lesão, os animais (grupos de 6 a 8) foram sacrificados 1, 3 e 7 dias após o ato cirúrgico. Como controle, foram utilizados animais submetidos à cirurgia com lesão fictícia.



### **3.3 Análise de comportamento**

#### **3.3.1 Monitoramento do comportamento nocifensivo durante estimulação aguda de fibras do tipo C**

Para o monitoramento da estimulação aguda de fibras do tipo C induzida por capsaicina, aferiu-se o tempo em que os animais permaneceram exibindo uma atividade nocifensiva (comportamento no qual o animal procura proteger a sua pata, lambendo, mordendo ou evitando colocá-la ao solo) durante um período de 10 minutos após a injeção.

#### **3.3.2 Monitoramento das alterações de sensibilidade ao estímulo mecânico após lesão de nervo periférico e injeção de CFA**

A avaliação da sensibilidade somática ao estímulo mecânico foi feita por meio da utilização dos filamentos de *von Frey*. Trata-se de um conjunto de nove filamentos de *nylon* de diferentes diâmetros, responsáveis por empregar intensidades de força diferentes. Estes filamentos foram aplicados sobre a superfície plantar da pata posterior de cada animal, sendo que o limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição seqüencial da força (de 1,62 mN a 35,59mN) de cada estímulo. O procedimento de monitoramento da sensibilidade mecânica baseou-se no método de Dixon (Chaplan, Bach *et al.*, 1994) e os filamentos utilizados foram: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. O teste começou sempre com o filamento 8 e a contagem da série de respostas foi iniciada quando a primeira resposta

foi negativa e a segunda positiva. A partir deste primeiro conjunto de resposta negativa/positiva, foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) imediatamente inferior, enquanto que uma resposta negativa é sempre por um estímulo (filamento) imediatamente superior. Uma resposta é considerada positiva quando o animal retira a pata ao estímulo mecânico.

O limiar de retirada da pata do animal foi determinado observando o padrão de respostas que é inserido no cálculo a seguir:

$$50\% g = 10^{[X_f + K \cdot \Delta]}$$

Sendo que:  $X_f$  é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10.

$K$  é o valor da seqüência de seis respostas cujos dados foram retirados da tabela (Chaplan, Bach *et al.*, 1994)

$\Delta$  é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.

Os testes foram executados antes e após a lesão parcial de nervo periférico e a injeção de CFA.

### **3.4 Processamento de tecidos para quantificação relativa**

#### **3.4.1 Extração de RNA**

Após os animais terem sido sacrificados por deslocamento cervical, ipsilateralmente às lesões ou injeções, os gânglios da raiz dorsal e o corno dorsal da medula espinal correspondentes aos segmentos lombares de L<sub>4</sub> a L<sub>6</sub> foram rapidamente removidos e homogeneizados em reagente Trizol® (Invitrogen) dando seqüência à extração de RNA total como descrito em protocolo padrão deste fornecedor. O êxito da extração foi verificado pela quantificação de RNA total das amostras em espectrofotômetro (260 nm).

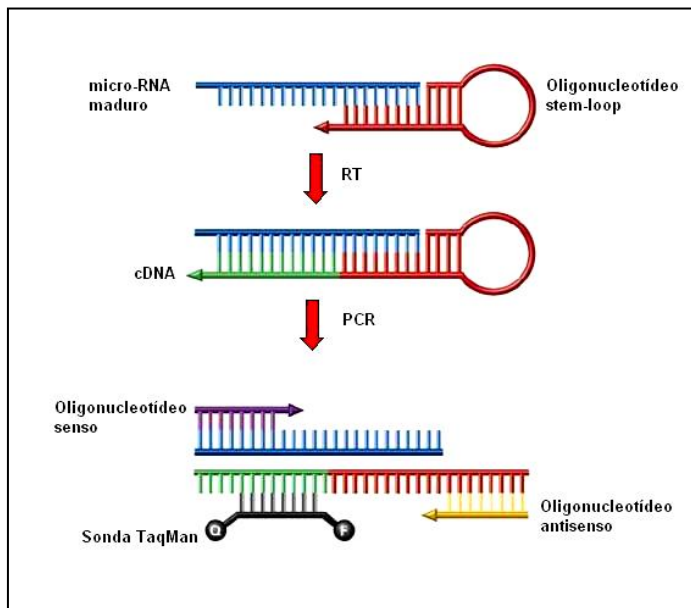
### 3.4.2 Transcrição Reversa

Para a verificação da expressão dos miRs-1, -122a, -16 e -206 (Fig. 6), foi utilizada a técnica da reação da cadeia de polimerase (PCR) a partir da transcrição reversa (RT) com múltiplos *primers* (*multiplex*). O snoR-202 (*small nucleolar RNA*) foi utilizado como controle endógeno. A reação de transcrição reversa para estes miRs e para o snoR-202 foi feita usando protocolo padrão do *TaqMan® MicroRNA RT Kit* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado 1,5µL de RT primer *TaqMan® MicroRNAs-1, -122a, -16, -206 e snoR-202 Assay* (*Applied Biosystems*); 0,15 µL de dNTP (100mM); 1,5 µL de RT Buffer 10x; 0,19 µL de inibidor de RNase (20U/µL); 1,0 µL de *Multiscribe RT enzima* (50U/µL); 2,16 µL de livre de nucleases e 15 ng de RNA total num volume total de 20 µL. A reação foi incubada por 30 minutos a 16°C e 30 minutos a 42°C. O produto final foi diluído em 4x com água livre de nucleases.



### 3.4.3 Reação em Cadeira de Polimerase em Tempo Real

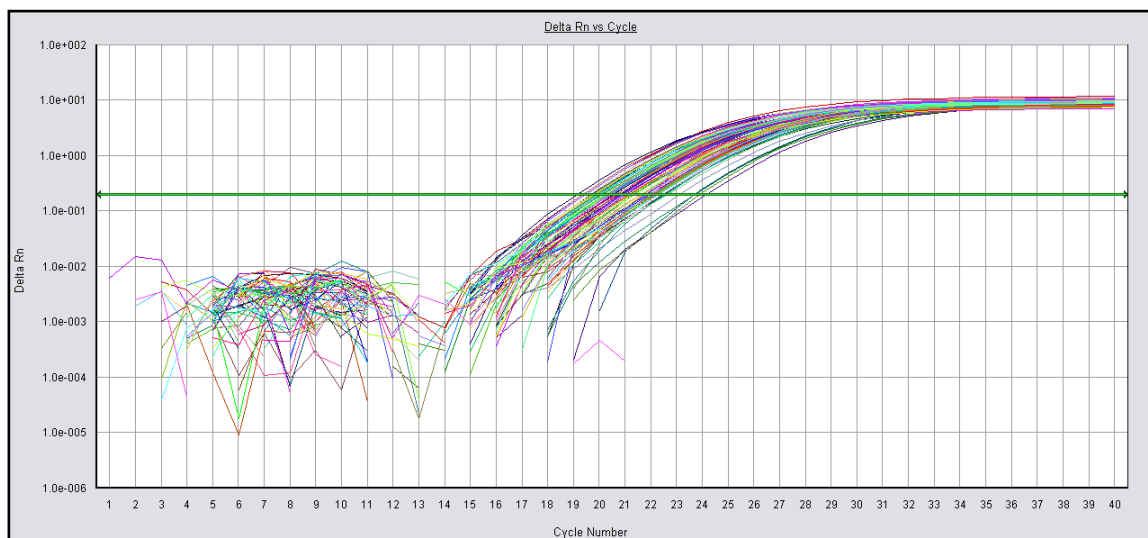
Para a reação de amplificação foi utilizado *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems)* e o conjunto de *primers* e sondas específicos para miR-1, -16, -122a, -206 e snoR-202 do kit *MicroRNA® (Applied Biosystem)* (Fig. 7) seguindo protocolo padrão. As reações foram feitas em duplicata e normalizadas com a expressão do controle endógeno. As amostras foram incubadas simultaneamente por 10 minutos a 95°C (1 ciclo); por 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (40 ciclos). A expressão relativa ao gene snoRNA-202 foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001). O Ct (*cycle threshold*) foi definido como o número fracionado de ciclos em que a fluorescência detectada passa pelo limiar fixado dentro da fase exponencial da curva de amplificação (*threshold*). Calcularam-se, inicialmente, as médias e o desvio padrão dos valores de Ct obtidos nas duplicatas de cada amostra. Foram consideradas apenas as duplicatas com desvio padrão  $\leq 0,2$ . O Ct médio de cada amostra foi normalizado através da subtração do Ct médio do controle endógeno correspondente ( $Ct = Ct_{amostra} - Ct_{snoRNA}$ ). Para o miR-1, -16, -122a e -206 o valor de Ct foi normalizado novamente em relação à amostra calibradora ou de referência ( $Ct = Ct_{amostra} - Ct_{referência}$ ). Neste projeto, a amostra de referência foi representada pelos animais do grupo controle que sofreram lesão fictícia e os que foram injetados com veículo. Este valor foi usado na expressão  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , refletindo a proporção da expressão do gene de cada amostra em relação à amostra de referência. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste estatístico *t-test* de comparações múltiplas.



**Figura 7: Expressão de *miRs* através de RT-PCR em tempo real.** Os oligonucleotídeos anelam-se aos *miRs* maduros, criando uma extensão em '*stem-loop*' durante a reação da transcriptase reversa (RT), originando um cDNA maior que permite o alinhamento, tanto dos oligonucleotídeos, quanto da sonda TaqMan®(PCR).

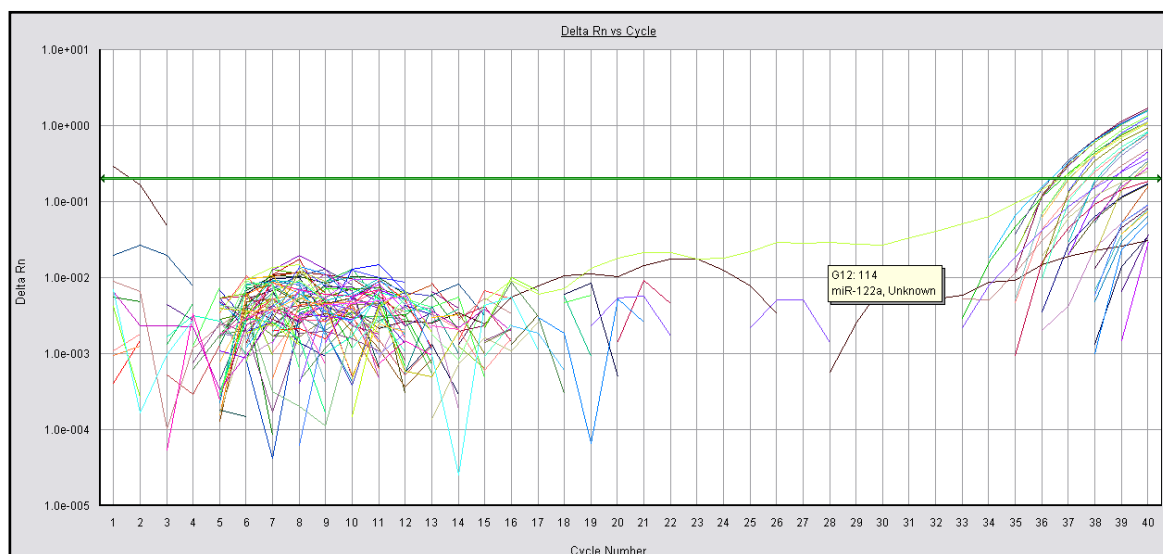
#### 4. RESULTADOS

Analisou-se a expressão de todos os miRs em animais intactos, sendo possível visualizar claramente o evento de amplificação dos miRs-1, -16 e 206 ocorrido após a reação em cadeia de polimerase em tempo real, evidenciando sua expressão no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos (Fig. 8a).



**Figura 8a:** Exemplo de curvas de amplificação obtidas pelo ensaio de PCR em tempo real caracterizando a expressão de miR-16 no gânglio da raiz dorsal no modelo de inflamação crônica periférica induzida pela injeção de CFA.

Entretanto, não foram observadas curvas de amplificação para miR-122a no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal, indicando que este miR não é expresso nestes tecidos ou encontra-se em pouquíssima quantidade em comparação aos outros miRs (Fig. 8b).

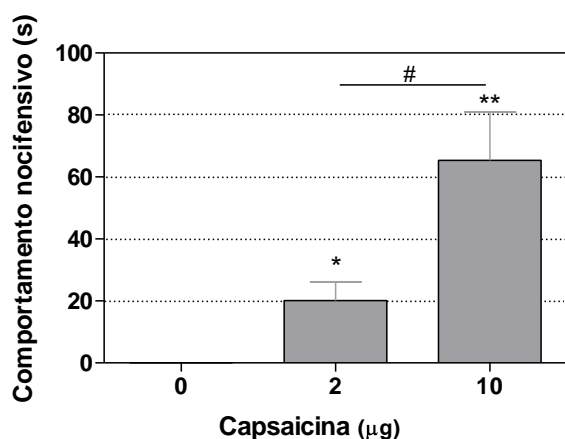


**Figura 8b:** Exemplo de curvas de amplificação obtidas pelo ensaio de reação de PCR em tempo real caracterizando a expressão de miR-122a no gânglio da raiz dorsal no modelo de inflamação crônica induzida pela injeção de CFA.

#### **4.1 Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos a estimulação dolorosa aguda por capsaicina**

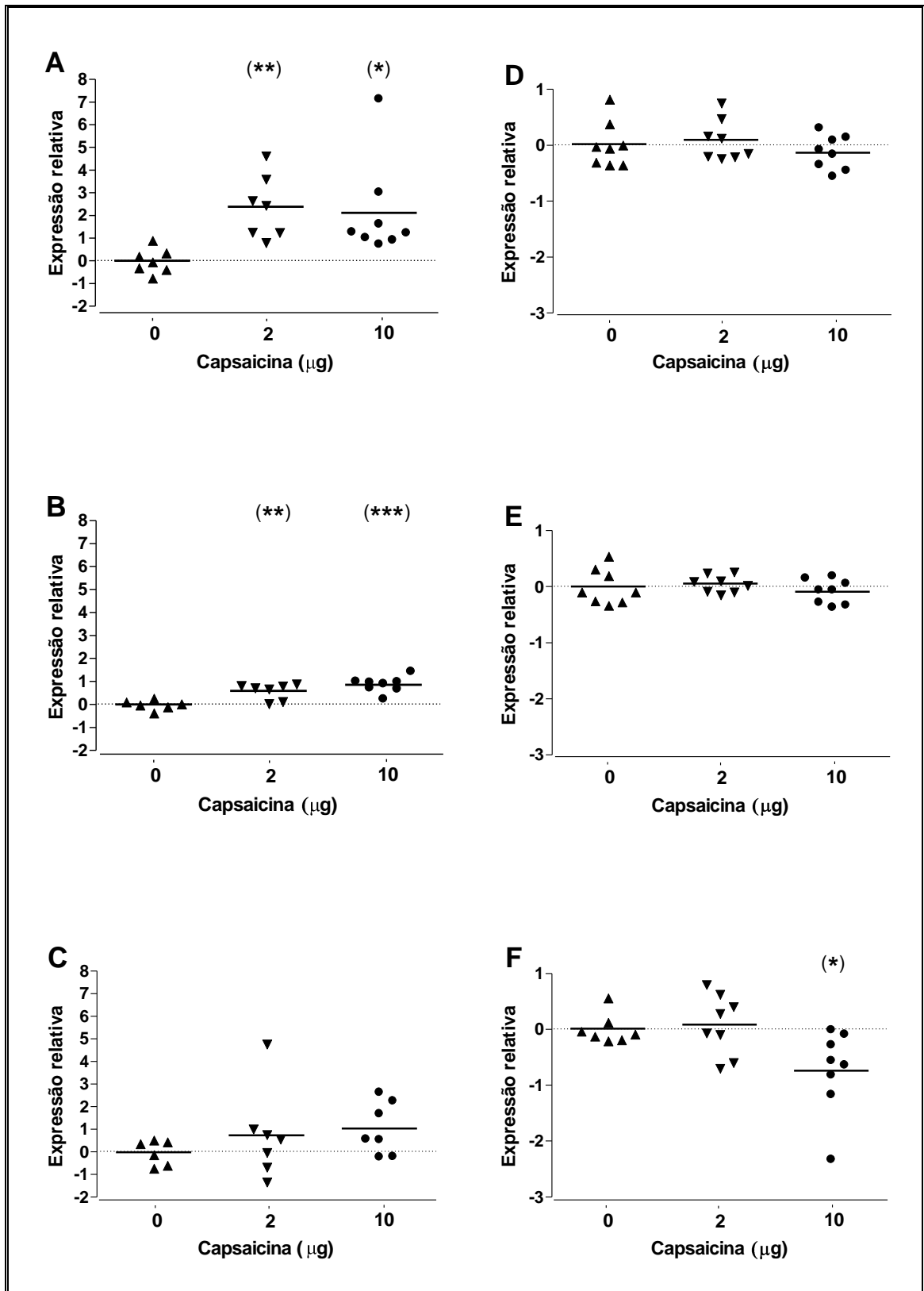
Após a injeção de capsaicina, os animais apresentaram intensa atividade nocifensiva que foi dependente da intensidade do estímulo. Nenhuma atividade nocifensiva foi notada no grupo controle em que o veículo foi injetado (Fig. 9).





**Figura 9:** Efeito da capsaicina frente ao comportamento nocifensivo medido em segundos após 10 minutos de estimulação por injeção de diferentes doses (2 e 10μg/20μL). As colunas representam a média do grupo mais o erro padrão da média. O grupo 0 corresponde ao grupo controle. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e #  $P < 0,05$  (8/grupo; teste não paramétrico de *Mann-Whitney*).

Os miRs-1 e -16 tiveram expressão aumentada no gânglio da raiz dorsal dos animais que foram injetados com as duas concentrações de capsaicina após 10 minutos de estimulação (Fig. 10A,B), enquanto que, no corno dorsal da medula espinal (Fig. 10D,E), não se verificou alterações na expressão destes miRs. Já o miR-206 não exibiu alteração de expressão no gânglio da raiz dorsal (Fig. 10C). Entretanto, uma diminuição pontual foi notada no grupo que recebeu a injeção de capsaicina na concentração de 10μg/20μL (Fig. 10C).

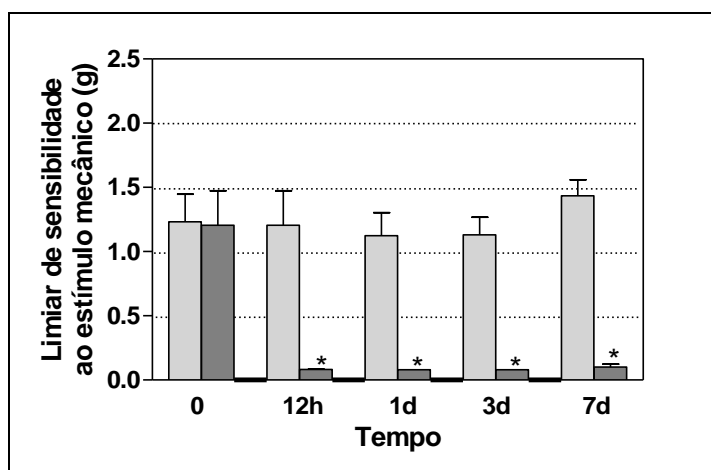


**Figura 10:** Expressão de *miRs-1*, *-16* e *-206* no gânglio da raiz dorsal (A, B e C, respectivamente) e no corno dorsal da medula espinal (D, E e F, respectivamente) em animais submetidos a estimulação dolorosa aguda periférica por capsaicina em diferentes doses. O tempo 0

corresponde ao animais injetados com veículo, sendo o grupo controle para as comparações. As linhas horizontais representam as médias dos grupos. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  (n=6 a 8/grupo; teste *t* de Student)

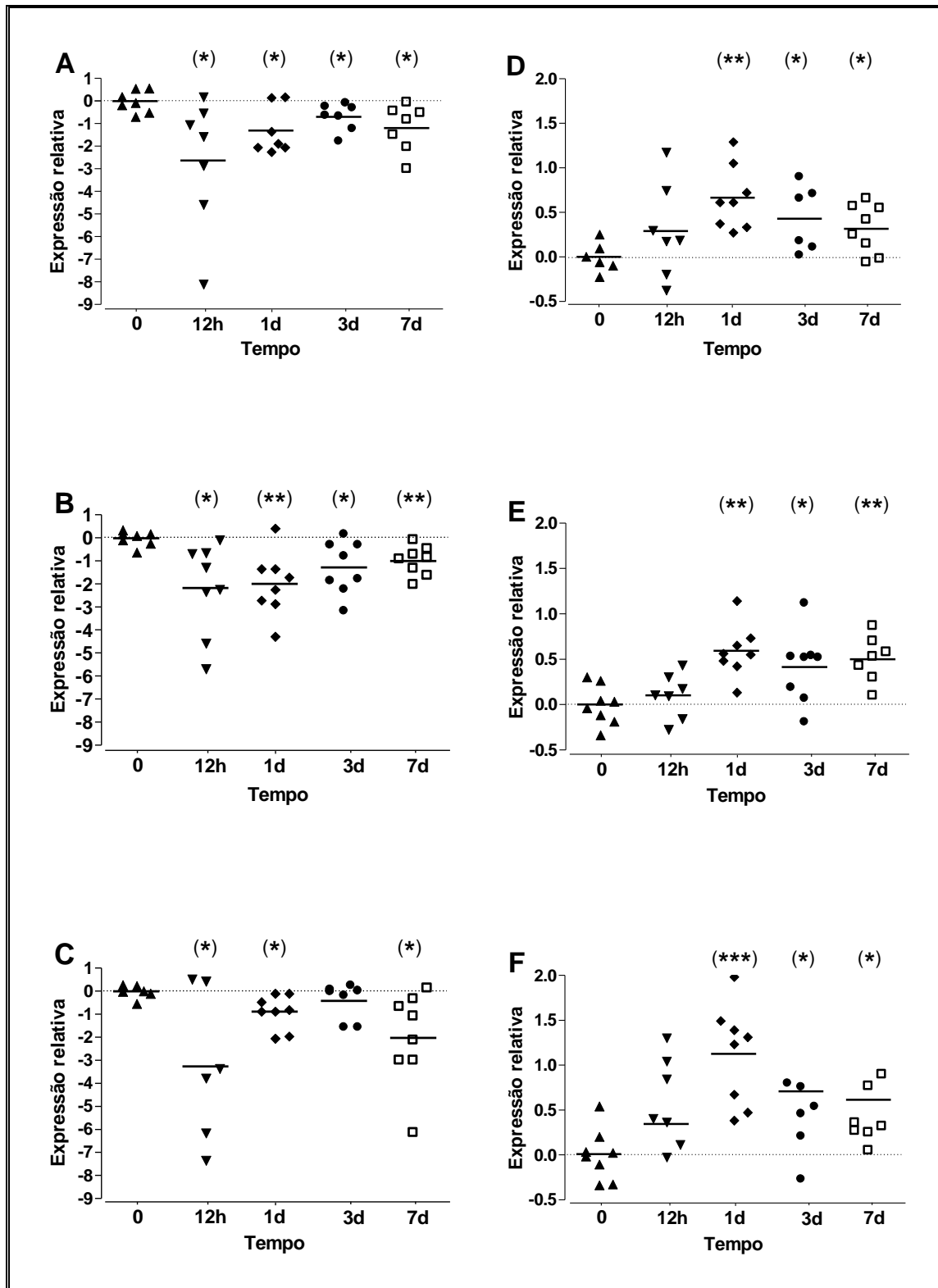
#### 4.2 Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à inflamação crônica induzida por CFA

Notou-se a diminuição do limiar de sensibilidade ao estímulo mecânico em todos os grupos de animais que foram submetidos à injeção de CFA em relação ao seu próprio limiar basal. Não houve diferença no limiar do grupo controle após a injeção de óleo mineral.



**Figura 11:** Efeito da injeção de CFA sobre o limiar de sensibilidade a um estímulo mecânico. As colunas representam a média mais o erro padrão da média, sendo que os valores basais (cinza claro) encontram-se à esquerda dos valores de seus respectivos grupos após-injeção (cinza escuro). O tempo 0 corresponde ao grupo controle injetado com óleo mineral (\*  $p < 0,05$ , teste não paramétrico de Wilcoxon comparando o limiar dos grupos de animais antes e após a injeção).

A cinética de expressão dos miRs-1, -16 e -206 apresentou-se alterada durante inflamação periférica induzida por CFA. (Fig. 12).

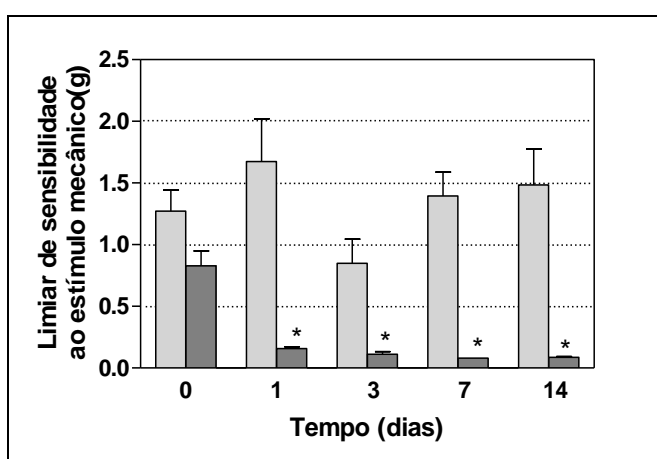


**Figura 12:** Expressão de *miRs-1*, *-16* e *-206* no gânglio da raiz dorsal (A, B e C, respectivamente) e no corno dorsal da medula espinal (D, E e F, respectivamente) em animais submetidos à condição inflamatória induzida por CFA durante tempos diferentes em relação ao tempo 0 que corresponde aos animais injetados com veículo. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  ( $n=6$  a  $8$ /grupo; teste *t* de Student).

A expressão destes três miRs, no gânglio da raiz dorsal, é afetada por este modelo de inflamação induzida, notando-se uma diminuição significativa da expressão dos miRs-1 e -16 em todos os tempos investigados. O miR-206, neste mesmo tecido, teve sua expressão diminuída 12 horas e 1 dia após a injeção de CFA. No terceiro dia, a expressão deste miR retornou a valores semelhantes ao do grupo controle e, no sétimo dia de inflamação, voltou a demonstrar uma diminuição caracterizando perfil oscilatório. Entretanto, no corno dorsal da medula espinal, houve um aumento da expressão destes miRs, só que este aumento só ocorreu a partir do primeiro dia perdurando até o sétimo.

#### 4.3 Análise da expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão parcial do nervo periférico

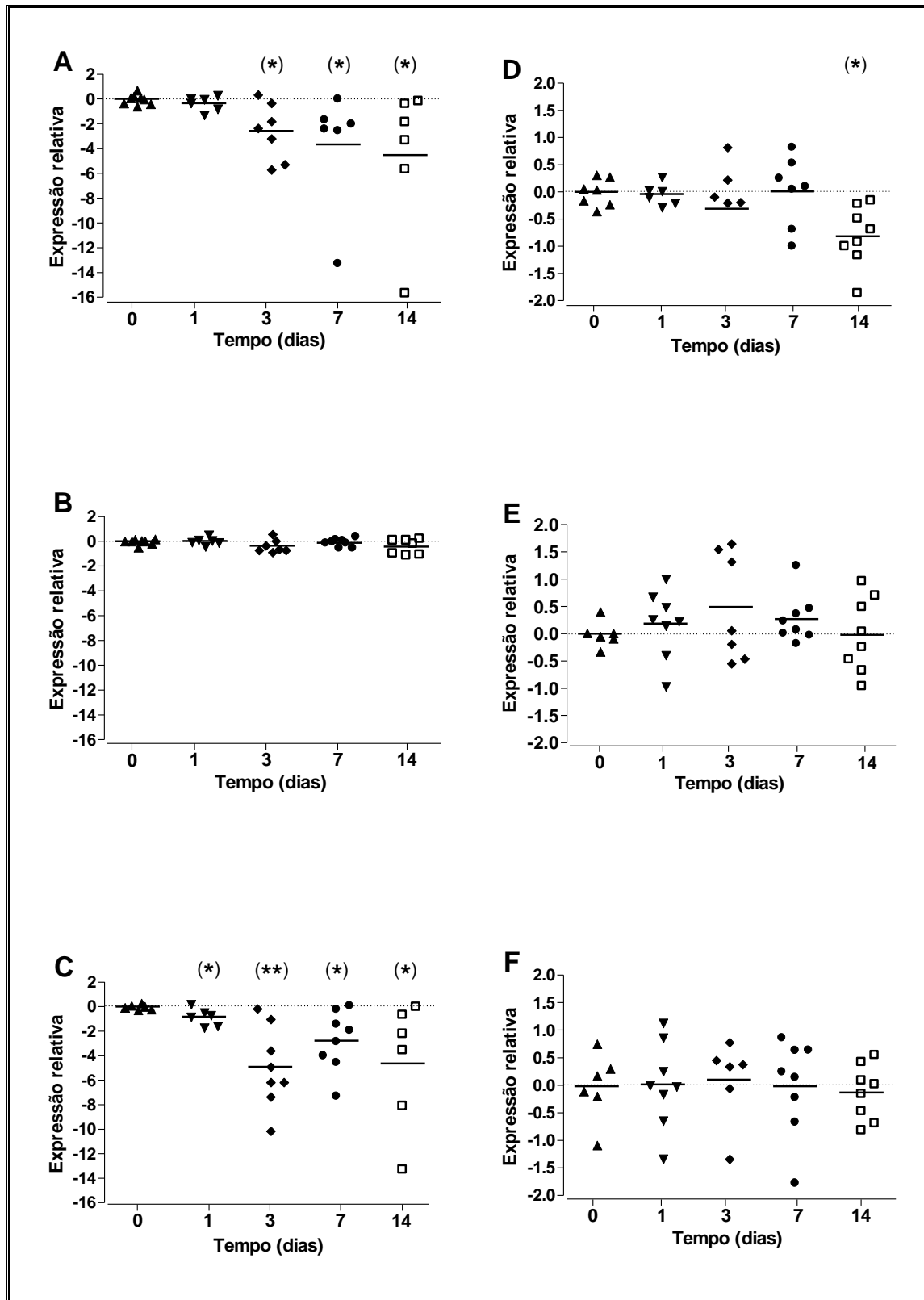
Verificou-se uma diminuição do limiar de sensibilidade ao estímulo mecânico em todos os grupos submetidos à lesão parcial do nervo isquiático (Fig. 13).



**Figura 13:** Efeito da lesão do nervo isquiático sobre o limiar de sensibilidade a um estímulo mecânico. As colunas representam a média mais o erro padrão da média, sendo que os valores basais (cinza claro) encontram-se à esquerda dos valores de seus respectivos grupos de tempos pós-cirúrgicos (cinza escuro). O tempo 0 corresponde ao grupo de animais que sofreram cirurgia com lesão fictícia (\* $p < 0,05$ ; teste não paramétrico de Wilcoxon comparando o limiar dos grupos de animais antes e após terem sofrido a lesão).

A expressão de miR-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal dos animais que sofreram lesão de nervo periférico em comparação ao grupo de animais com lesão fictícia foi analisada obtendo-se os seguintes resultados (**Fig. 14**).

Verificou-se que a expressão do miR-1 diminuiu a partir do terceiro dia de lesão no gânglio da raiz dorsal (Fig. 14A). O miR-206 também teve a sua expressão diminuída neste tecido, porém, esta passou a ocorrer após o primeiro dia de lesão (Fig. 14B). Já no corno dorsal, o miR-1 teve uma diminuição pontual e consistente aos 14 dias de lesão (Fig. 14D), enquanto que o miR-206 não sofreu alterações de expressão significativas (Fig. 14F). A expressão do miR-16 permaneceu sem alterações significativas em ambos os tecidos (Fig. 14B,E).



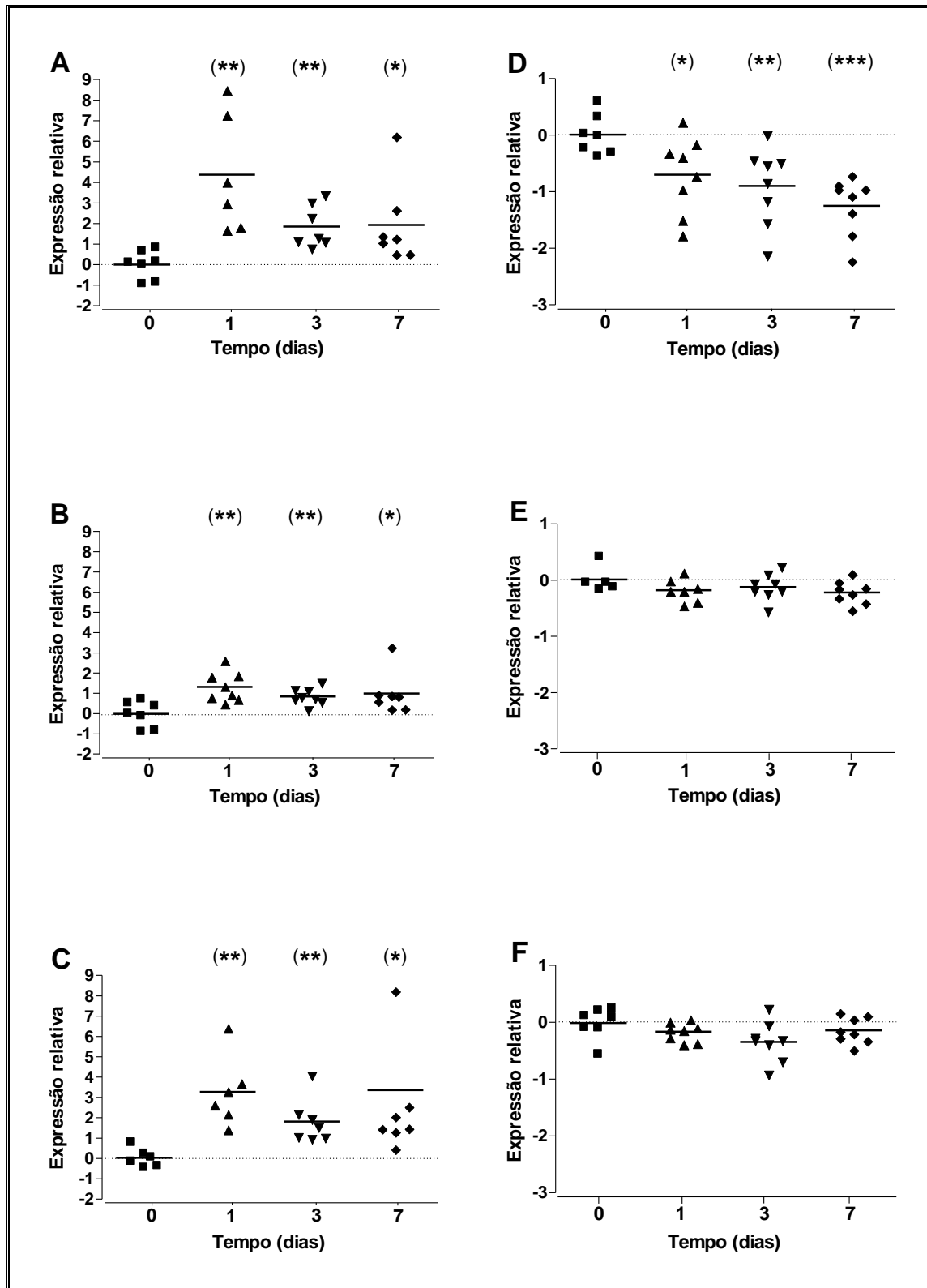
**Figura 14:** Expressão de *miRs-1*, *-16* e *-206* no gânglio da raiz dorsal (A, B e C, respectivamente) e no corno dorsal da medula espinal (D, E e F, respectivamente) em animais submetidos à lesão parcial do nervo isquiático em relação ao tempo 0 que corresponde ao grupo de animais que sofreram lesão fictícia. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  ( $n=6$  a  $8$ /grupo; teste *t* de Student).

#### **4.4 Expressão dos miRs-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à axotomia de nervo periférico**

No modelo de axotomia, os animais apresentam uma deaferentação da pata ipsilateral ao nervo que sofreu a transecção. Por isso, não existe teste comportamental que demonstre o desenvolvimento da hipersensibilidade. Sabe-se também que, por volta dos 7 dias pós-cirúrgicos ou mais, os animais podem apresentar autotomia da pata. Vale destacar aqui que nenhum dos animais que foram submetidos à axotomia neste trabalho, mesmo aos 7 dias após a lesão, apresentou autotomia.

Assim, constatou-se um aumento significativo da expressão de miR-1, -16 e -206 no gânglio da raiz dorsal dos animais axotomizados (Fig. 15 A,B,C). No corno dorsal da medula espinal, alterações só foram encontradas na expressão de miR-1 que se manteve diminuída em todos os tempos (Fig. 15D). Tanto o miR-16 como o -206 não sofreram alterações no perfil de expressão neste tecido (Fig. 15E,F).





**Figura 15:** Expressão de *miRs-1*, *-16* e *-206* no gânglio da raiz dorsal (A, B e C, respectivamente) e no corno dorsal da medula espinal (D, E e F, respectivamente) em animais submetidos à axotomia do nervo isquiático em relação ao tempo 0 que corresponde ao grupo de animais que sofreram lesão fictícia. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  ( $n = 6$  a 8/grupo; teste *t* de Student).

## 5. DISCUSSÃO

Investigamos a especificidade tecidual e temporal da distribuição de quatro miRs maduros em camundongos adultos submetidos a modelos experimentais de dor aguda e crônica. As tabelas 1 e 2 mostram, de forma comparativa, os perfis de expressão dos miRs-1, -16, -122a e -206 no gânglio da raiz dorsal (Tabela 1) e no corno dorsal da medula espinal (Tabela 2) de camundongos submetidos a esses diferentes modelos. Os resultados demonstram que os miRs-1, -16 e -206 são expressos em ambos os tecidos. O miR-122a não foi detectado nestes tecidos, mesmo quando os animais foram submetidos aos diferentes modelos de dor. Outros pesquisadores investigaram pela primeira vez a expressão de alguns miRs no gânglio trigeminal durante a dor muscular de origem inflamatória (Bai, Ambalavanar *et al.*, 2007). Eles não detectaram a expressão do miR-122 nesse tecido. Os nossos resultados corroboram com este relato. Além disso, os miRs-1, -16 e -206 responderam de maneira bastante distinta aos diferentes estímulos nociceptivos. Assim, nossos resultados ressaltam a idéia de que a expressão de microRNAs é (1) altamente específica em relação ao tecido, (2) ao período de expressão (Bartel, 2004; Bartel e Chen, 2004; Bentwich, 2005; Du e Zamore, 2005; Kosik e Krichevsky, 2005; Liu, Valencia-Sanchez *et al.*, 2005; Mehler e Mattick, 2006) e (3) está associada a mecanismos específicos de regulação do sistema nociceptivo.

**Tabela 1:** Análise comparativa da expressão dos miRs-1, -16, 122a e -206 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos a diferentes estímulos nociceptivos.

	<i>miR-1</i>	<i>miR-16</i>	<i>miR-206</i>	<i>miR-122a</i>
Estimulação aguda das fibras do tipo C	↑	↑	↔	<b>n.e.</b>
Inflamação crônica (CFA)	↓	↓	↔ ↓	<b>n.e.</b>
Lesão de nervo periférico (lesão parcial do n. isquiático)	↓	↔	↓	<b>n.e.</b>
Lesão de nervo periférico (axotomia do n. isquiático)	↑	↑	↑	<b>n.e.</b>

↔ sem alteração no perfil de expressão em relação ao grupo controle; ↓ com diminuição da expressão;

↑ com aumento da expressão; ↔ ↓ com diminuição pontual da expressão; ↔ ↑ com aumento

pontual da expressão e **n.e.**, não expresso no tecido.

Os miRs-1 e -16 foram previamente analisados por *Northern blot* e se mostraram fortemente expressos no córtex, cerebelo e mesencéfalo de camundongos (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2002; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.*, 2003), evidenciando que os esses miRs são expressos em locais específicos do sistema nervoso central. Porém, ainda não há relato na literatura da expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e nem no corno dorsal da medula espinal. Assim, nossos resultados descrevem pela primeira vez que miRs são também expressos nesses tecidos, não somente de maneira tecido e tempo-específica, mas são regulados pelo tipo de estímulo nociceptivo.

**Tabela 2:** Análise comparativa da expressão dos miRs-1, -16, -122a e -206 no corno dorsal da medula espinal de camundongos submetidos a diferentes estímulos nociceptivos.

	<i>miR-1</i>	<i>miR-16</i>	<i>miR-206</i>	<i>miR-122a</i>
Estimulação aguda das fibras do tipo C	↔	↔	↔ ↓	<b>n.e.</b>
Inflamação crônica (CFA)	↔ ↑	↔ ↑	↔ ↑	<b>n.e.</b>
Lesão de nervo periférico (lesão parcial do n. isquiático)	↔ ↓	↔	↔	<b>n.e.</b>
Lesão de nervo periférico (axotomia do n. isquiático)	↓	↔	↔	<b>n.e.</b>

↔ sem alteração no perfil de expressão em relação ao grupo controle; ↓ com diminuição da expressão;  
 ↑ com aumento da expressão; ↔ ↓ com diminuição pontual da expressão; ↔ ↑ com aumento pontual da expressão e **n.e.**, não expresso no tecido.

No modelo de dor aguda, investigamos se um estímulo nociceptivo pela injeção de capsaicina seria capaz de influenciar o perfil da expressão dos miRs e se essa alteração

seria correspondente à intensidade desse estímulo. Dez minutos de estimulação foram capazes de ocasionar um aumento significativo da expressão dos miRs-1 e -16 no gânglio da raiz dorsal. Na medula espinal, não houve alterações significativas na expressão destes miRs. A resposta comportamental mostrou-se dependente da concentração de capsaicina utilizada, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a atividade nocifensiva. Entretanto, não foi observada essa correspondência entre a intensidade do estímulo e a expressão dos miRs só foi verificada nos miRs-16 e 206, no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal, respectivamente. A estimulação com capsaicina na concentração de 10 $\mu$ g/20 $\mu$ L foi capaz de diminuir a expressão do miR-206 no corno da raiz dorsal. Nos demais casos, não se observou diferença significativa entre os grupos estudados. De qualquer forma, fica evidente a rapidez de atuação dos mecanismos responsáveis pela regulação da expressão dos miRs. Um possível mecanismo que pode explicar este fenômeno seria o da interação entre miRs e os genes de expressão rápida (IEGs - *immediate-early genes*), tais como *c-fos*, *c-jun* e *c-myc*. Estes genes mostram rápida e transiente expressão sob diferentes tipos de estimulação (Kovacs, 2008). Em particular, *c-fos*, que em condições basais é expresso em níveis muito baixos no cérebro, tem o seu perfil de expressão estereotipadamente induzido em resposta a vários sinais extracelulares incluindo íons, neurotransmissores, fatores de crescimento e drogas. Acredita-se que estes genes regulatórios estão envolvidos na interação entre estímulo extracelular e os mecanismos de transcrição. É também aceito, de maneira geral, que *c-fos* é um marcador genérico de despolarização neuronal frente a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos específicos. Alguns autores têm sugerido que a regulação da tradução de Fos pode ocorrer por meio da ligação de miRs às regiões 3'-UTR do seu RNAm (Bartel, 2004; Eckstein, 2005; Mattick e Makunin, 2005). Neste contexto, o sistema nociceptivo provê um excelente modelo de investigação dos mecanismos de interação entre miRs e IEGs. A capsaicina é capaz de despolarizar neurônios sensoriais aferentes primários (fibras do tipo C) por meio de um potencial receptor transiente gerado em receptores vanilóides do tipo 1

(TRPV1), um canal catiônico não-seletivo (Szallasi e Blumberg, 1999). Além disso, sabe-se que a estimulação por capsaicina é capaz de aumentar a expressão de *c-fos* tanto no gânglio da raiz dorsal como na medula espinal e em outros locais do sistema nervoso (Winter e Evison, 1991; Pilyavskii, Maznychenko *et al.*, 2005; Eijkelkamp, Kavelaars *et al.*, 2007). Assim, os diferentes perfis de expressão dos miRs-1, -16 e -206 sugerem um possível envolvimento deles nos mecanismos que controlam a expressão dos IEGs.

Dados recentes sugerem ainda um possível envolvimento de miRs na síntese rápida de neurotransmissores no terminal sináptico. A inibição do miR-206 em células-tronco mesenquimais derivadas de neurônios resultaram na síntese e liberação de substância P, fornecendo evidências de uma nova função reguladora para os miRs quanto à síntese de neurotransmissores (Greco e Rameshwar, 2007). Outros achados sugerem que miRs se ligam a transcritos associando-se a polirribossomos e que são posteriormente compartimentalizados em vesículas em terminais sinápticos (Kim, Krichevsky *et al.*, 2004). Neste modelo, as sinapses se formam localmente em resposta a um estímulo extracelular, com a tradução de diferentes transcritos de neurotransmissores, mediando assim a plasticidade sináptica. Desta forma, a habilidade dos miRs em regular a síntese de neurotransmissores nos terminais sinápticos destacando um papel inovador dos RNAs não-codificadores na plasticidade neuronal induzida por diferentes estímulos extracelulares.

Nos modelos de dor crônica, os miRs-1, -16 e -206 mostraram freqüentemente um perfil de expressão oposto no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal (Tabelas 1 e 2). O miR-1 teve sua expressão aumentada no gânglio e diminuída na medula espinal dos animais que sofreram axotomia. Os miRs-16 e -206, neste mesmo modelo, também tiveram a expressão aumentada no gânglio, enquanto que na medula não se verificaram alterações significativas. Durante a inflamação periférica, todos diminuíram sua expressão no gânglio da raiz dorsal, enquanto que na medula espinal eles tiveram a

expressão aumentada. No modelo de lesão parcial de nervo periférico, os miRs-1 e -206 tiveram sua expressão diminuída, enquanto que, na medula, não houveram alterações significativas, a não ser pontualmente aos 14 dias após a lesão, em que verificamos uma diminuição da expressão de miR-1. Esses resultados reforçam a importância do tipo do estímulo no perfil de expressão de miRs no sistema nociceptivo.

Tem-se demonstrado que a expressão endógena de vários miRs altamente específicos está negativamente relacionada com os níveis dos RNAs de seus alvos ((Farh, Grimson *et al.*, 2005; Stark, Brennecke *et al.*, 2005; Sood, Krek *et al.*, 2006). Como já foi dito, a seleção dos miRs -1, -16, 122a e -206 aconteceu por eles apresentarem complementaridade parcial com o RNAm de BDNF (Fig. 3). Este membro da família das neurotrofinas está associado a diferentes mecanismos fisiopatológicos da dor crônica de origens neuropática e inflamatória (Kerr, Bradbury *et al.*, 1999; Mannion, Costigan *et al.*, 1999; Thompson, Bennett *et al.*, 1999; Pezet, Malcangio *et al.*, 2002). Neste contexto, tanto lesões do nervo periférico, quanto processo inflamatório crônico induzem um aumento do RNAm e da proteína BDNF em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal (Ernfors, Rosario *et al.*, 1993; Cho, H. J., Kim, J. K. *et al.*, 1997; Cho, H. J., Kim, S. Y. *et al.*, 1997; Kerr, Bradbury *et al.*, 1999; Mannion, Costigan *et al.*, 1999; Thompson, Bennett *et al.*, 1999; Lever, Bradbury *et al.*, 2001; Blum, Kafitz *et al.*, 2002; Pezet, Malcangio *et al.*, 2002; Anand, 2004; Miletic, Hanson *et al.*, 2004; Matayoshi, Jiang *et al.*, 2005). Uma vez que a atividade de um miR sobre o RNAm alvo é, até o que se sabe no presente momento, sempre inibitória; esperávamos que os miRs associados diretamente ao controle da síntese de BDNF estariam com a expressão diminuída nos modelos experimentais investigados em nosso trabalho. Assim, se os miRs selecionados realmente tivessem uma atuação direta sobre o RNAm de BDNF, eles deveriam apresentar suas expressões reduzidas nos diferentes modelos de dor persistente. Contudo, este fato só ocorreu parcialmente com o miR-1 e -16 no gânglio da raiz

dorsal dos animais submetidos a inflamação por CFA (Fig. 6-A,B), miRs-1 e -206 no gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos a lesão parcial de nervo isquiático e miR-1 na corno dorsal da medula espinal no modelo de axotomia (Tabelas 1 e 2). Considerando ainda este modelo, no gânglio da raiz dorsal, os miRs-1, -16 e -206, ao invés de uma diminuição, apresentaram um aumento significativo em todos os tempos investigados. Aumento semelhante de todos esses miRs foi verificado no modelo de inflamação na medula espinal após um dia de injeção. Juntos, estes resultados sugerem que as mudanças no perfil de expressão desses miRs não são necessária e/ou diretamente responsáveis por alterações na sua atividade em relação a um alvo específico.

Bai e colaboradores (2007) investigaram a expressão de alguns miRs no gânglio trigeminal durante a dor muscular de origem inflamatória (Bai, Ambalavanar *et al.*, 2007). Estes pesquisadores investigaram a expressão dos miRs-10a, -29a, -98, 99a, -124a, -134 e -183 após injeção de CFA no músculo masseter de rato. Monitoraram a expressão de 30 minutos a 14 dias após a injeção. Todos tiveram a expressão significativamente diminuída até 4 horas após a injeção de CFA. Por volta dos 12 dias de inflamação, todos eles retornaram completamente aos níveis basais ou apresentaram-se ainda mais altos. Alguns miRs demonstraram um padrão oscilatório de expressão (miRs-29a e -134), alterando entre diminuição, elevação e retornando ao patamar basal novamente. Perfis de expressão com esta especificidade temporal têm sido relatados com frequência em relação aos microRNAs particularmente durante diferentes períodos do desenvolvimento ou em períodos específicos da evolução de patologias do sistema nervoso (Olsen e Ambros, 1999; Reinhart, Slack *et al.*, 2000; Lau, Lim *et al.*, 2001; Ambros, Bartel *et al.*, 2003; Lee, Ahn *et al.*, 2003; Chen, Li *et al.*, 2004; Kosik e Krichevsky, 2005). Encontramos também um perfil oscilatório da expressão do miR-206 durante a estimulação por processo inflamatório periférico



Com a descoberta de centenas de miRs, a pergunta mais importante nos nossos dias é: qual é a função destes pequenos RNAs não-codificadores? Considerando *lin-4*, *let-7* e outros miRs identificados por genética, evidências sobre as funções e alvos regulatórios vieram antes que se descobrissem a classe de RNA não-codificados à qual passariam a pertencer (Lee, Feinbaum *et al.*, 1993; Reinhart, Slack *et al.*, 2000; Lau, Lim *et al.*, 2001; Lee e Ambros, 2001). Nestes casos, a função foi determinada por meio da identificação das alterações fenotípicas geradas pela mutação ou pela alteração do sítio complementar dos miRs, sendo que ambos são capazes de alterar a regulação do seu alvo. Em outros casos, a função foi reconhecida realizando-se mutações ou construções de transgênicos que permitiram alterar a expressão de miRs. Porém, as conseqüências fenotípicas geradas por essas metodologias, para a vasta maioria dos miRs, ainda permanecem desconhecidas particularmente em animais por causa da complementaridade parcial. Algumas ferramentas computacionais têm sido desenvolvidas com o intuito de ajudarem na descoberta dos alvos dos miRs, fornecendo indícios de sua função baseados nas características já conhecidas dos possíveis alvos (Rhoades, Reinhart *et al.*, 2002; Enright, John *et al.*, 2003; Lewis, Shih *et al.*, 2003; Stark, Brennecke *et al.*, 2003). Identificar os alvos nos animais tem sido uma tarefa difícil devido à existência de poucos RNAs com complementaridade perfeita aos miRs, o que dificulta a análise. Ademais, os alvos sugeridos representam uma vasta diversidade de funções moleculares e processos biológicos. Assim, muitos miRs de mamíferos não parecem estar somente envolvidos nos níveis mais altos da cascata regulatória dos genes. Aliás, tem-se especulado que miRs estejam operando em diversos níveis para regular a expressão de uma vasta gama de genes (Lewis, Shih *et al.*, 2003). Este poderia ser o caso de alguns miRs investigados aqui, uma vez que a diminuição da expressão nem sempre ocorreu como o esperado nos casos já mencionados.

A idéia de que muitos genes podem ser regulados diretamente por miRs nos força a repensar sobre as nossas expectativas a cerca de suas funções (Lai e Macleod, 2005). Os poucos miRs de animais que foram bem caracterizados controlam processos biológicos específicos por meio da inibição de alguns genes alvos em tempos e locais bem definidos. Vendo por este ângulo, um dado miR pode regular muitos genes funcionalmente não relacionados entre si. Voltando ao exemplo de *lin-4* e *let-7*, que são regulados temporalmente, constatou-se que eles controlam transições do desenvolvimento de *C. elegans* em estágio específicos reprimindo alguns fatores de ação temporal bem específicos. Entretanto, a compreensão de como um único miR pode regular centenas de genes ainda permanece um mistério.

Finalmente, os resultados também sugerem que os miR-1, -16 e -206 podem estar associados a alvos diferentes de BDNF, mas que, igualmente, participam dos mecanismos celulares adaptativos desencadeados no gânglio da raiz dorsal e na coluna dorsal da medula espinal, após lesão de nervo periférico ou durante doença inflamatória crônica. Os miRs aqui selecionados apresentam complementaridade total ou parcial com quase uma centena de outros RNAs mensageiros que, potencialmente, poderiam atuar nos mecanismos neurobiológicos da dor crônica.

Em poucos anos, tem existido um rápido progresso na identificação e determinação do perfil de expressão de miRs. Entretanto, a descoberta de seus alvos regulatórios tem acontecido lentamente. O interesse da comunidade científica vem aumentando. Conseqüentemente, um avanço dos métodos e técnicas de estudo das funções dos miRs vem ocorrendo. Isto oferece esperanças de que algum dia consigamos estabelecer as reais funções desses e de outros miRs no sistema nociceptivo. Além disso, a persistência nos estudos que envolvem miRs, nas mais diferentes áreas da biologia, faz-se fundamental

para podermos futuramente determinar seus mecanismos de ação na fisiopatologia de diversas doenças.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os nossos objetivos e com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- I. A estimulação nociceptiva aguda altera o perfil de expressão de miRs no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal.
- II. Os modelos de indução de dor crônica por inflamação persistente, lesão parcial e total de nervo periférico também são capazes de alterar o perfil de expressão de miRs nesses tecidos.
- III. Os miRs possuem uma alta especificidade temporal e espacial, respondendo também de maneira específica a diferentes modelos de estimulação noceptiva.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell, v.107, n.7, Dec 28, p.823-6. 2001.

Ambros, V., B. Bartel, *et al.* A uniform system for microRNA annotation. Rna, v.9, n.3, Mar, p.277-9. 2003.

Ambros, V. e R. C. Lee. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. Methods Mol Biol, v.265, p.131-58. 2004.

Ambros, V., R. C. Lee, *et al.* MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. Curr Biol, v.13, n.10, May 13, p.807-18. 2003.

Anand, P. Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. Prog Brain Res, v.146, p.477-92. 2004.

Apfel, S. C., D. E. Wright, *et al.* Nerve growth factor regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the peripheral nervous system. Mol Cell Neurosci, v.7, n.2, Feb, p.134-42. 1996.

Bai, G., R. Ambalavanar, *et al.* Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain. Mol Pain, v.3, p.15. 2007.

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.281-97. 2004.

Bartel, D. P. e C. Z. Chen. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. Nat Rev Genet, v.5, n.5, May, p.396-400. 2004.

Bentwich, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. FEBS Lett, v.579, n.26, Oct 31, p.5904-10. 2005.

Blum, R., K. W. Kafitz, *et al.* Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. Nature, v.419, n.6908, Oct 17, p.687-93. 2002.

Bohnsack, M. T., K. Regener, *et al.* Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. Embo J, v.21, n.22, Nov 15, p.6205-15. 2002.

Cai, X., C. H. Hagedorn, *et al.* Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna, v.10, n.12, Dec, p.1957-66. 2004.

Chao, M. V. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. Neuron, v.9, n.4, Oct, p.583-93. 1992.

Chaplan, S. R., F. W. Bach, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods, v.53, n.1, Jul, p.55-63. 1994.

Chen, C. Z., L. Li, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, v.303, n.5654, Jan 2, p.83-6. 2004.

Cheng, Q. e H. H. Yeh. Brain-derived neurotrophic factor attenuates mouse cerebellar granule cell GABA(A) receptor-mediated responses via postsynaptic mechanisms. J Physiol, v.548, n.Pt 3, May 1, p.711-21. 2003.

Cho, H. J., J. K. Kim, *et al.* Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. Brain Res, v.764, n.1-2, Aug 1, p.269-72. 1997.

Cho, H. J., S. Y. Kim, *et al.* Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. Brain Res, v.749, n.2, Feb 28, p.358-62. 1997.

Collins, F. S., A. Patrinos, *et al.* New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. Science, v.282, n.5389, Oct 23, p.682-9. 1998.

Coull, J. A., S. Beggs, *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature, v.438, n.7070, Dec 15, p.1017-21. 2005.

Crick, F. H. On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol, v.12, p.138-63. 1958.

Denli, A. M., B. B. Tops, *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature, v.432, n.7014, Nov 11, p.231-5. 2004.

Doench, J. G., C. P. Petersen, *et al.* siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev, v.17, n.4, Feb 15, p.438-42. 2003.

Du, T. e P. D. Zamore. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. Development, v.132, n.21, Nov, p.4645-52. 2005.

Eckstein, F. Small non-coding RNAs as magic bullets. Trends Biochem Sci, v.30, n.8, Aug, p.445-52. 2005.

Eddy, S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. Nat Rev Genet, v.2, n.12, Dec, p.919-29. 2001.

Eijkelkamp, N., A. Kavelaars, *et al.* Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.293, n.4, Oct, p.G749-57. 2007.

Enright, A. J., B. John, *et al.* MicroRNA targets in Drosophila. Genome Biol, v.5, n.1, p.R1. 2003.

Ernfors, P., C. M. Rosario, *et al.* Expression of mRNAs for neurotrophin receptors in the dorsal root ganglion and spinal cord during development and following peripheral or central axotomy. Brain Res Mol Brain Res, v.17, n.3-4, Mar, p.217-26. 1993.

Farh, K. K., A. Grimson, *et al.* The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. Science, v.310, n.5755, Dec 16, p.1817-21. 2005.

Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature, v.431, n.7011, Oct 21, p.931-45. 2004.

Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, *et al.* Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. J Neurophysiol, v.92, n.6, Dec, p.3423-32. 2004.

Greco, S. J. e P. Rameshwar. MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.39, Sep 25, p.15484-9. 2007.

Gregory, R. I., K. P. Yan, *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature, v.432, n.7014, Nov 11, p.235-40. 2004.

Ha, S. O., J. K. Kim, *et al.* Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. Neuroscience, v.107, n.2, p.301-9. 2001.

Han, J., Y. Lee, *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell, v.125, n.5, Jun 2, p.887-901. 2006.

Hayward, P. Microglial role in neuropathic pain. Lancet Neurol, v.5, n.2, Feb, p.118-9. 2006.

He, L. e G. J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet, v.5, n.7, Jul, p.522-31. 2004.

He, L., J. M. Thomson, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature, v.435, n.7043, Jun 9, p.828-33. 2005.



Hutvagner, G., J. Mclachlan, *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science, v.293, n.5531, Aug 3, p.834-8. 2001.

Ji, R. R. e G. Strichartz. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. Sci STKE, v.2004, n.252, Sep 28, p.reE14. 2004.

Kerr, B. J., E. J. Bradbury, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. J Neurosci, v.19, n.12, Jun 15, p.5138-48. 1999.

Ketting, R. F., S. E. Fischer, *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. Genes Dev, v.15, n.20, Oct 15, p.2654-9. 2001.

Kim, J., A. Krichevsky, *et al.* Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.1, Jan 6, p.360-5. 2004.

Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.5, May, p.376-85. 2005.

Knight, S. W. e B. L. Bass. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. Science, v.293, n.5538, Sep 21, p.2269-71. 2001.

Kosik, K. S. e A. M. Krichevsky. The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective. Neuron, v.47, n.6, Sep 15, p.779-82. 2005.

Kovacs, K. J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. J Neuroendocrinol, v.20, n.6, Jun, p.665-72. 2008.

Krek, A., D. Grun, *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet, v.37, n.5, May, p.495-500. 2005.

Kuruvilla, R., L. S. Zweifel, *et al.* A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. Cell, v.118, n.2, Jul 23, p.243-55. 2004.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.853-8. 2001.

\_\_\_\_\_. New microRNAs from mouse and human. Rna, v.9, n.2, Feb, p.175-9. 2003.

\_\_\_\_\_. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol, v.12, n.9, Apr 30, p.735-9. 2002.

Lai, M. e M. Macleod. MicroRNA--taking regulation of protein synthesis to another level. Cerebrovasc Dis, v.20, n.1, p.49-50; discussion 50. 2005.

Lander, E. S., L. M. Linton, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, v.409, n.6822, Feb 15, p.860-921. 2001.

Lau, N. C., L. P. Lim, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.858-62. 2001.

Lee, R. C. e V. Ambros. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.862-4. 2001.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, *et al.* The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.843-54. 1993.

Lee, Y., C. Ahn, *et al.* The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. Nature, v.425, n.6956, Sep 25, p.415-9. 2003.

Lee, Y., K. Jeon, *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. Embo J, v.21, n.17, Sep 2, p.4663-70. 2002.

Lee, Y., M. Kim, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo J, v.23, n.20, Oct 13, p.4051-60. 2004.

Lever, I., J. Cunningham, *et al.* Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. Eur J Neurosci, v.18, n.5, Sep, p.1169-74. 2003.

Lever, I. J., E. J. Bradbury, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. J Neurosci, v.21, n.12, Jun 15, p.4469-77. 2001.

Lewis, B. P., I. H. Shih, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. Cell, v.115, n.7, Dec 26, p.787-98. 2003.

Lin, S. Y., K. Wu, *et al.* BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. Brain Res Mol Brain Res, v.55, n.1, Mar 30, p.20-7. 1998.

Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, *et al.* MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat Cell Biol, v.7, n.7, Jul, p.719-23. 2005.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.

Lohof, A. M., N. Y. Ip, *et al.* Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. Nature, v.363, n.6427, May 27, p.350-3. 1993.

Lu, B. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. Prog Brain Res, v.146, p.137-50. 2004.

Lu, B., P. T. Pang, *et al.* The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci, v.6, n.8, Aug, p.603-14. 2005.

Lucas, G., P. Hendolin, *et al.* Neurotrophin-4 mediated TrkB activation reinforces morphine-induced analgesia. Nat Neurosci, v.6, n.3, Mar, p.221-2. 2003.

Lund, E. e J. E. Dahlberg. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.71, p.59-66. 2006.

Lund, E., S. Guttinger, *et al.* Nuclear export of microRNA precursors. Science, v.303, n.5654, Jan 2, p.95-8. 2004.

Ma, W. e R. Quirion. Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation. Pain, v.93, n.3, Sep, p.295-301. 2001.

Malcangio, M. e V. Lessmann. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.3, Mar, p.116-21. 2003.

Malmberg, A. B. e A. I. Basbaum. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. Pain, v.76, n.1-2, May, p.215-22. 1998.

Mannion, R. J., M. Costigan, *et al.* Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.16, Aug 3, p.9385-90. 1999.

Marchand, F., M. Perretti, *et al.* Role of the immune system in chronic pain. Nat Rev Neurosci, v.6, n.7, Jul, p.521-32. 2005.

Matayoshi, S., N. Jiang, *et al.* Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. J Physiol, v.569, n.Pt 2, Dec 1, p.685-95. 2005.

Mattick, J. S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. Bioessays, v.25, n.10, Oct, p.930-9. 2003.

\_\_\_\_\_. The functional genomics of noncoding RNA. Science, v.309, n.5740, Sep 2, p.1527-8. 2005.

Mattick, J. S. e M. J. Gagen. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. Mol Biol Evol, v.18, n.9, Sep, p.1611-30. 2001.

Mattick, J. S. e I. V. Makunin. Small regulatory RNAs in mammals. Hum Mol Genet, v.14 Spec No 1, Apr 15, p.R121-32. 2005.

\_\_\_\_\_. Non-coding RNA. Hum Mol Genet, v.15 Spec No 1, Apr 15, p.R17-29. 2006.

Mehler, M. F. e J. S. Mattick. Non-coding RNAs in the nervous system. J Physiol, v.575, n.Pt 2, Sep 1, p.333-41. 2006.

Meister, G., M. Landthaler, *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell, v.15, n.2, Jul 23, p.185-97. 2004.

Michael, G. J., S. Averill, *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, Nov 1, p.8476-90. 1997.

Miletic, G., E. N. Hanson, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor-elicited or sciatic ligation-associated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the rat spinal dorsal horn is reduced by block of tyrosine kinase receptors. Neurosci Lett, v.361, n.1-3, May 6, p.269-71. 2004.

Miletic, G., M. T. Pankratz, *et al.* Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. Pain, v.99, n.3, Oct, p.493-500. 2002.

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

Moore, K. A., H. Baba, *et al.* Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn. Prog Brain Res, v.129, p.63-80. 2000.

Murchison, E. P. e G. J. Hannon. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.3, Jun, p.223-9. 2004.

Nicholson, A. W. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. FEMS Microbiol Rev, v.23, n.3, Jun, p.371-90. 1999.

Obata, K., H. Yamanaka, *et al.* Differential activation of MAPK in injured and uninjured GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. Eur J Neurosci, v.20, n.11, Dec, p.2881-95. 2004.

\_\_\_\_\_. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. Exp Neurol, v.188, n.1, Jul, p.149-60. 2004.

Olsen, P. H. e V. Ambros. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. Dev Biol, v.216, n.2, Dec 15, p.671-80. 1999.

Pasquinelli, A. E., S. Hunter, *et al.* MicroRNAs: a developing story. Curr Opin Genet Dev, v.15, n.2, Apr, p.200-5. 2005.

Pezet, S., M. Malcangio, *et al.* BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? Brain Res Brain Res Rev, v.40, n.1-3, Oct, p.240-9. 2002.

Pilyavskii, A. I., A. V. Maznychenko, *et al.* Capsaicin-induced effects on c-fos expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord. Eur J Pharmacol, v.521, n.1-3, Oct 3, p.70-8. 2005.

Reinhart, B. J., F. J. Slack, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v.403, n.6772, Feb 24, p.901-6. 2000.

Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, *et al.* Prediction of plant microRNA targets. Cell, v.110, n.4, Aug 23, p.513-20. 2002.

Sairanen, M., G. Lucas, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. J Neurosci, v.25, n.5, Feb 2, p.1089-94. 2005.

Scholz, J. e C. J. Woolf. Can we conquer pain? Nat Neurosci, v.5 Suppl, Nov, p.1062-7. 2002.

Schratt, G. M., F. Tuebing, *et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. Nature, v.439, n.7074, Jan 19, p.283-9. 2006.

Schuman, E. M. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. Curr Opin Neurobiol, v.9, n.1, Feb, p.105-9. 1999.

Seltzer, Z., R. Dubner, *et al.* A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain, v.43, n.2, Nov, p.205-18. 1990.

Shu, X. Q., A. Llinas, *et al.* Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. Pain, v.80, n.3, Apr, p.463-70. 1999.

Siuciak, J. A., C. A. Altar, *et al.* Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. Brain Res, v.633, n.1-2, Jan 7, p.326-30. 1994.

Sood, P., A. Krek, *et al.* Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.8, Feb 21, p.2746-51. 2006.

Stark, A., J. Brennecke, *et al.* Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. Cell, v.123, n.6, Dec 16, p.1133-46. 2005.

\_\_\_\_\_. Identification of Drosophila MicroRNA targets. PLoS Biol, v.1, n.3, Dec, p.E60. 2003.

Szallasi, A. e P. M. Blumberg. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev, v.51, n.2, Jun, p.159-212. 1999.

Szymanski, M. e J. Barciszewski. Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. Genome Biol, v.3, n.5, p.reviews0005. 2002.

Thompson, S. W., D. L. Bennett, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.14, Jul 6, p.7714-8. 1999.

Tsuda, M., K. Inoue, *et al.* Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. Trends Neurosci, v.28, n.2, Feb, p.101-7. 2005.

Ueda, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. Pharmacol Ther, v.109, n.1-2, Jan, p.57-77. 2006.

Winter, J. e C. Evison. Capsaicin-induced c-fos in peripheral nervous system glial cells. Ann N Y Acad Sci, v.633, p.628-9. 1991.

Yi, R., Y. Qin, *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev, v.17, n.24, Dec 15, p.3011-6. 2003.

Zeng, Y., E. J. Wagner, *et al.* Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. Mol Cell, v.9, n.6, Jun, p.1327-33. 2002.

Zhang, H., F. A. Kolb, *et al.* Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. Embo J, v.21, n.21, Nov 1, p.5875-85. 2002.

Zieglgansberger, W., A. Berthele, *et al.* Understanding neuropathic pain. CNS Spectr, v.10, n.4, Apr, p.298-308. 2005.



Zimmermann, M. Pathobiology of neuropathic pain. Eur J Pharmacol, v.429, n.1-3, Oct 19, p.23-37. 2001.

Zweifel, L. S., R. Kuruvilla, *et al.* Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. Nat Rev Neurosci, v.6, n.8, Aug, p.615-25. 2005.

# 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](#)