

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

**ADRIANO CARDOZO FRANCIOSI**

**Ação de monoaminas sobre a fosforilação de proteínas  
envolvidas na sinalização do receptor TrkB em um modelo  
experimental de dor neuropática**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ADRIANO CARDOZO FRANCIOSI**

**Ação de monoaminas sobre a fosforilação de proteínas  
envolvidas na sinalização do receptor TrkB em um modelo  
experimental de dor neuropática**

**Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Fisiologia  
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
- Universidade de São Paulo como requisito  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.**

**Área de concentração: Fisiologia**

**Orientador: Prof. Guilherme A. Lucas**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2010**

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL OU TOTAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER VEÍCULO DE COMUNICAÇÃO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE BIBLIOGRÁFICA.**

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Franciosi, Adriano Cardozo

Ação de monoaminas sobre a fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização do receptor TrkB em um modelo experimental de dor neuropática. Ribeirão Preto, 2010.

57 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Lucas, Guilherme.

1. Receptor TrkB. 2. Fosfolipase C gamma-1. 3. Akt. 4. CREB. 4. Dor crônica. 5. Dor neuropática. 6. Corno dorsal da medula espinhal.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriano Cardozo Franciosi

Ação de monoaminas sobre a fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização do receptor TrkB em um modelo experimental de dor neuropática

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - 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 \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Neurofisiologia da Dor, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2006/05471-8; Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) e Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à família e amigos e a todos que constroem o conhecimento científico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador Guilherme Lucas por todo o ensinamento ao longo deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e ao Departamento de Fisiologia por fornecer as condições necessárias à execução deste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa.

À técnica do laboratório e amiga, Sônia Zanon.

Aos colegas de laboratório, que ajudaram muito, cada um à sua maneira, Ricardo, Maria Ida, Paula, Maurício, Rodrigo, Flaviane, Karina, Pedro, Carla, Rafael e Natália.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia: Elisa, Cláudia, Fernando e Carlos, sempre solícitos. E à Maria Luiza pelo café sempre revigorante.

Aos bioteristas Leonardo e Eduardo.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia: Elaine, Thiago (Rod), Pedro, Plínio, Tiago (Shakira), André, Cadú e Angelo (in memoriam).

A todos os familiares que me apoiaram. Aos meus pais, que me fizeram. Aos meus avós, que fizeram meus pais. Aos meus bisavós,...

À minha namorada, Megue, por me namorar.



## ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

GABA - Ácido Gama-aminobutírico

RNA - Ácido ribonucléico

DNA - Ácido desoxirribonucléico

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)

NaV - Canal de sódio sensível à voltagem

TRP - *Transient Receptor Potential*

TRPV1 - Receptor vanilóide tipo 1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*)

CamK - Quinase dependente de calmodulina (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*)

CREB - *cAMP response element-binding*

CRE - *cAMP response element*

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

c-fos - Proteína *c-Fos*

c-jun - Proteína *c-Jun*

Trk - Receptor tirosina quinase (*Tropomyosin-related kinase* ou *Tyrosine receptor kinase*)

TrkB - Receptor tirosina quinase tipo B (*Tropomyosin-related kinase B* ou *Tyrosine receptor kinase B*)

COX-2 - Ciclooxygenase tipo 2

p75 - Receptor para neurotrofinas p75

NGF - Fator de crescimento do nervo (*Nerve growth factor*)

NT3/4 - Neurotrofina 3/4

Tyr - Aminoácido Tirosina

Y - Aminoácido Tirosina

Ser - Aminoácido Serina

Thr - Aminoácido Treonina

PLC $\gamma$ 1 - Fosfolipase C gama 1

PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase

IP3 - Inositol trifosfato

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

SHC - *Src homology 2 domain containing*

DAG - Diacil glicerol

Ca<sup>2+</sup> - íon Cálcio

PKC - Proteína quinase C

PKA - Proteína quinase A

Akt - Proteína quinase B

PKD1 - quinase dependente de fosfoinosítido-3 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*)

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

CETEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

g - grama

mg - miligrama

kg - kilograma

µL - microlitro

mM - milimolar

nm - nanômetro

$g_e$  - equivalente à força gravitacional

V - volt

mA - miliampére

°C - graus Celsius

pH - potencial hidrogeniônico

i.p. - intraperitoneal

PBS - Tampão fosfato salina

TBS - Tampão tris salina

L3 - Vértebra lombar 3

L4 - Vértebra lombar 4

L6 - Vértebra lombar 6

S1 - Vértebra sacral 1

NaCl - cloreto de sódio

NaF - fluoreto de sódio

$\text{Na}_2\text{VnO}_4$  - ortovanadato de sódio

PMSF - fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS - sódio dodecil sulfato

e.p.m. - erro padrão da média

kDa - Quilodáltons

CCD - *Charge-coupled device*

LTP - Potenciação de longo prazo

RTK - Receptor tirosina quinase

GPCR - Receptor acoplado à proteína G (*G-protein coupled receptor*)

PACAP - *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide*

PSL - Ligação parcial do nervo isquiático (*Partial sciatic ligation*)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração esquemática da molécula de BDNF e seus receptores.....	24
<b>Figura 2.</b> Ilustração esquemática das vias de sinalização do receptor TrkB.....	26
<b>Figura 3.</b> Ilustração esquemática das vias de ativação de Akt.....	27
<b>Figura 4.</b> Ilustração do modelo de lesão parcial do nervo isquiático.....	31
<b>Figura 5.</b> Esquematização do decurso temporal do tratamento e testes comportamentais.....	33
<b>Figura 6.</b> Sensibilidade mecânica durante o tratamento crônico com salina.....	38
<b>Figura 7.</b> Sensibilidade mecânica durante o tratamento crônico com imipramina.....	38
<b>Figura 8.</b> Sensibilidade mecânica nos grupos Lesão durante o tratamento crônico com salina e imipramina.....	39
<b>Figura 9.</b> Fosforilação de PLC $\gamma$ 1 após tratamento agudo.....	40
<b>Figura 10.</b> Fosforilação de PLC $\gamma$ 1 após tratamento crônico.....	40
<b>Figura 11.</b> Fosforilação de Akt após tratamento agudo.....	42
<b>Figura 12.</b> Fosforilação de Akt após tratamento crônico.....	42
<b>Figura 13.</b> Fosforilação de CREB após tratamento agudo.....	44
<b>Figura 14.</b> Fosforilação de CREB após tratamento crônico.....	44

## RESUMO

FRANCIOSI, A C. Ação de monoaminas sobre a fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização do receptor TrkB em um modelo experimental de dor neuropática. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

O fator neurotrófico BDNF está envolvido em diversos mecanismos de aumento da eficiência sináptica, incluindo a sensibilização central. A sinalização pelo de seu receptor preferencial, TrkB, é feita por três vias principais: PLC $\gamma$ -1, SHC e PI3K. Quando fosforilado, PLC $\gamma$ -1 torna-se ativo e aumenta a concentração de cálcio intracelular desencadeada por mecanismos dependentes de IP3 e DAG. SHC e PI3K redundantemente levam a ativação de Akt através de fosforilação. Coletivamente estas proteínas podem ativar o fator de transcrição CREB. CREB desempenha um papel fundamental sobre as características neuroplásticas de BDNF associadas aos mecanismos subjacentes à dor neuropática. Camundongos da linhagem Balb / C foram submetidos à ligadura parcial do nervo isquiática (PSL), como descrito por Seltzer. O desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica foi avaliada com monofilamentos, tal como proposto por Chaplan. No 7º dia os animais foram selecionados e agrupados como segue: Controle e PSL tratados com veículo, e Controle e PSL tratados com imipramina (30 mg / kg). Extratos do corno dorsal da medula espinhal foram obtidos após os tratamentos agudo (30 min.) e crônico (21 dias). A fosforilação de proteínas específicas foi avaliada por *western blot* e quantificada por densidade óptica. Os animais lesados desenvolveram alodinia mecânica que foi revertida pelo tratamento crônico com imipramina. A fosforilação de CREB foi significativamente aumentada do 7º ao 28º dias após a lesão e apenas o tratamento crônico foi capaz de restaurar os níveis basais. O aumento da fosforilação de Akt no grupo PSL ocorreu apenas no 28º dia após a lesão, o tratamento com imipramina levou ao aumento na fosforilação de Akt no grupo PSL, tanto aguda como cronicamente. A fosforilação de PLC $\gamma$ -1 manteve-se inalterada, exceto pela diminuição observada no grupo Controle submetido ao tratamento agudo com imipramina. Os antidepressivos, como a imipramina, têm sido utilizados para tratar a dor neuropática de diversas etiologias. Apesar de sua conhecida ação como um inibidor da recaptção da monoaminas, seu mecanismo analgésico contra a dor neuropática não é totalmente compreendido. A latência para alcançar os efeitos sugere um envolvimento em processos transcricionais. De fato, nossos dados mostram que o tratamento crônico, mas não agudo, diminuiu a fosforilação de CREB. Curiosamente, tal como os nossos resultados também sugerem, este evento não parece estar ligado à diminuição na atividade das vias de PLC -1 e Akt. Embora nossos dados de fosforilação de Akt reforcem a hipótese de uma ativação cruzada entre os receptores TrkB e  $\beta$ -adrenérgicos, em conjunto nossos dados sugerem que deve existir outro ponto de interação nas cascatas de sinalização, que seja inibida pelo tratamento com imipramina.

## ABSTRACT

FRANCIOSI, A. C. Role of monoamines on the phosphorylation of proteins underlying TrkB receptor signaling in a neuropathic pain model. Master's Degree Thesis - Ribeirão Preto Medical College, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

The neurotrophic factor BDNF is involved in various mechanisms of synaptic strength, including central sensitization. The signaling through its preferential receptor, TrkB, is carried by three main pathways: PLC $\gamma$ 1, SHC and PI3K. When phosphorylated, PLC $\gamma$ -1 becomes active and increases intracellular calcium concentration triggered by IP<sub>3</sub> and DAG mechanisms. SHC and PI3K redundantly lead to Akt phosphorylation. All together, these proteins can activate the transcription factors CREB. CREB plays a key role on the neuroplastic characteristics of BDNF associated to the mechanisms underlying neuropathic pain. Balb/C mice were submitted to partial sciatic ligation (PSL) as described by Seltzer. The development of tactile mechanical hypersensitivity was measured with monofilaments as proposed by Chaplan. At the 7<sup>th</sup> day animals were selected and grouped as follows: Control and PSL vehicle treated and Control and PSL imipramine (30 mg/kg) treated. Spinal cord dorsal horn extracts were obtained after acute (30 min) and chronic (21 days) treatment. Specific protein phosphorylation was assessed by western blot, quantitated by optical densities. PSL animals developed mechanical allodynia which was reversed by chronic imipramine treatment. The CREB phosphorylation was significantly increased from 7<sup>th</sup> to 28<sup>th</sup> day after lesion and only the chronic treatment was able to restore the basal levels. Akt phosphorylation increased in PSL animals just 28 days after lesion and imipramine led to Akt activation in PSL groups of both treatments. PLC $\gamma$ -1 phosphorylation kept unaltered except for acute treated Control group which displayed decreased phosphorylation. Antidepressants, as imipramine, have been used to treat neuropathic pain of several etiologies. Despite its well-known action as a monoamine reuptake inhibitor, its role in the setting of neuropathic pain is not completely understood. The latency to establish the effects suggests an involvement in transcription processes. In fact, we showed here that chronic, but not acute, imipramine treatment decreased CREB phosphorylation. Interestingly, as our results also suggest, this doesn't seem to be linked to decreased activity in PLC $\gamma$ -1 and Akt pathways. Although our phosphoAkt data reinforce hypothesis regarding crosstalk between TrkB receptor and  $\beta$ -adrenergic, taken together our data suggest that must exist another interaction point in the signaling cascades, downregulated by imipramine treatment.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1. Considerações iniciais.....	15
1.2. Dor.....	15
1.3. Classificação da dor.....	17
1.4. Dor crônica de origem neuropática.....	18
1.5. Plasticidade neural associada à dor neuropática.....	19
1.6. A terapêutica farmacológica da dor.....	21
1.7. Mecanismos de ação de antidepressivos.....	23
1.8. Vias de sinalização de BDNF.....	24
2. Objetivos.....	29
3. Material e métodos.....	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Lesão parcial do nervo isquiático.....	30
3.3. Tratamento e monitoramento das alterações de sensibilidade.....	31
3.4. Extração do corno dorsal da medula espinhal.....	33
3.5. Extração e quantificação de proteínas totais.....	34
3.6. <i>Western blotting</i> .....	34
3.7. Estatística.....	36
4. Resultados.....	37
4.1. Monitoramento do limiar de sensibilidade mecânica em camundongos submetidos à lesão parcial do nervo e à lesão fictícia, após tratamento agudo ou crônico com imipramina.....	37

4.2. Fosforilação de PLC $\gamma$ 1 na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão parcial do nervo periférico após tratamento agudo e crônico com imipramina.....	39
4.3. Fosforilação de Akt na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão parcial do nervo periférico após tratamento agudo e crônico com imipramina.....	41
4.4. Fosforilação de CREB na coluna dorsal da medula espinal de camundongos submetidos à lesão parcial do nervo periférico após tratamento agudo e crônico com imipramina.....	43
5. Discussão.....	45
6. Conclusão.....	51
7. Referências bibliográficas.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Desde os organismos unicelulares, a detecção de características hostis no ambiente fez-se essencial à preservação da integridade individual e conseqüentemente, de espécie. Moléculas protéicas presentes na membrana plasmática são as responsáveis em transduzir o estímulo extracelular em um evento intracelular. A intensidade necessária ao estímulo para que isso ocorra é chamada limiar. A proteína de membrana, chamada receptor de membrana devido ao status transdutor, sofre alteração conformacional quando o limiar é alcançado. Portanto, a mudança de conformação é que desencadeia o sinal intracelular e o limiar é uma característica inerente ao receptor. A diversificação e conservação dos receptores de membrana ao longo do processo evolutivo foram preponderante para o surgimento do sistema nociceptivo em animais. Nesse projeto investigamos a plasticidade neural associada a receptores de neurônios nociceptivos em modelo experimental de dor crônica de origem neuropática.

### 1.2 DOR

Para que a percepção dolorosa ocorra é preciso um sistema que detecte o estímulo nódio e transmita esta informação para estruturas encefálicas capazes de processá-las e proporcionar uma reação contextualmente adequada (Woolf and Ma 2007). Desta maneira, o sistema nociceptivo vale-se de vias que conectam os nociceptores à neurônios superiores, por exemplo, a via espinotalâmica, em que



neurônios situados no corno dorsal da medula espinhal emitem projeções que após decussar, tanto a nível espinhal quanto a nível bulbar, estabelece sinapse com neurônios do núcleo ventrolateral do tálamo. Estes neurônios talâmicos por sua vez, emitem projeções para diversas regiões corticais, como o córtex cingulado e os córtices somatossensoriais, bem como para regiões hipotalâmicas e hipocâmpais, onde a informação nociceptiva é interpretada, associada e armazenada. No hipotálamo, as aferências talâmicas modulam a atividade neuronal e desta maneira ajusta respostas vegetativas ao evento nódio, como aumento da frequência cardíaca. No córtex cingulado as aferências somam-se a muitas outras aferências corticais que estão implicadas na associação de características emocionais ao evento nódio. Nos córtices somatossensoriais as aferências, que apresentam distribuição topográfica, permitem a localização do evento nódio no corpo (Mense 2004; Usunoff, Popratiloff et al. 2006).

Além das projeções neuronais que ascendem do neurônio nociceptivo de segunda ordem, existem projeções descendentes que o tem como destino final, com a finalidade de modular o fluxo de informação que ascende. O sistema descendente de controle da dor, como é chamado, consiste em diversas conexões anatômicas centrais, iniciando pela substância cinzenta periaquedutal, que recebe aferências da medula espinhal e núcleos periventriculares do mesencéfalo e ponte superior. Estas secretam opióides endógenos que ao atuar em interneurônios opioidérgicos são capazes de inibir pré-sinápticamente a liberação de neurotransmissores excitatórios. Além disso, peptídeos opióides podem ativar a vias descendentes ao liberá-la da inibição tónica GABAérgica (Millan 2002).

Os núcleos Magnos da Rafe e a Formação Reticular recebem os axônios das áreas periaquedutais, e estas por sua vez, enviam suas projeções para as lâminas I, II e IV do corno dorsal da medula, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e neurônios do trato ascendente espino-talâmico (Millan 2002).

Nota-se que o sistema nociceptivo é extremamente versátil, sendo a informação nociceptiva passiva de ajustes ao longo de sua condução. Deste modo, é a resultante de inibições e facilitações, nesta circuitaria, que determina a percepção da dor, bem como sua intensidade (Millan 1999; Millan 2002; Zhang and Bao 2006).

### 1.3 CLASSIFICAÇÃO DA DOR

Com relação ao decurso temporal, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda dura apenas o tempo em que existir o estímulo nociceptivo, já a dor crônica pode persistir, ao cessar do estímulo, por períodos variáveis, de dias a meses. Outra maneira de classificar a dor é com relação à sua origem, sendo a dor nóxica decorrente exclusivamente da ativação dos nociceptores, a dor inflamatória decorrente da exacerbação de estímulos nóxios por mediadores oriundos de um evento inflamatório e a dor neuropática decorrente da ativação facilitada e/ou espontânea de elementos do sistema nociceptivo após lesão de estruturas do sistema nervoso a eles relacionados. Nota-se que há uma sobreposição de classificação, sendo a dor aguda, do tipo nóxica, e a dor crônica, dos tipos, inflamatória e neuropática (Scholz and Woolf 2002).

Após a resolução da lesão e/ou processo inflamatório, os mecanismos facilitatórios deixam de existir e a dor volta a ter o caráter nóxio/agudo. No entanto, a dor neuropática continua a ocorrer independente de qualquer estímulo, assim deixando o caráter fisiológico. Por isso, a dor crônica de origem neuropática é considerada patologia do sistema nervoso (Zimmermann 2001).

#### 1.4 DOR CRÔNICA DE ORIGEM NEUROPÁTICA

A dor neuropática decorre da lesão do sistema nervoso central ou periférico, e deste modo, possui diversas etiologias. Infecções virais, como causadas por Herpes Zoster, costumam atingir a face e a região torácica e estão relacionadas ao surgimento da dor neuropática que aflige estas regiões após a cura da doença. O uso de quimioterápicos como a cisplatina também pode levar ao surgimento de dor neuropática não relacionada ao câncer que era tratado. Doenças autoimunes que levam à desmielinização, como Guillain-Barré, também estão associadas à gênese da dor neuropática. Até mesmo acidentes vasculares cerebrais, principalmente os que acometem as proximidades do tálamo, podem desencadear dor neuropática. Mas talvez, a origem mais comum de dor neuropática seja o trauma mecânico, principalmente os que atingem a medula espinhal e os nervos periféricos e suas raízes (Basbaum 2007; Basbaum 2008; Saravanakumar 2010).

Os principais sintomas clínicos são a hiperalgesia e a alodínia. A alodínia é a evocação da dor diante de estímulos que originalmente são inócuos, o que a difere da hiperalgesia, em que ocorre exacerbação do estímulo nóxio. Grande número de modelos de dor crônica que induzem a hiperalgesia e alodínia em roedores tem sido

desenvolvido, a partir da lesão nervosa periférica, e apresentam como resultados sinais comportamentais semelhantes aos sintomas da neuropatia em humanos e têm sido uma ferramenta valiosa na elucidação dos mecanismos por trás da gênese da dor neuropática (Bennett and Xie 1988; Seltzer, Dubner et al. 1990; Kim and Chung 1992; Malmberg and Basbaum 1998; Wang and Wang 2003; Jarvis and Boyce-Rustay 2009).

Entre os possíveis mecanismos da dor neuropática, destacam-se processos que ocorrem no sistema nervoso periférico como a ativação de nociceptores silenciosos, e no sistema nervoso central como a reorganização da conectividade sináptica. Em ambos os casos, os eventos são decorrentes do processo conhecido como plasticidade neural, que consiste na alteração fenotípica neuronal, ou seja, em mudanças em suas estruturas celulares, perfil químico e/ou função e culmina na alteração de suas propriedades de transdução, condução e transmissão. Em alguns casos, um único mecanismo pode produzir a dor neuropática; em outros, mecanismos múltiplos podem contribuir para o seu surgimento (Basbaum 1999; Abrahamsen, Zhao et al. 2008; Jarvis and Boyce-Rustay 2009).

### 1.5 PLASTICIDADE NEURAL ASSOCIADA À DOR NEUROPÁTICA.

Por trás das características da dor neuropática estão diversos mecanismos de plasticidade neural, aqui chamados de sensibilização periférica e central. Três mecanismos genéricos são muito importantes: alteração conformacional de proteínas por mudanças pós-traducionais, como palmitoilação e fosforilação; inserção de proteínas no contexto, como incorporação de receptores residentes em vesículas

citoplasmáticas; e produção de novas proteínas a partir da transcrição de RNA mensageiro (Latremoliere and Woolf 2009).

Diversos trabalhos vêm demonstrando o importante papel de BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) na neuroplasticidade associada a diversos eventos e em diversas áreas do sistema nervoso, inclusive na medula espinhal durante o processo nociceptivo. De fato, esta neurotrofina pode desencadear os três mecanismos chaves listados anteriormente. A fosforilação, indireta, dos canais do tipo NaV e TRP são tidas como principal responsável de seus efeitos imediatos, conferindo a esta neurotrofina o caráter de neurotransmissor sugerido por alguns autores (Pezet, Malcangio et al. 2002; Rose, Blum et al. 2004; Merighi, Salio et al. 2008). A cascata de sinalização desencadeada por BDNF também ativa proteínas envolvidas com a incorporação de vesículas à membrana plasmática, como CamK. E sem dúvida, a ativação de fatores de transcrição, como CREB, *c-fos*, *c-jun* são os grandes responsáveis pelas alterações a longo prazo, desencadeadas por esta neurotrofina (Ernfors and Bramham 2003; Soule, Messaoudi et al. 2006; Minichiello 2009).

CREB faz parte de uma família de proteínas que se liga a uma seqüência específica de DNA denominada CRE, e pode ser fosforilada por múltiplas quinases intracelulares. Diversos genes contêm CREs, como os que traduzem as proteínas ATPase, proencefalina, somatostatina, Fos, tirosina hidroxilase, sendo várias delas intimamente associadas com a nocicepção, como TrkB, COX-2, etc. (Latremoliere and Woolf 2009). Sua atividade é induzida em muitos tipos de células em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, que em neurônios incluem neurotransmissores,

neuromoduladores e fatores tróficos, como o BDNF (Miletic, Hanson et al. 2004). Com isso, a ativação da proteína CREB pode desempenhar papel importante na variedade de certas funções fisiológicas, como por exemplo, processos de aprendizagem e memória, ritmos circadianos, regulação da pituitária, espermogênese (Miyabe and Miletic 2005).

Aumentos na fosforilação de CREB ocorrem tanto em modelos de dor inflamatória, quanto neuropática, sendo proposto como importante contribuidor do processo de sensibilização central associada com o estado de dor persistente. (Wu, Fang et al. 2002; Ji, Kohno et al. 2003) (Bement and Sluka 2007) (Miyabe and Miletic 2005).

## 1.6 A TERAPÊUTICA FARMACOLÓGICA DA DOR

A terapêutica farmacológica da dor é bem estabelecida para o subtipo inflamatório, encontrando-se disponíveis diversas categorias de inibidores, seletivos ou não das enzimas ciclooxigenases, além de esteróides como dexametasona e antagonistas da bradicinina (em fase de testes). Devido ao caráter protetor da dor nóxica, seu bloqueio prolongado faz-se inadequado, porém em situações necessárias, como intervenções cirúrgicas, existem diversas classes de bloqueadores de canais iônicos disponíveis (Goodman, Gilman et al. 2006; Saravanakumar 2010).

A terapêutica da dor neuropática, no entanto, apresenta-se mais complexa. Os antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais são ineficazes e o bloqueio com anestésicos locais apesar de efetivo em aliviar muitos tipos de dor neuropática têm o

inconveniente de prejudicar qualquer função relativa à área bloqueada. Durante algum tempo e atualmente em situações específicas, abordagens radicais são tomadas, como a rizotomia e a simpatectomia. Hoje em dia tenta-se alcançar o mesmo efeito, de forma menos drástica, com o uso de toxina botulínica. Outra abordagem recentemente utilizada é a estimulação elétrica espinal através de eletrodos cirurgicamente implantados. Com o uso do ópio remontando a séculos, a morfina, seu principal componente foi amplamente utilizado e até hoje encontra aplicações. Apesar de extremamente eficientes, os opióides não são os fármacos de primeira escolha na terapia da dor neuropática por três motivos: pouco eficazes contra a dor neuropática de determinadas etiologias, o desenvolvimento de taquifilaxia e o desenvolvimento de dependência com o uso prolongado.

Atualmente, na primeira linha da terapia farmacológica contra a dor neuropática encontram-se inibidores de recaptção de monoaminas e anticonvulsivantes. Entre os primeiros, drogas de diversas classes estão disponíveis, como os antidepressivos tricíclicos (imipramina), os inibidores de recaptção de serotonina/noradrenalina (venfalexina), os inibidores de recaptção seletivo de serotonina (fluoxetina) e alguns antidepressivos atípicos (bupropiona). Entre os anticonvulsivantes, os mais utilizados são os bloqueadores do canal de cálcio  $\alpha_2$ - $\delta$ , como gabapentina e pregabalina (Sindrup, Otto et al. 2005; Goodman, Gilman et al. 2006; Dworkin, O'Connor et al. 2007; Saravanakumar 2010).

## 1.7 MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS

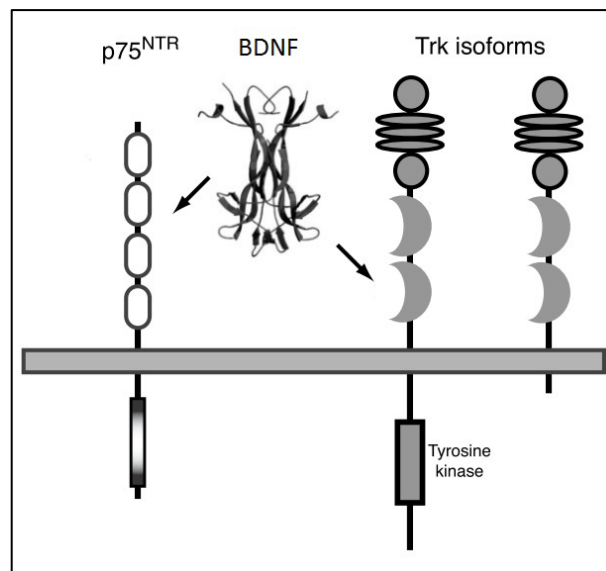
As drogas popularmente chamadas de antidepressivas atuam principalmente por inibir a recaptação pré-sináptica de monoaminas, guardadas as seletividades de cada classe. Obviamente, ao inibir a recaptação, a concentração de monoaminas na fenda sináptica permanece elevada permitindo-as atuar em seus receptores cognatos (Goodman, Gilman et al. 2006). Desta maneira, a eficácia terapêutica seria resultado da atividade dos receptores serotoninérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos presentes nas diversas estruturas do sistema nociceptivo. Similarmente ao observado na clínica psiquiátrica, o tratamento da dor neuropática com inibidores de recaptação apresenta latência média de três semanas. Este fenômeno mostra uma implicação mais relevante das alterações tardias desencadeadas pelo agonismo dos receptores para serotonina, noradrenalina e dopamina, do que os eventos imediatos e bem conhecidos, que as caracterizam como neurotransmissores.

Estas alterações tardias compõem os eventos anteriormente descritos como plasticidade neural, que incluem principalmente alterações no perfil de expressão gênica e protéica, característica compartilhada e bem conhecida de fatores neurotróficos, dentre os quais BDNF (Dickinson, Lee et al. 2003; Mochizucki 2004; Mico, Ardid et al. 2006; Benbouzid, Choucair-Jaafar et al. 2008). De fato, diversos trabalhos mostraram que os antidepressivos, de diversas classes, influenciam a sinalização desencadeada por BDNF ao interferir na fosforilação e ativação de diversas proteínas da cascata do receptor TrkB (Saarelainen, Hendolin et al. 2003; Rantamaki, Hendolin et al. 2007).



## 1.8 VIAS DE SINALIZAÇÃO DE BDNF

O fator neurotrófico BDNF pode desencadear sinalização celular por meio de dois receptores distintos: p75 e TrkB. O primeiro é um receptor “promíscuo” às neurotrofinas NGF, BDNF e NT3/4, o segundo é o receptor preferencial de BDNF e apresenta ao menos duas isoformas (completa e truncada) (Lewin and Barde 1996; Kaplan and Miller 2000; Blum and Konnerth 2005; Reichardt 2006). Ambas isoformas têm idêntico domínio extracelular e transmembrana, mas diferem quanto aos domínios justamembranosos e intracelulares (**Fig. 1**). A isoforma completa, como o próprio nome diz, é mais extensa contendo diversos resíduos de aminoácido tirosina (Tyr ou Y), sendo ao menos quatro deles fosforiláveis, o resíduo 515, 706, 707 e 816. A isoforma truncada possui uma pequena porção intracelular desprovida de sítios acopladores conhecido.



**Figura 1:** Ilustração esquemática da molécula de BDNF e seus receptores. Adaptado de (Huang and Reichardt 2003).

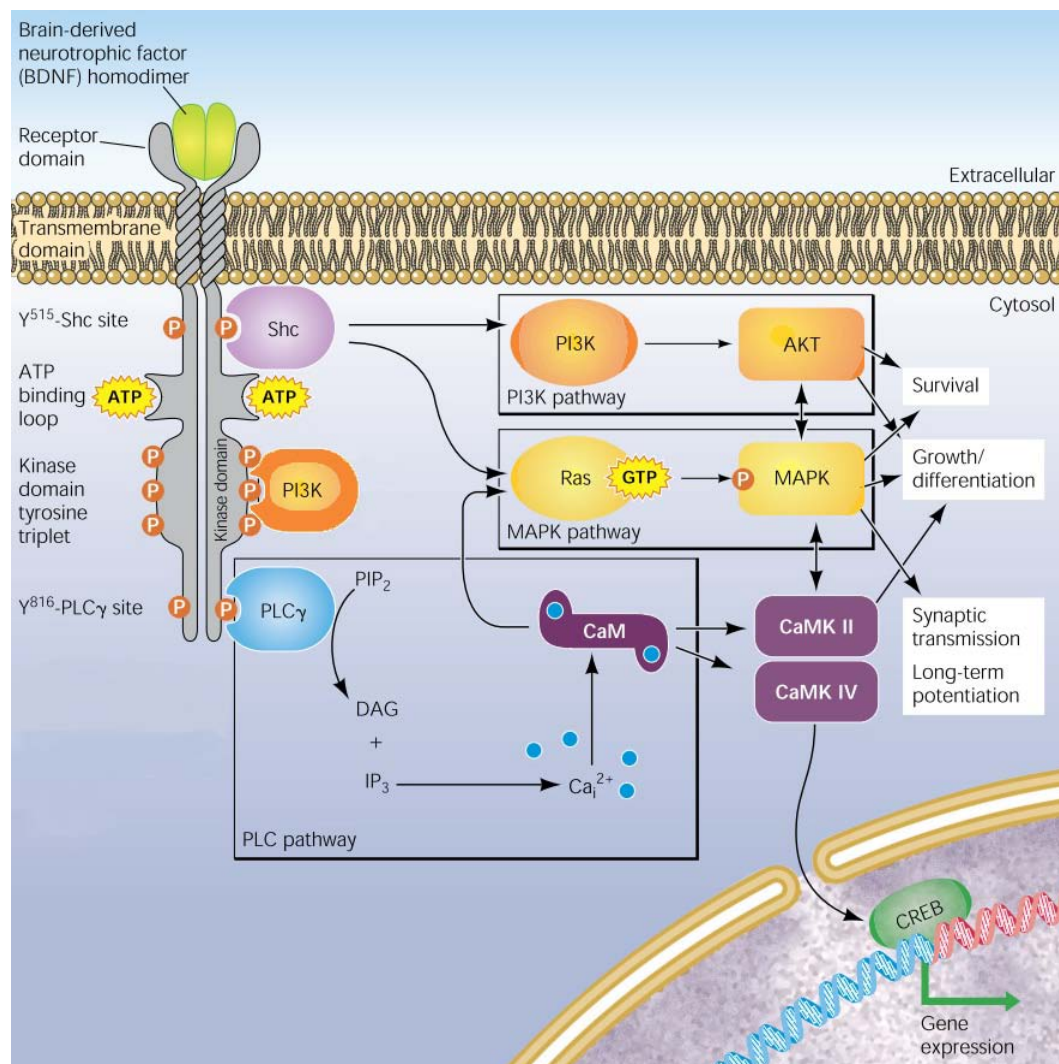
A presença de BDNF catalisa a dimerização de dois receptores TrkB. A interação entre dois receptores completos desencadeia a fosforilação cruzada das tirosinas 706 e 707, o que subsequente desencadeia a fosforilação dos resíduos 515 e 816. Com isso estes sítios tornam-se suscetíveis à interação com proteínas acopladoras e ativação das mesmas (**Fig. 2**) (Barbacid 1995; Lewin and Barde 1996; Huang and Reichardt 2003; Blum and Konnerth 2005; Reichardt 2006). Até recentemente acreditava-se que a dimerização com presença do receptor truncado fosse afuncional e que sua presença tivesse um papel limitador da atividade de BDNF. No entanto, alguns grupos vêm demonstrando que o receptor truncado também é capaz de desencadear sinalização celular e desempenhar papéis biológicos independentes de seu “irmão” completo (Eide, Vining et al. 1996; Baxter, Radeke et al. 1997; Gestwa, Wiechers et al. 1999; Cheng, Coksaygan et al. 2007).

Esta neurotrofina, conhecidamente responsável por vários eventos essenciais ao aumento da eficiência sináptica (Soule, Messaoudi et al. 2006), ao atuar no receptor TrkB (Ernfors, Rosario et al. 1993; Lee, Kim et al. 1999; Narita, Yajima et al. 2000; Yajima, Narita et al. 2002), leva à ativação de diversas vias de sinalização celular, entre elas, fosfolipase C  $\gamma$ -1 (PLC $\gamma$ 1), fosfatidilinositol 3-fosfato quinase (PI3K) e SHC (**Fig. 2**) (Barbacid 1995; Chao 2003; Huang and Reichardt 2003; Rose, Blum et al. 2004; Reichardt 2006).

A ativação da proteína PLC $\gamma$ 1 se dá por meio da interação com o resíduo Tyr<sup>816</sup> fosforilado e sendo ela própria fosforilada no resíduo Tyr<sup>783</sup> (Kim, Kim et al. 1991). A proteína ativada catalisa a lise de fosfatidilinosítídeos de membrana, gerando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (Singer, Brown et al. 1997; Wang, Gluck

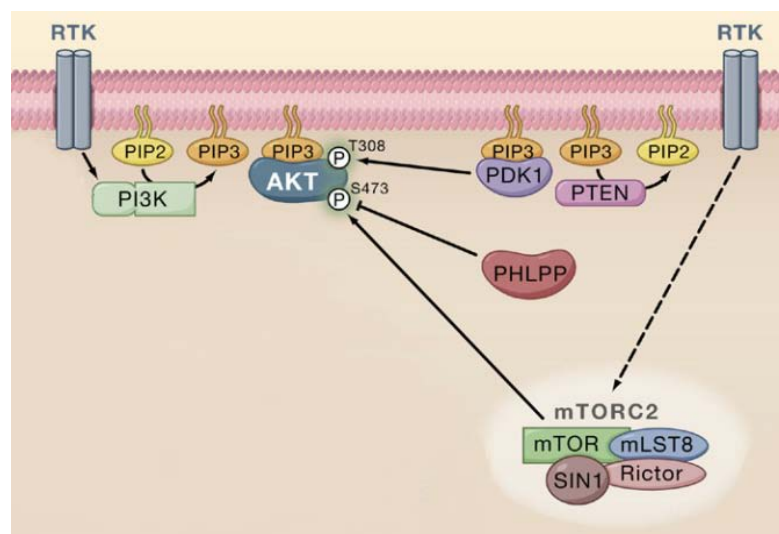
et al. 1998). Os segundos mensageiros DAG e IP<sub>3</sub> desencadeiam aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, que culminam com a despolarização celular e ativação de outras proteínas, como PKC, calmodulina e CamK (**Fig. 2**).

A ativação de PI3K é redundante, podendo ocorrer diretamente, pela interação com o resíduo Tyr<sup>751</sup>, ou indiretamente, via SHC que é ativada pela interação com o resíduo Tyr<sup>516</sup> (Gu, Maeda et al. 2000; Pezet, Malcangio et al. 2002). De qualquer maneira, um dos principais efetores da via da PI3K é a proteína Akt (**Fig. 2**) (Cantrell 2001; Cantley 2002; Manning and Cantley 2007).



**Figura 2:** Ilustração esquemática das vias de sinalização do receptor TrkB. Adaptado de (Blum and Konnerth 2005).

A proteína Akt é uma integrante da família AGC de serina/treonina quinases, a qual pertence também PKA e PKC, sendo por isso chamada também de PKB. A ativação de Akt se dá através de fosforilação, catalisada por outras proteínas (Toker and Newton 2000; Scheid and Woodgett 2003), sendo a fosforilação do resíduo Ser<sup>273</sup> requerida para máxima ativação da proteína. Uma etapa essencial para isto é a sua concentração junto à membrana e fosforilação do resíduo Thr<sup>380</sup>. A mobilização de Akt para a membrana ocorre quando a PI3K converte fosfatidilinositol 4,5 fosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidilinositol 3,4,5 fosfato (PIP<sub>3</sub>), ao qual a proteína Akt apresenta grande afinidade (Coffer, Jin et al. 1998). Assim como Akt, a proteína PDK1 (quinase dependente de fosfatidilinositol 3 fosfato) apresenta alta afinidade para PIP<sub>3</sub> e também é recrutada para face interna da membrana, onde sofre alteração conformacional e fosforila o resíduo Thr<sup>380</sup> de Akt (Wick, Dong et al. 2000; Frodin, Antal et al. 2002; Scheid, Marignani et al. 2002). Desta maneira, Akt é suscetível à fosforilação do resíduo Ser<sup>273</sup> catalisado pelo complexo protéico Rictor/mTOR (Fig. 3) (Sarbasov, Guertin et al. 2005; Huang and Manning 2009).



**Figura 3:** Ilustração esquemática das vias de ativação de Akt. Adaptado de (Manning and Cantley 2007).

Direta ou indiretamente estas vias culminam com a ativação de fatores de transcrição relacionados aos fenômenos neuroplásticos que têm sido implicados na gênese e manutenção da dor neuropática, sendo CREB talvez o mais relevante (Ma and Quirion 2001; Kawasaki, Kohno et al. 2004; Miletic, Hanson et al. 2004; Crown, Ye et al. 2005; Fang, Wu et al. 2005; Miyabe and Miletic 2005; Latremoliere and Woolf 2009).

A proposta deste trabalho é avaliar se a terapia farmacológica com imipramina, um antidepressivo tricíclico, tem sua atividade analgésica associada à interação com as vias de sinalização celular desencadeadas por BDNF e suas alterações a longo prazo.

## 2. OBJETIVOS

1. Investigar o efeito do uso crônico de um antidepressivo tricíclico (imipramina) no tratamento da alodinia provocadas pela lesão de nervo periférico.
2. Observar o efeito do tratamento agudo e crônico de imipramina sobre o estado de fosforilação da proteína CREB no corno dorsal da medula espinhal após o desenvolvimento de neuropatia.
3. Observar o efeito do tratamento agudo e crônico de imipramina sobre o estado de fosforilação de proteínas de diferentes vias de ativação do fator de transcrição CREB.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

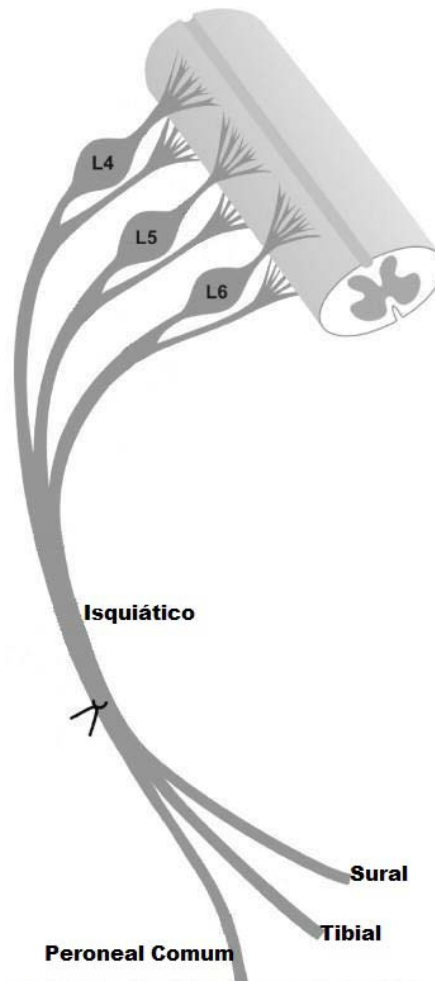
Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos da linhagem Balb/c/JUnib pesando entre 20 e 25 g, obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério do departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro de 12:12 horas e livre acesso a ração e água.

Os protocolos experimentais descritos neste processo seguem as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (processo # 213/2005).

#### 3.2 LESÃO PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO

Os animais foram anestesiados com uma combinação de ketamina, xilazina e acepromazina (100 mg/kg, 20 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente) (Arras, Autenried et al. 2001). O procedimento cirúrgico consistiu na ligadura parcial (de 1/2 a 2/3) do nervo isquiático, entre suas trifurcações, com fio de seda 8-0 (Seltzer, Dubner et al. 1990; Malmberg and Basbaum 1998) (**Fig. 4**). A lesão fictícia consistiu na divulsão da musculatura glútea e exposição do nervo apenas. A sutura da pele foi realizada com grampos de metal. Utilizou-se 24 animais, divididos nos seguintes grupos (n=6):

Controle (lesão fictícia) Salina, Lesão Salina, Controle Imipramina e Lesão Imipramina.



**Figura 4:** Ilustração do modelo de lesão parcial do nervo isquiático. Adaptado de (Klusakova and Dubovy 2009).

### 3.3 TRATAMENTO E MONITORAMENTO DAS ALTERAÇÕES DE SENSIBILIDADE APÓS LESÃO DE NERVO PERIFÉRICO

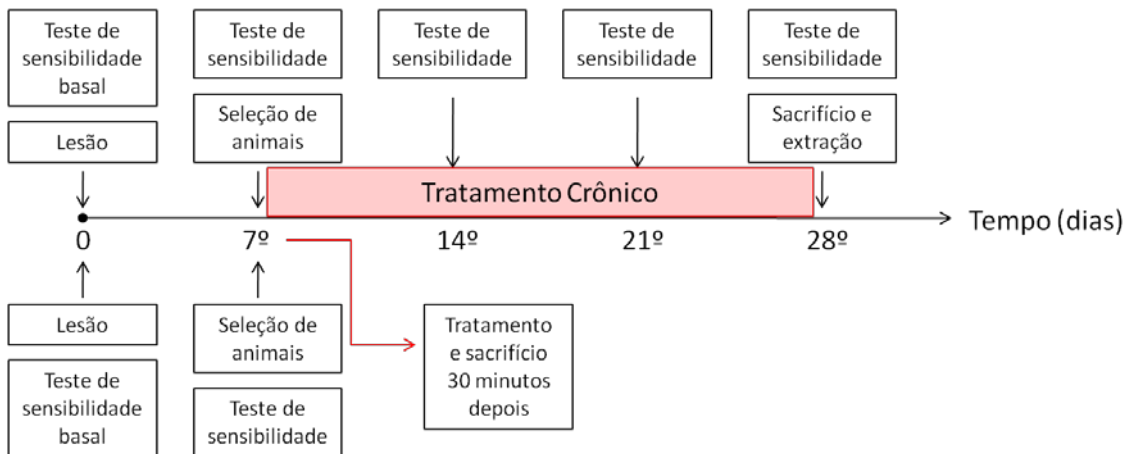
Os níveis de fosforilação de PLC $\gamma$ 1 e Akt foram avaliados em dois protocolos experimentais: o tratamento agudo com imipramina e o tratamento crônico com



imipramina. Para o tratamento agudo, animais selecionados através do teste de sensibilidade mecânica, foram divididos em 4 grupos: Controle Imipramina e Lesão Imipramina, receberam imipramina (30 mg/kg) diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, intraperitoneal (i.p.), e Controle Salina e Lesão Salina que receberam apenas o veículo (µL/g) i.p. Todos foram eutanasiados 30 minutos após o tratamento para extração da medula. Para o tratamento crônico, animais selecionados compuseram os mesmos grupos anteriormente citados, que eram diariamente tratados durante 21 dias, sendo eutanasiados, para extração da medula, no 22º dia (Fig. 5).

A seleção e o monitoramento da sensibilidade mecânica foram realizados utilizando-se monofilamentos de Von Frey. Este teste consiste em um conjunto de nove filamentos, de calibre crescente, que são aplicados individualmente na superfície plantar de cada animal. O limiar de sensibilidade é determinado pela seqüência de seis respostas positivas e/ou negativas, realizadas pelos animais após a estimulação com o monofilamento, sendo o teste iniciado com o filamento de calibre intermediário, passando para o filamento mais calibroso quando não há resposta ou ao filamento menos calibroso se o animal exibe resposta, e assim sucessivamente. Além da seqüência de reações, o valor do último filamento aplicado também é levado em consideração no cálculo do limiar, bem como a diferença média (em unidades logarítmicas) entre as forças do conjunto de nove filamentos utilizados (Chaplan, Bach et al. 1994). Todos os animais tiveram seu limiar basal determinado antes da cirurgia. Após 7 dias, os animais foram testados e selecionados, sendo que animais dos grupos Controle com mais de 40% de redução no limiar e animais dos

grupos Lesão com menos de 60% de redução no limiar não seguiram para o tratamento. Os animais, cronicamente tratados, foram testados a cada 7 dias, até o final do tratamento.



**Figura 5:** Esquematização do decurso temporal do tratamento e testes comportamentais.

### 3.4 EXTRAÇÃO DO CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e rapidamente dissecados, a coluna vertebral extraída e colocada em PBS a 4°C. Sob lupa estereoscópica, a medula espinhal foi retirada do canal vertebral e seccionada em L3 e S1. O bloco resultante (L4-L6) foi dividido em porção direita e esquerda, e então, dividida em dorsal e ventral. A porção dorsal esquerda foi colocada em superfície mantida resfriada com gelo-seco, fazendo com que a amostra congelasse imediatamente, e acondicionada em microtubo que foi também mantido em gelo-seco até o procedimento de extração de proteínas totais.

### 3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Às amostras, recém retiradas e mantidas em gelo-seco, foi adicionado tampão de lise contendo 137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1% de NP-40, 0,105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e fosfatases (NaF, Na<sub>2</sub>VnO<sub>4</sub>). Foi então realizada a homogeneização com pistilos plásticos e um mixer. O homogenato seguiu para agitação em câmara fria por 10 minutos e foi então centrifugado a 40000  $\times g_e$  por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para dois novos tubos: um tubo com pequeno volume (3  $\mu$ L) foi congelado a -20°C e foi utilizado para quantificação de proteínas totais e outro tubo com o restante da amostra foi mantido a -80°C até a realização da eletroforese.

A quantificação de proteínas totais foi realizada com kit DC-ProteinAssay (BioRad) baseado no método de Lowry. A reação foi montada em microplacas de 96 poços e a leitura realizada em espectrofotômetro em 750 nm.

### 3.6 WESTERN BLOTTING

Os volumes de amostra, carregados em cada poço, foram ajustados (a partir da quantificação) para que a mesma quantidade de proteína (30 $\mu$ g) fosse alcançada. Foi então adicionado tampão de amostra (contendo 3- $\beta$ mercaptoetanol como agente desnaturante), agitado e fervido a 95°C por 5 minutos. O gel utilizado na eletroforese foi de poliacrilamida (40% acrilamida:1% bys-acrilamida) a 8% com camada superior de gel de concentração a 4%. A eletroforese foi realizada com tampão Tris-Glicina, em câmara fria por aproximadamente 3,5 horas, sendo 40 minutos a 80 V e 400 mA, e

3 horas a 110 V e 400 mA. O gel, após ser retirado do aparato, foi mantido em tampão de Towbin 10% Metanol por aproximadamente 30 minutos, juntamente com a membrana de PVDF previamente ativada em metanol, afim de que equilibrassem ao tampão e evitar distorções na transferência. A transferência foi realizada também em câmara fria, por 45 minutos a 100 V e 400 mA.

Após a transferência as membranas foram lavadas em tampão TBS por 5 minutos e incubadas em solução de bloqueio (TBS 0,1% Tween 20 5% albumina bovina) por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas em TBS 0,1% Tween 20 (TBS/T) por 5 minutos e incubadas com anticorpo primário, para forma fosforilada da proteína, diluído 1:5000 em solução de bloqueio, mantido na câmara fria, por aproximadamente 24 horas, sob agitação. Após a incubação no anticorpo primário, as membranas foram lavadas em TBS/T por 5 minutos, três vezes, e então incubadas com o anticorpo secundário diluído 1:10000 em solução de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram novamente lavadas por três vezes de 5 minutos em TBS/T e a revelação realizada com substrato quimioluminescente (GE Lifesciences), de acordo com instruções do fabricante. A intensidade das bandas foi quantificada em fotodocumentador acoplado à câmera CCD (Kodak GelLogic 2200) e analisada em software do equipamento.

As membranas foram posteriormente lavadas em TBS/T por 5 minutos e com tampão de remoção por 15 minutos a aproximadamente 50°C para retirada do complexo de anticorpos. Depois deste processo, as membranas foram lavadas em água corrente por aproximadamente 2 horas, reidratadas em metanol por 1 minuto,

lavadas em TBS/T por 5 minutos e reiniciado o processo de bloqueio e incubação, desta vez com anticorpo primário para a proteína total. Após a quantificação da proteína total, a intensidade da forma fosforilada foi normalizada com relação a ela.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). A análise dos resultados comportamentais foi realizada por análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA), seguida pelo Teste de Bonferroni. A análise dos resultados de *western blot* foi realizada através do Teste *t* de *Student*. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

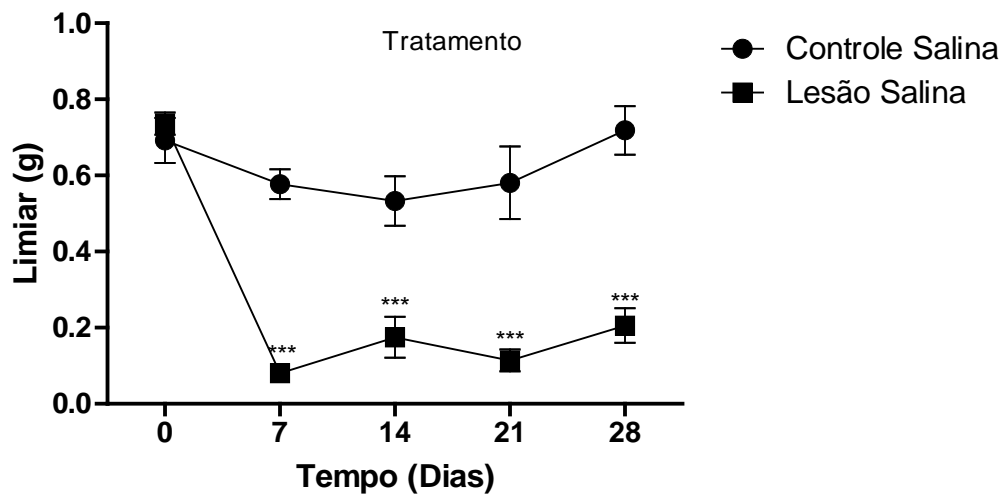
## 4. RESULTADOS

### 4.1 MONITORAMENTO DO LIMIAR DE SENSIBILIDADE MECÂNICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÃO PARCIAL DO NERVO E À LESÃO FICTÍCIA, APÓS TRATAMENTO AGUDO OU CRÔNICO COM IMIPRAMINA.

A lesão parcial do nervo isquiático desencadeou diminuição no limiar de sensibilidade que perdurou até o 28º dia após a lesão ( $p < 0,001$ ). Os animais do grupo Controle não tiveram o limiar alterado pela lesão fictícia ou pelo tratamento com salina (**Fig. 6**).

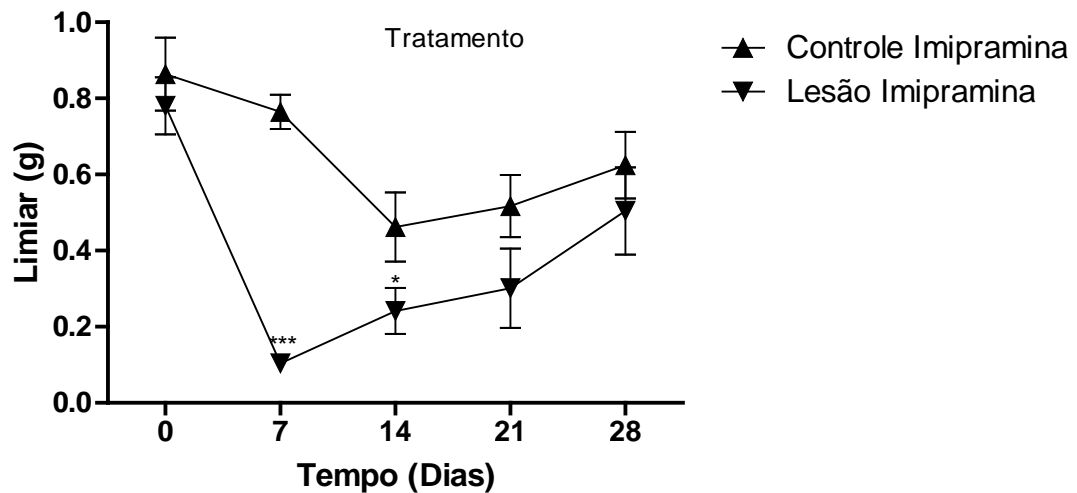
O tratamento com imipramina não alterou o limiar de sensibilidade, de maneira significativa, no grupo controle. Entretanto, nos animais lesados o limiar de sensibilidade mecânica alcançou níveis próximos ao controle, a partir do 21º dia, atingindo ápice no 28º dia. (**Fig. 7**).

A **Fig. 8**, apenas demonstra a diferença entre os tratamentos dos grupos lesados, mostrando que com 21 dias de tratamento, a melhora na sensibilidade mecânica é significativamente diferente ( $p < 0,01$ ).



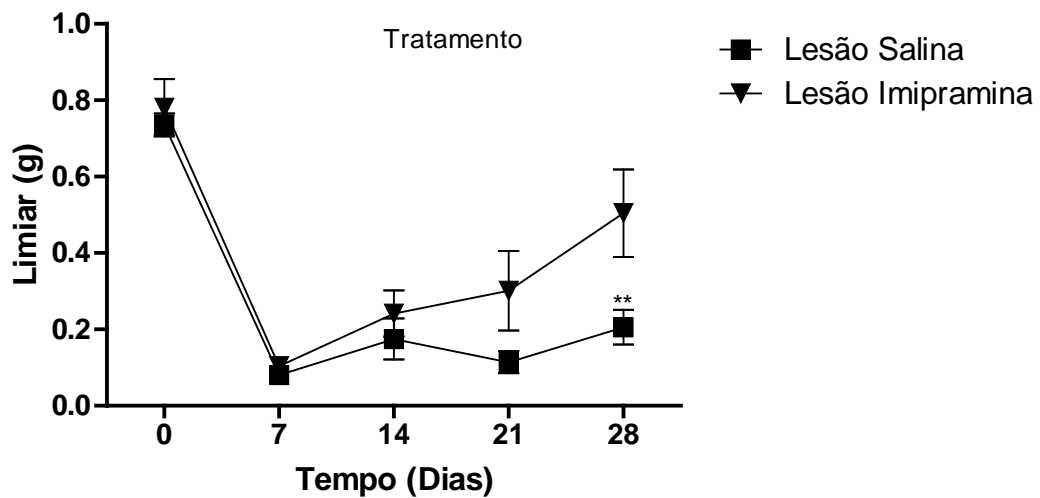
**Figura 6:** Sensibilidade mecânica durante o tratamento crônico com salina.

A lesão induziu redução no limiar de sensibilidade mecânica, que se manteve durante todo o tempo de monitoramento. A administração i.p. de salina não alterou o limiar de sensibilidade nos grupos (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n=7$ ).



**Figura 7:** Sensibilidade mecânica durante o tratamento crônico com imipramina.

A lesão induziu redução no limiar de sensibilidade mecânica, que se manteve significativa durante 14 dias. A administração i.p. de imipramina promoveu o retorno do limiar de sensibilidade no grupo lesão, a partir do 21º dia (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, \* $p < 0.05$  e \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n=7$ ).



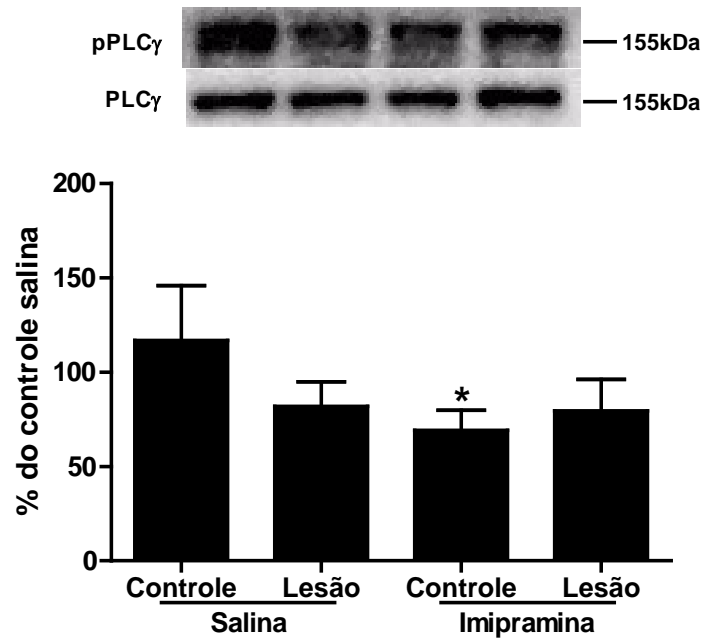
**Figura 8:** Sensibilidade mecânica nos grupos Lesão durante o tratamento crônico com salina e imipramina.

O tratamento com imipramina induziu elevação no limiar de sensibilidade mecânica em animais lesados, atingindo diferença significativa com 21 dias de tratamento (ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 7$ ).

#### 4.2 FOSFORILAÇÃO DE PLC $\gamma$ 1 NA COLUNA DORSAL DA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÃO PARCIAL DO NERVO PERIFÉRICO APÓS TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM IMIPRAMINA.

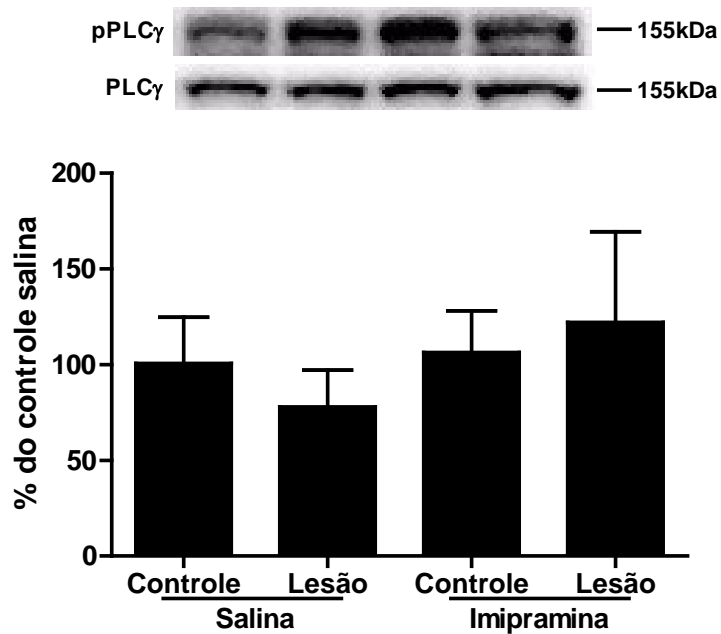
Aos 7 dias após a lesão parcial do nervo não houve diferença estatística na fosforilação de PLC $\gamma$ 1 ( **Fig. 9**). No entanto, o tratamento agudo com imipramina resultou em redução significativa da fosforilação da proteína, apenas no grupo controle (de  $116,9 \pm 29,08\%$  para  $69,16 \pm 10,72\%$ ,  $p < 0,05$ ) ( **Fig. 9**). No 28º dia após a lesão, a fosforilação de PLC permaneceu inalterada. Do mesmo modo, o tratamento crônico com imipramina não alterou significativamente a fosforilação da proteína tanto no grupo lesão, quanto no grupo controle ( **Fig. 10**).





**Figura 9:** Fosforilação de PLCγ1 após tratamento agudo.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. A lesão não provocou alteração da fosforilação de PLCγ1. O grupo Controle Imipramina apresentou diminuição na fosforilação de PLCγ1 quando comparado ao grupo Controle Salina (\* $p < 0,05$ ; teste *t* de Student;  $n=5$ ).

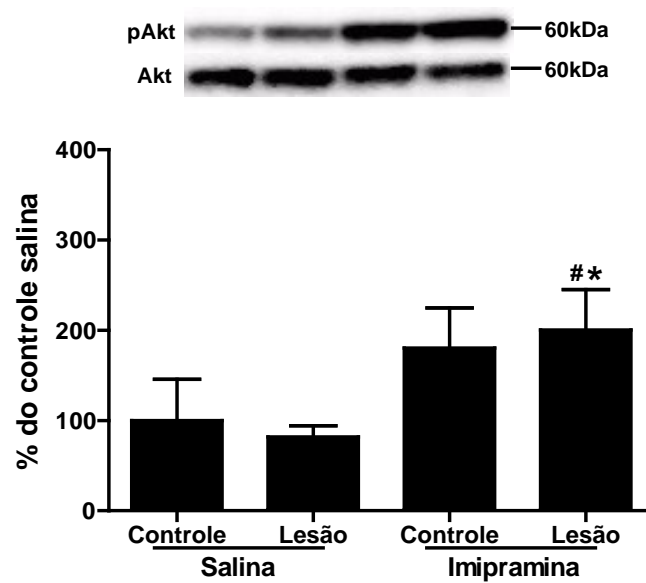


**Figura 10:** Fosforilação de PLCγ1 após tratamento crônico.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. Tanto a lesão, quanto a administração crônica de imipramina não induziram alterações significativas na fosforilação de PLCγ1 (teste *t* de Student;  $n=5$ ).

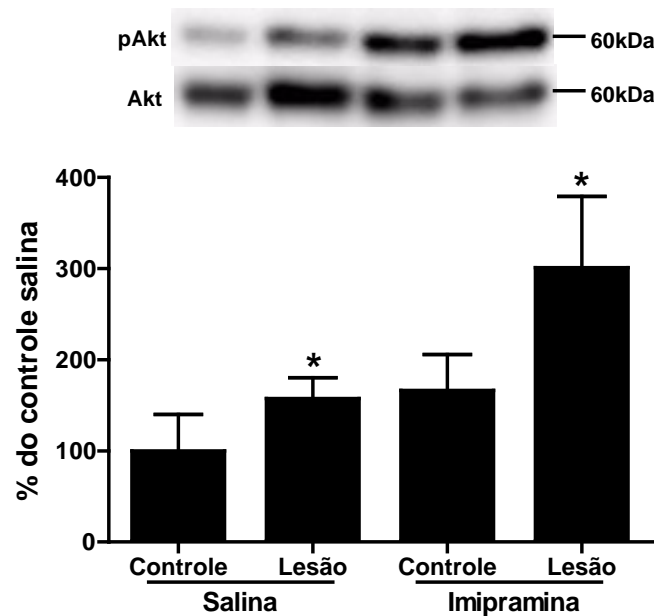
#### 4.3 FOSFORILAÇÃO DE AKT NA COLUNA DORSAL DA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÃO PARCIAL DO NERVO PERIFÉRICO APÓS TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM IMIPRAMINA.

Sete dias após a lesão parcial do nervo a fosforilação da proteína Akt encontrou-se inalterada (**Fig. 11**). O tratamento agudo com imipramina elevou a fosforilação de Akt ( $200,4 \pm 44,8\%$ ) a níveis significativos ( $p < 0,05$ ) tanto em relação ao grupo controle ( $100 \pm 45,64\%$ ), quanto ao grupo lesão ( $81,68 \pm 12,43\%$ ), tratados com salina. No entanto o grupo controle tratado com imipramina não apresentou alteração significativa (**Fig. 11**). Ao 28º dia após a lesão do nervo, a proteína Akt apresentou fosforilação significativamente elevada ( $157,4 \pm 23,01\%$ ) em relação ao grupo controle ( $100 \pm 39,81\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 12**). Com o mesmo tempo após a lesão e sob tratamento crônico com imipramina, o grupo lesão apresentou nível de fosforilação significativamente maior ( $301,1 \pm 78,13\%$ ) que o grupo controle salina ( $100 \pm 39,81\%$ ) ( $p < 0,05$ ). No entanto, não houve diferença significativa entre tratamentos nos grupos lesão (**Fig. 12**).



**Figure 11:** Fosforilação de Akt após tratamento agudo.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. Após 7 dias, a lesão não promoveu alteração na fosforilação de Akt. O grupo Lesão Imipramina apresentou aumento na fosforilação de Akt comparado ao grupo Controle Salina (\* $p < 0,05$ ; teste *t* de Student;  $n=7$ ) e ao grupo Lesão Salina (# $p < 0,05$ ; teste *t* de Student;  $n=7$ ).



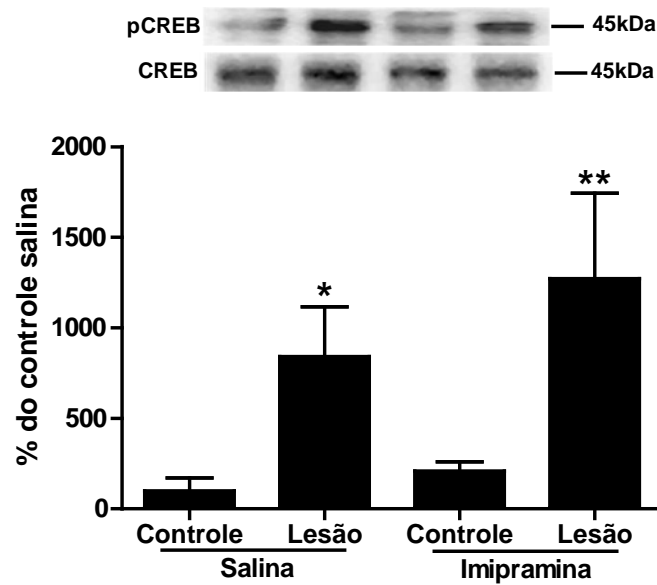
**Figura 12:** Fosforilação de Akt após tratamento crônico.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. Após 28 dias, a lesão levou ao aumento da fosforilação de Akt quando comparado ao grupo Controle Salina ( $p < 0,05$ ; teste *t* de Student;  $n=6$ ). O tratamento crônico com imipramina elevou o nível de fosforilação de Akt, em animais lesados, quando comparado ao grupo Controle Salina ( $p < 0,05$ ; teste *t* de Student;  $n=6$ ).

#### 4.4 FOSFORILAÇÃO DE CREB NA COLUNA DORSAL DA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÃO PARCIAL DO NERVO PERIFÉRICO APÓS TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM IMIPRAMINA.

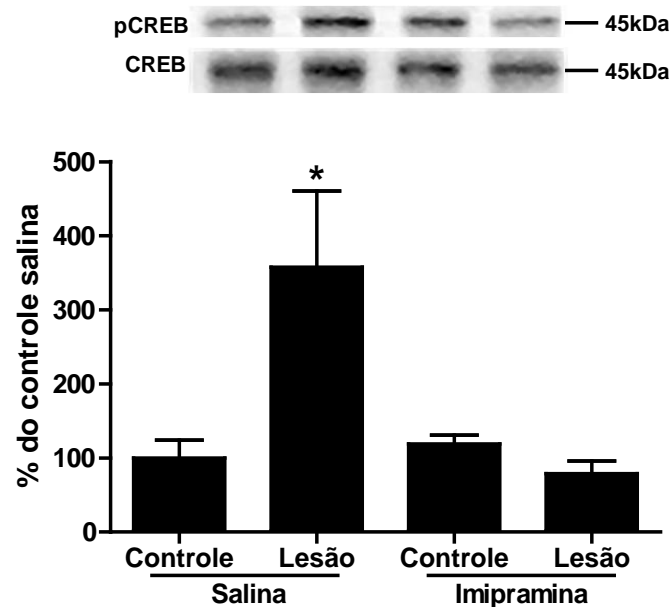
No sétimo dia após a lesão o nível de fosforilação de CREB encontrava-se fortemente aumentado ( $841,2 \pm 274,0\%$ ) com relação ao controle ( $100 \pm 0,3651\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 13**). O estado de fosforilação de CREB permaneceu sustentado, e significativamente maior ( $357,6 \pm 103,0\%$ ) que o grupo controle ( $100 \pm 0,3086\%$ ), mesmo 28 dias após a lesão ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 14**).

O tratamento agudo com imipramina não alterou o estado de fosforilação de CREB que permaneceu significativamente elevado ( $1272 \pm 470,5\%$ ) com relação ao grupo controle salina ( $100,0 \pm 0,3651\%$ ) ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 13**). Porém, o nível de fosforilação retorna ao nível basal após 21 dias de tratamento com imipramina, não apresentando diferença significativa com relação ao controle (**Fig. 14**).



**Figura 13:** Fosforilação de CREB após tratamento agudo.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. Ao 7º dia, a lesão elevou os níveis de fosforilação de CREB quando comparado ao grupo Controle Salina (\* $p < 0,05$ ; teste *t* de *Student*;  $n=5$ ). O tratamento agudo com imipramina não alterou a fosforilação induzida pela lesão, que continuou significativa comparada ao grupo Controle Salina (\*\* $p < 0,01$ ; teste *t* de *Student*;  $n=5$ ).



**Figura 14:** Fosforilação de CREB após tratamento crônico.

O painel superior é a imagem de um *blot* representativo e o painel inferior é o gráfico com as médias e e.p.m. dos grupos. Ao 28º dia, a lesão provocou aumento nos níveis de fosforilação de CREB em relação ao grupo Controle Salina (\* $p < 0,05$ ; teste *t* de *Student*;  $n=5$ ). O tratamento crônico com imipramina restaurou o nível basal de fosforilação de CREB, demonstrada pela ausência de diferença significativa quando comparado ao grupo Controle Salina.

## 5. DISCUSSÃO

Os testes comportamentais de hipersensibilidade ao estímulo mecânico demonstraram que o modelo experimental utilizado foi capaz de induzir alterações de sensibilidade decorrentes da lesão de nervo periférico. Neste modelo, observamos que o tratamento crônico com imipramina leva a uma progressiva reversão da alteração de sensibilidade desenvolvida pelos animais lesados, atingindo níveis próximos aos basais na terceira semana de tratamento. Ao final de 21 dias de tratamento, foi observada diferença significativa entre as respostas comportamentais dos animais lesados tratados com imipramina e veículo, indicando que o uso prolongado da droga reverteu as alterações de sensibilidade decorrentes desta lesão. Observamos ainda que 7 dias após a lesão do nervo há um aumento de CREB, corroborando dados da literatura (Miyabe and Miletic 2005). Entretanto, observamos aqui, que este aumento perdurou por até 28 dias após a lesão, sugerindo participação efetiva desse fator de transcrição nos mecanismos tardios de manutenção da dor. Observamos, também, que o tratamento crônico com imipramina reduziu significativamente a fosforilação de CREB, porém de maneira não correlata à fosforilação das proteínas PLG $\gamma$ 1 e Akt, elementos antecedentes na cascata de sinalização, que foram inalteradas e exacerbadas, respectivamente, pelo tratamento crônico.

A imipramina é um antidepressivo, da família dos tricíclicos, sem especificidade para recaptação de monoaminas (Goodman, Gilman et al. 2006). Observações clínicas mostram que o efeito analgésico encontra-se desvinculado do efeito antidepressivo (Mico, Ardid et al. 2006). Entretanto, o início do efeito

antinociceptivo deste fármaco, tem latência aproximada de três semanas (Benbouzid, Choucair-Jaafar et al. 2008). A latência observada na clínica e em nossos resultados comportamentais, sugere que o efeito antinociceptivo esteja associado à atuação da imipramina em mecanismos celulares e moleculares de longo prazo. De fato, em se tratando de pesquisas no campo da depressão e outras patologias psiquiátricas, o aspecto crônico do tratamento é uma importante característica das drogas antidepressivas, tendo sido demonstrado em diversos trabalhos que o efeito destas drogas está associado à plasticidade neural e alterações moleculares de longo prazo, levando a alterações no perfil de expressão de genes e proteínas, no recrutamento de neurotrofinas, na reorganização da arborização dendrítica e na neurogênese (Duman 2002; Nestler, Barrot et al. 2002; Coyle and Duman 2003; Berton and Nestler 2006; Tsankova, Berton et al. 2006).

Apesar dos antidepressivos tricíclicos serem usados a muitos anos no tratamento da dor neuropática, os seus mecanismos antinociceptivos permanecem pouco conhecidos. Diversos trabalhos têm demonstrado que o tratamento com imipramina influencia a ativação do receptor TrkB, evento demonstrado como essencial para que o efeito antidepressivo seja alcançado (Saarelainen, Hendolin et al. 2003). Por outro lado, a ativação do receptor TrkB é um evento necessário para a manutenção da dor crônica de origem neuropática (Yajima, Narita et al. 2002; Wang, Ratnam et al. 2009). Nossos resultados mostram que a fosforilação de PKC no corno dorsal da medula espinhal não se encontra alterada nem no 7º dia após a lesão do nervo periférico, nem 28 dias após a lesão. Este resultado sugere que, apesar de demonstrada a ativação do receptor TrkB após lesão, PKC não parece ser a via

efetora das alterações celulares desencadeadas por ele. Nossos dados mostram também que o tratamento crônico com imipramina não altera o estado de fosforilação de PLC $\gamma$ 1 no corno dorsal da medula espinhal, tanto de animais controle, quanto de animais lesados. Já o tratamento agudo, induziu uma diminuição significativa da fosforilação de PLC $\gamma$ 1 apenas no grupo controle. Estes resultados se opõem ao relatado na literatura mostrando que a ativação de TrkB induzida por imipramina leva a ativação da via de PLC no hipocampo e no córtex cingulado anterior (Rantamaki, Hendolin et al. 2007). Visto que a fosforilação de PLC e a hipersensibilidade mecânica não se correlacionam, podemos sugerir que PLC não estaria implicada com os fenômenos neuroplásticos da sensibilização central, da mesma maneira em que ela se associa com o fenômeno da potenciação de longo prazo (LTP) em estruturas encefálicas como o hipocampo (Minichiello, Calella et al. 2002; Ernfors and Bramham 2003; Gartner, Polnau et al. 2006; Gruart, Sciarretta et al. 2007).

Outra proteína relacionada a vias de sinalização de TrkB é Akt. Nossos resultados mostram que 28 dias após a lesão, a fosforilação de Akt, no corno dorsal da medula está significativamente elevada. Este resultado sugere que a fosforilação de Akt está relacionado com a fase tardia da hipersensibilização mecânica, uma vez que nenhuma alteração foi observada 7 dias após a lesão, tempo em que os sinais comportamentais são indubitáveis. De fato, dados da literatura mostram que a ativação desta proteína ocorre após estimulação nóxia aguda (Zhuang, Xu et al. 2004; Sun, Yan et al. 2007), estando inclusive relacionada ao desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica induzida por algogênicos (Sun, Tu et al. 2006). Porém,



no único relato que, assim como nosso trabalho, utilizou-se de um modelo de lesão de nervo periférico, a ativação de Akt (inferido por imunohistoquímica) no corno dorsal da medula espinhal encontra-se aumentada somente do primeiro ao sétimo dia (Xu, Tu et al. 2007). Apesar de inicialmente parecer estar em oposição aos nossos resultados, uma análise mais detalhada do trabalho revela que os mesmos níveis não são significativos no 14º dia. No gânglio da raiz dorsal não há diferença na fosforilação de Akt no 7º dia. Diferenças entre os modelos de lesão podem explicar a ausência de fosforilação ao 7º dia, em nosso modelo. Análises com menos tempo após a lesão seriam necessárias para saber se encontraríamos o mesmo padrão de ativação na primeira semana. De qualquer modo, nossos resultados com lesão 28 dias reforçam o envolvimento de Akt com o processo de sensibilização central (Zhu and Oxford 2007; Pezet, Marchand et al. 2008).

Assim como para PLC $\gamma$ 1, a fosforilação de Akt não parece estar relacionada com o retorno do perfil de sensibilidade mecânica induzida pelo tratamento com imipramina, uma vez que, tanto o tratamento agudo, quanto o crônico, elevou os níveis de fosforilação de Akt. Interessantemente, duas evidências em nossos resultados sugerem que possa estar havendo sinergismo de vias na ativação de Akt: (1) o nível de fosforilação no grupo lesão imipramina é maior com tratamento crônico do que com o agudo e (2) a diferença entre a fosforilação nos grupos lesão imipramina e lesão salina deixa de existir no contexto do tratamento crônico. Esses dados indicam que o tratamento, tanto agudo quanto crônico, fornece uma via de ativação para Akt, possivelmente através da ativação dos receptores de monoaminas. A lesão, em longo prazo, forneceria a outra via, possivelmente através do receptor

TrkB. De fato, a noradrenalina parece ser a monoamina de maior relevância para o efeito analgésico dos antidepressivos (Mochizucki 2004; Bomholt, Mikkelsen et al. 2005) atuando nos receptores adrenérgicos do tipo beta (Mico, Gibert-Rahola et al. 1997), em especial o subtipo 2 (Yalcin, Choucair-Jaafar et al. 2009; Yalcin, Tessier et al. 2009). Neuroanatomicamente, já foi demonstrada a localização de RNA mensageiro de receptores beta adrenérgicos no gânglio da raiz dorsal e na superfície do corno dorsal da medula espinal (Nicholson, Dixon et al. 2005), bem como evidências da colocalização destes receptores com receptores TRPV1, conhecido marcador de neurônios nociceptivos (Patterson and Hanley 1987).

Do mesmo modo, diversos trabalhos vêm demonstrando que a sinalização cruzada é comum entre receptores dos tipos tirosina quinase (RTK, do inglês *Receptor Tyrosine Kinase*) e aqueles acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G Protein Coupled Receptor*) (Lowes, Ip et al. 2002; Delcourt, Bockaert et al. 2007). Esses trabalhos ressaltam, particularmente, a interação entre receptores Trk para neurotrofinas e os receptores de Adenosina e PACAP e ainda a transativação de Trk por GPCR na ausência de neurotrofinas (Lee and Chao 2001; Lee, Rajagopal et al. 2002; Chao 2003; Rajagopal, Chen et al. 2004). As evidências que nos permitem sugerir a ativação sinérgica de Akt são apoiadas por um dado da literatura que descreve a ativação de uma isoforma de PI3K, ativada por ambos os tipos receptores, RTKs e GPCRs, culminando com a exacerbada ativação de Akt (Katada, Kurosu et al. 1999).

Assim, apesar de estar envolvida com processos de aumento da eficiência sináptica em diversas estruturas, a ativação das diferentes vias relacionadas ao receptor TrkB parece ser fortemente influenciada pelas características celulares em

que se encontra, especialmente pelo repertório de vias e proteínas acopladoras que as tangenciam (Ernfors and Bramham 2003; Ji, Kohno et al. 2003; Ren and Dubner 2007), tornando necessários novos estudos, a fim de dissecar os elementos moleculares destas interações.

## 6. CONCLUSÃO

1. O tratamento crônico com imipramina reverte as alterações nos níveis de limiar de sensibilidade mecânica decorrentes da lesão, próximo às situações controles.

2. A lesão parcial do nervo não induz alteração na fosforilação de PL $\zeta$ 1 no corno dorsal da medula espinhal, o que só acontece com a administração aguda de imipramina em animais controle. A lesão parcial do nervo induz a fosforilação de Akt aos 7 e 28 dias e parece ser sinergicamente ativada pelo tratamento com imipramina.

3. A lesão parcial do nervo induz aumento sustentado na fosforilação de CREB no corno dorsal da medula espinhal até a quarta semana após a lesão, sendo apenas o tratamento crônico (21 dias) capaz de revertê-la aos níveis basais.

Juntos, nossos resultados indicam que a ativação de PL $\zeta$ 1 não parece estar envolvida com os eventos neuroplásticos associados à lesão do nervo, que a transativação de TrkB  $\beta$ 2 -adrenérgicos parece estar relacionada com a elevada fosforilação de Akt, porém ambos os eventos não se correlacionam com a diminuição na fosforilação de CREB decorrente do tratamento crônico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahamsen, B., J. Zhao, et al. (2008). "The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain." Science **321**(5889): 702-705.
2. Arras, M., P. Autenried, et al. (2001). "Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth." Comp Med **51**(5): 443-456.
3. Barbacid, M. (1995). "Neurotrophic factors and their receptors." Curr Opin Cell Biol **7**(2): 148-155.
4. Basbaum, A. I. (1999). "Distinct neurochemical features of acute and persistent pain." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7739-7743.
5. Basbaum, A. I. (2007). The senses : a comprehensive reference. Boston, MA, Elsevier.
6. Basbaum, A. I. (2008). Science of pain. Boston, MA, Elsevier.
7. Baxter, G. T., M. J. Radeke, et al. (1997). "Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2." J Neurosci **17**(8): 2683-2690.
8. Bement, M. K. and K. A. Sluka (2007). "Co-localization of p-CREB and p-NR1 in spinothalamic neurons in a chronic muscle pain model." Neurosci Lett **418**(1): 22-27.
9. Benbouzid, M., N. Choucair-Jaafar, et al. (2008). "Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice." Eur J Pain **12**(8): 1008-1017.
10. Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**(1): 87-107.
11. Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." Nat Rev Neurosci **7**(2): 137-151.
12. Blum, R. and A. Konnerth (2005). "Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions." Physiology (Bethesda) **20**: 70-78.
13. Bomholt, S. F., J. D. Mikkelsen, et al. (2005). "Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain." Neuropharmacology **48**(2): 252-263.
14. Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-1657.
15. Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1439-1445.
16. Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
17. Chaplan, S. R., F. W. Bach, et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." J Neurosci Methods **53**(1): 55-63.
18. Cheng, A., T. Coksaygan, et al. (2007). "Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism." J Neurochem **100**(6): 1515-1530.

19. Coffer, P. J., J. Jin, et al. (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335 ( Pt 1)**: 1-13.
20. Coyle, J. T. and R. S. Duman (2003). "Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments." Neuron **38(2)**: 157-160.
21. Crown, E. D., Z. Ye, et al. (2005). "Upregulation of the phosphorylated form of CREB in spinothalamic tract cells following spinal cord injury: relation to central neuropathic pain." Neurosci Lett **384(1-2)**: 139-144.
22. Delcourt, N., J. Bockaert, et al. (2007). "GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation." Trends Pharmacol Sci **28(12)**: 602-607.
23. Dickinson, T., K. Lee, et al. (2003). "Leading the charge--pioneering treatments in the fight against neuropathic pain." Trends Pharmacol Sci **24(11)**: 555-557.
24. Duman, R. S. (2002). "Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity." Eur Psychiatry **17 Suppl 3**: 306-310.
25. Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, et al. (2007). "Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations." Pain **132(3)**: 237-251.
26. Eide, F. F., E. R. Vining, et al. (1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling." J Neurosci **16(10)**: 3123-3129.
27. Ernfors, P. and C. R. Bramham (2003). "The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP." Trends Neurosci **26(4)**: 171-173.
28. Ernfors, P., C. M. Rosario, et al. (1993). "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 **17(3-4)**: 217-226.
29. Fang, L., J. Wu, et al. (2005). "Calcium/calmodulin dependent protein kinase II regulates the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element-binding protein of spinal cord in rats following noxious stimulation." Neurosci Lett **374(1)**: 1-4.
30. Frodin, M., T. L. Antal, et al. (2002). "A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation." EMBO J **21(20)**: 5396-5407.
31. Gartner, A., D. G. Polnau, et al. (2006). "Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling." J Neurosci **26(13)**: 3496-3504.
32. Gestwa, G., B. Wiechers, et al. (1999). "Differential expression of trkB.T1 and trkB.T2, truncated trkC, and p75(NGFR) in the cochlea prior to hearing function." J Comp Neurol **414(1)**: 33-49.
33. Goodman, L. S., A. Gilman, et al. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill.
34. Gruart, A., C. Sciarretta, et al. (2007). "Mutation at the TrkB PLC{gamma}-docking site affects hippocampal LTP and associative learning in conscious mice." Learn Mem **14(1)**: 54-62.
35. Gu, H., H. Maeda, et al. (2000). "New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." Mol Cell Biol **20(19)**: 7109-7120.

36. Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.
37. Huang, J. and B. D. Manning (2009). "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes." Biochem Soc Trans **37**(Pt 1): 217-222.
38. Jarvis, M. F. and J. M. Boyce-Rustay (2009). "Neuropathic pain: models and mechanisms." Curr Pharm Des **15**(15): 1711-1716.
39. Ji, R. R., T. Kohno, et al. (2003). "Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?" Trends Neurosci **26**(12): 696-705.
40. Kaplan, D. R. and F. D. Miller (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **10**(3): 381-391.
41. Katada, T., H. Kurosu, et al. (1999). "Synergistic activation of a family of phosphoinositide 3-kinase via G-protein coupled and tyrosine kinase-related receptors." Chem Phys Lipids **98**(1-2): 79-86.
42. Kawasaki, Y., T. Kohno, et al. (2004). "Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization." J Neurosci **24**(38): 8310-8321.
43. Kim, H. K., J. W. Kim, et al. (1991). "PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254." Cell **65**(3): 435-441.
44. Kim, S. H. and J. M. Chung (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." Pain **50**(3): 355-363.
45. Klusakova, I. and P. Dubovy (2009). "Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective." Ann Anat **191**(3): 248-259.
46. Latremoliere, A. and C. J. Woolf (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." J Pain **10**(9): 895-926.
47. Lee, F. S. and M. V. Chao (2001). "Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3555-3560.
48. Lee, F. S., R. Rajagopal, et al. (2002). "Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors." Cytokine Growth Factor Rev **13**(1): 11-17.
49. Lee, S. L., J. K. Kim, et al. (1999). "Expression of mRNAs encoding full-length and truncated TrkB receptors in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation." Neuroreport **10**(13): 2847-2851.
50. Lewin, G. R. and Y. A. Barde (1996). "Physiology of the neurotrophins." Annu Rev Neurosci **19**: 289-317.
51. Lowes, V. L., N. Y. Ip, et al. (2002). "Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors." Neurosignals **11**(1): 5-19.
52. Ma, W. and R. Quirion (2001). "Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation." Pain **93**(3): 295-301.
53. Malmberg, A. B. and A. I. Basbaum (1998). "Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates." Pain **76**(1-2): 215-222.

54. Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.
55. Mense, S. S. (2004). "[Functional neuroanatomy for pain stimuli. Reception, transmission, and processing]." Schmerz **18**(3): 225-237.
56. Merighi, A., C. Salio, et al. (2008). "BDNF as a pain modulator." Prog Neurobiol **85**(3): 297-317.
57. Mico, J. A., D. Ardid, et al. (2006). "Antidepressants and pain." Trends Pharmacol Sci **27**(7): 348-354.
58. Mico, J. A., J. Gibert-Rahola, et al. (1997). "Implication of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in the antinociceptive effect of tricyclic antidepressants." Eur Neuropsychopharmacol **7**(2): 139-145.
59. Miletic, G., E. N. Hanson, et al. (2004). "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 **361**(1-3): 269-271.
60. Millan, M. J. (1999). "The induction of pain: an integrative review." Prog Neurobiol **57**(1): 1-164.
61. Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." Prog Neurobiol **66**(6): 355-474.
62. Minichiello, L. (2009). "TrkB signalling pathways in LTP and learning." Nat Rev Neurosci **10**(12): 850-860.
63. Minichiello, L., A. M. Calella, et al. (2002). "Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation." Neuron **36**(1): 121-137.
64. Miyabe, T. and V. Miletic (2005). "Multiple kinase pathways mediate the early sciatic ligation-associated activation of CREB in the rat spinal dorsal horn." Neurosci Lett **381**(1-2): 80-85.
65. Mochizucki, D. (2004). "Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain." Hum Psychopharmacol **19 Suppl 1**: S15-19.
66. Narita, M., Y. Yajima, et al. (2000). "Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve." Eur J Pharmacol **401**(2): 187-190.
67. Nestler, E. J., M. Barrot, et al. (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.
68. Nicholson, R., A. K. Dixon, et al. (2005). "Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons." Neurosci Lett **380**(3): 316-321.
69. Patterson, S. I. and M. R. Hanley (1987). "Autoradiographic evidence for beta-adrenergic receptors on capsaicin-sensitive primary afferent terminals in rat spinal cord." Neurosci Lett **78**(1): 17-21.
70. Pezet, S., M. Malcangio, et al. (2002). "BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways?" Brain Res Brain Res Rev **40**(1-3): 240-249.
71. Pezet, S., F. Marchand, et al. (2008). "Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions." J Neurosci **28**(16): 4261-4270.
72. Rajagopal, R., Z. Y. Chen, et al. (2004). "Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes." J Neurosci **24**(30): 6650-6658.



- 73.** Rantamaki, T., P. Hendolin, et al. (2007). "Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain." Neuropsychopharmacology **32**(10): 2152-2162.
- 74.** Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-1564.
- 75.** Ren, K. and R. Dubner (2007). "Pain facilitation and activity-dependent plasticity in pain modulatory circuitry: role of BDNF-TrkB signaling and NMDA receptors." Mol Neurobiol **35**(3): 224-235.
- 76.** Rose, C. R., R. Blum, et al. (2004). "From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels." Bioessays **26**(11): 1185-1194.
- 77.** Saarelainen, T., P. Hendolin, et al. (2003). "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects." J Neurosci **23**(1): 349-357.
- 78.** Saravanakumar, K. (2010). "Bonica's Management of Pain, 4th edn." Anaesthesia.
- 79.** Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
- 80.** Scheid, M. P., P. A. Marignani, et al. (2002). "Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B." Mol Cell Biol **22**(17): 6247-6260.
- 81.** Scheid, M. P. and J. R. Woodgett (2003). "Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt." FEBS Lett **546**(1): 108-112.
- 82.** Scholz, J. and C. J. Woolf (2002). "Can we conquer pain?" Nat Neurosci **5 Suppl**: 1062-1067.
- 83.** Seltzer, Z., R. Dubner, et al. (1990). "A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury." Pain **43**(2): 205-218.
- 84.** Sindrup, S. H., M. Otto, et al. (2005). "Antidepressants in the treatment of neuropathic pain." Basic Clin Pharmacol Toxicol **96**(6): 399-409.
- 85.** Singer, W. D., H. A. Brown, et al. (1997). "Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D." Annu Rev Biochem **66**: 475-509.
- 86.** Soule, J., E. Messaoudi, et al. (2006). "Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain." Biochem Soc Trans **34**(Pt 4): 600-604.
- 87.** Sun, R., J. Yan, et al. (2007). "Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats." Neuroscience **144**(1): 286-294.
- 88.** Sun, R. Q., Y. J. Tu, et al. (2006). "Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin." Pain **120**(1-2): 86-96.
- 89.** Toker, A. and A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." J Biol Chem **275**(12): 8271-8274.
- 90.** Tsankova, N. M., O. Berton, et al. (2006). "Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action." Nat Neurosci **9**(4): 519-525.
- 91.** Usunoff, K. G., A. Popratiloff, et al. (2006). "Functional neuroanatomy of pain." Adv Anat Embryol Cell Biol **184**: 1-115.

- 92.** Wang, L. X. and Z. J. Wang (2003). "Animal and cellular models of chronic pain." Adv Drug Deliv Rev **55**(8): 949-965.
- 93.** Wang, X., J. Ratnam, et al. (2009). "TrkB signaling is required for both the induction and maintenance of tissue and nerve injury-induced persistent pain." J Neurosci **29**(17): 5508-5515.
- 94.** Wang, Z., S. Gluck, et al. (1998). "Requirement for phospholipase C-gamma1 enzymatic activity in growth factor-induced mitogenesis." Mol Cell Biol **18**(1): 590-597.
- 95.** Wick, M. J., L. Q. Dong, et al. (2000). "Mechanism of phosphorylation of protein kinase B/Akt by a constitutively active 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1." J Biol Chem **275**(51): 40400-40406.
- 96.** Woolf, C. J. and Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." Neuron **55**(3): 353-364.
- 97.** Wu, J., L. Fang, et al. (2002). "The role of nitric oxide in the phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein in the spinal cord after intradermal injection of capsaicin." J Pain **3**(3): 190-198.
- 98.** Xu, J. T., H. Y. Tu, et al. (2007). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats." Exp Neurol **206**(2): 269-279.
- 99.** Yajima, Y., M. Narita, et al. (2002). "Involvement of a spinal brain-derived neurotrophic factor/full-length TrkB pathway in the development of nerve injury-induced thermal hyperalgesia in mice." Brain Res **958**(2): 338-346.
- 100.** Yalcin, I., N. Choucair-Jaafar, et al. (2009). "beta(2)-adrenoceptors are critical for antidepressant treatment of neuropathic pain." Ann Neurol **65**(2): 218-225.
- 101.** Yalcin, I., L. H. Tessier, et al. (2009). "Beta2-adrenoceptors are essential for desipramine, venlafaxine or reboxetine action in neuropathic pain." Neurobiol Dis **33**(3): 386-394.
- 102.** Zhang, X. and L. Bao (2006). "The development and modulation of nociceptive circuitry." Curr Opin Neurobiol **16**(4): 460-466.
- 103.** Zhu, W. and G. S. Oxford (2007). "Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1." Mol Cell Neurosci **34**(4): 689-700.
- 104.** Zhuang, Z. Y., H. Xu, et al. (2004). "Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization." J Neurosci **24**(38): 8300-8309.
- 105.** Zimmermann, M. (2001). "Pathobiology of neuropathic pain." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 23-37.

# 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](#)