EDGARD JULIAN OSUNA MELO

**EXPRESSÃO DE CONEXINA 36 E CONEXINA 43 EM
CÉLULAS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL E SEU
ENVOLVIMENTO NA NOCICEPÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

EDGARD JULIAN OSUNA MELO

**EXPRESSÃO DE CONEXINA 36 E CONEXINA 43 EM
CÉLULAS DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL E SEU
ENVOLVIMENTO NA NOCICEPÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Yara Cury

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Melo, Edgar Julian Osuna.

Expressão de conexina 36 e conexina 43 em células do Gânglio da Raiz Dorsal e o seu envolvimento na nocicepção / Edgar Julian Osuna Melo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Yara Cury.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Comunicação celular.

Versão do título para o inglês: Expression of connexin 36 and connexin 43 in Dorsal Root Ganglion Cells and its involvement on nociception.

1. Conexinas 2. Junções intercelulares 3. Dor 4. Gânglios espinhais
5. Inflamação 6. Glia I. Cury, Profa. Dra. Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0146/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Edgar Julian Osuna Melo.

Título da Dissertação: Expressão de conexina 36 e conexina 43 em células do Gânglio da Raiz Dorsal e o seu envolvimento na nocicepção.

Orientador(a): Profa. Dra. Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Ciências Biomédicas
Secretaria de Pós-Graduação
Edifício Biomédicas III
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415- CEP05508-900
Tel. (0xx11) 3091.7439 - Fax (0xx11) 3091.7423
E-mail: spgicb@usp.br

Programa: **FARMACOLOGIA**

Interessado(a): **EDGARD JULIAN OSUNA MELO**

Assunto: Pedido para aceitação de parecer emitido pela CEUA do Instituto Butantan em substituição ao emitido pela CEUA do ICB

INFORMAÇÃO

A CPG/ICB, em **13/09/12**, após análise das justificativas apresentadas, bem como o parecer emitido pela Coordenação da CEEA/ICB, aprova em **caráter extritamente excepcional** o pedido para aceite do parecer emitido pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan em substituição ao parecer emitido pela CEUA deste Instituto, devendo o interessado anexar cópia nos exemplares da Dissertação.

Na oportunidade, solicita que a Coordenadoria do Programa, bem como os orientadores, atendem para as normas e prazos estabelecidos pela Comissão de Pós-Graduação e Comissões de Ética em Animais e Humanos deste Instituto.

Encaminhe-se à Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em **Farmacologia** para ciência dos interessados e ao Coordenador da CEEA/ICB.

CPG/ICB, 14 de setembro de 2012

Profa. Dra. MARINILCE FAGUNDES DOS SANTOS
Presidente

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Expressão de Conexinas em células do gânglio da raiz dorsal e seu envolvimento na nocicepção” **protocolo nº 808/11**, sob a responsabilidade de Yara Cury e Edgard Julian Osuna Melo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled “Dorsal Root Ganglion Cells connexins expression and its nociception involvement”, **protocol nº 808/11**, under the responsibility of Yara Cury and Edgard Julian Osuna Melo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto: 03/2011 – 08/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório Especial de Dor e Sinalização	386 ratos Wistar Machos

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

RESUMO

OSUNA-MELO, E. **Expressão de conexina 36 e conexina 43 em células do gânglio da raiz dorsal e seu envolvimento na nocicepção.** 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os canais de junções comunicantes (gap junctions, JC) são formados por subunidades chamadas de conexinas (Cx). Estas proteínas têm papel relevante no acoplamento celular, amplificação de sinais e condução de ondas de cálcio, participando da condutância de células nervosas ou gliais e modulando vários processos fisiológicos e fisiopatológicos. Apesar desta importância, o papel das conexinas na nocicepção e seu controle são ainda pouco conhecidos. Assim, o objetivo deste projeto é avaliar o envolvimento das conexinas no processo de nocicepção aguda, por meio de ensaios comportamentais *in vivo* e estudos de mapeamento da sua expressão em células do gânglio da raiz dorsal de ratos. Para tanto, foi analisado o efeito do tratamento intratecal com carbenoxolone (CBX) e quinina (bloqueadores de JCs), assim como de oligonucleotídeos antisense para conexinas 36 e 43 na indução e manutenção de hiperalgesia induzida por carragenina em ratos. O uso de oligonucleotídeos se apresenta como uma alternativa plausível para avaliar/confirmar a participação das conexinas 43 e 36 no processo de hiperalgesia, uma vez que não existem inibidores/bloqueadores farmacológicos totalmente específicos, principalmente no que se refere aos canais de conexinas (Cxs). Os resultados mostraram que a carragenina induz uma diminuição, dose e tempo-dependente, do limiar nociceptivo em ratos e que esse efeito hiperalgésico da carragenina foi bloqueado pelo tratamento com carbenoxolone (nas doses 20-50µg) e significativamente inibido por quinina (nas doses 20-50µg), sugerindo uma participação das junções comunicantes (JC) no processo. Os estudos mostraram que esses oligonucleotídeos, nas nossas condições experimentais, não interferiram com a atividade locomotora dos animais e dados ainda preliminares indicam que a sua administração acarretou inibição do fenômeno de hiperalgesia, suportando os dados farmacológicos do envolvimento destas conexinas nesse fenômeno. A participação da conexina 43 foi evidenciada a partir dos testes comportamentais e verificada nos experimentos de diminuição de expressão gênica por administração de oligodeoxinucleotídeos antisense. Entretanto, os resultados não mostraram um aumento ou regulação da sua expressão com o tratamento intratecal de bloqueadores, ou com a injeção do agente flogístico. A conexina 36 não foi detectada nos homogenatos de gânglios da raiz dorsal e também não apresentou marcação de imunofluorescência nos cortes histológicos. A marcação para conexina 36 foi virtualmente inexistente em todos os grupos, motivo pelo qual o anticorpo foi testado para outros tecidos mostrando sua capacidade de reconhecer o epítipo correspondente na proteína (marcações positivas). No caso particular da proteína conexina 43, a marcação foi conspícua em todos os grupos, porém com uma distribuição pouco uniforme ao longo da extensão do gânglio. Estes dados só permitem elucidar a presença da conexina 43 no gânglio da raiz dorsal, mas a sua modulação durante o processo de hiperalgesia inflamatória foi obtida com os estudos de expressão gênica e quantificação de níveis proteicos.

Palavras-chave: Junções Comunicantes. Conexinas. Hiperalgesia. Gânglio.

ABSTRACT

OSUNA-MELO, E. **Expression of connexin 36 and connexin 43 in dorsal root ganglion cells and its involvement on nociception.** 2013. 73 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Adjacent cells are commonly coupled by gap junctions (GJ) formed by two hexameric arrays of a multigene family of membrane proteins called connexins (Cx). These proteins have an important role in cellular coupling, signal amplification and calcium waves driving, participating in the conductance of glial and nerve cells or modulating various physiological and pathophysiological processes. Despite this importance, the role of connexins in nociception and its control are still poorly understood. The aim of this study is to evaluate Cx36 and Cx43 involvement in acute nociception process through behavioral assays, in vivo mapping studies of its expression in rat dorsal root ganglion cells and Cx 36 and Cx 43 expression in Wistar rat DRG by a combination of qualitative (immunohistochemistry) and quantitative (real time PCR and Western Blotting) methods. For this purpose, we analyzed the effect of intrathecal treatment with carbenoxolone (CBX) and quinine (GJ's blockers), as well as antisense oligonucleotides for connexins 36 and 43 in the induction and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia in rats. The results show that carrageenan induces a decrease dose and time-dependent, nociceptive threshold in rats. The hyperalgesic effect was blocked by treatment with carbenoxolone (20-50µg doses), Cx43 antisense and inhibited significantly by quinine (at doses 20 -50µg) but no with Cx36 antisense, suggesting an involvement of gap junctions (JC) in the process. Gene and protein expression were down and up-regulated at different treatments with no necessary correspondence in both processes. These findings show distinct patterns revealing the possibly Cx expression role in hyperalgesic process and allowing comparisons with other nociceptive processes. Studies have shown that these oligonucleotides, under our experimental conditions, did not interfere with the locomotor activity of animals and preliminary data indicate that its administration caused inhibition of the phenomenon of hyperalgesia, pharmacological data supporting the involvement of these connexins in this phenomenon. The participation of connexin 43 was evident from the behavioral tests and verified in experiments downregulating gene expression by administration of antisense oligodeoxynucleotides. However, the results did not show an increase or regulating its expression with the intrathecal treatment of blockers, or injecting the phlogistic agent. The connexin 36 was not detected in homogenates of dorsal root ganglia and also did not show immunofluorescence marking on histological sections. The marking connexin 36 was virtually absent in all groups, for which the antibody was tested for other tissues demonstrating its capacity to recognize the corresponding epitope in the protein (positive reactions). In the particular case of the protein connexin 43 labeling was conspicuous in all group, but with a rather uniform distribution along the length of the node. These data allow one to elucidate the presence of connexin 43 in the dorsal root ganglia, but the modulation during the inflammatory hyperalgesia was obtained in studies of gene expression and protein levels quantification.

Keywords: Gap Junctions. Connexins. Hyperalgesia. Ganglion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Conexinas.....	9
1.2 Dor – Considerações Gerais.....	12
1.3 Gânglio da Raiz Dorsal e Células Satélites.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Indução de Hiperalgesia.....	18
3.3 Avaliação da atividade motora dos animais.....	18
3.4 Injeção por via intratecal.....	19
3.5 Avaliação do efeito do bloqueio de JCs por CBX e Quinina.....	20
3.6 Coleta de Tecidos.....	20
3.7 Oligodeoxinucleotídeos (ODNs).....	21
3.8 Procedimento para retirada do Gânglio da Raiz Dorsal.....	25
3.9 Quantificação da expressão gênica de conexinas por PCR em Tempo Real.....	25
3.10 Quantificação de Proteínas por Western Blot.....	26
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Padronização experimentos de ação antinociceptiva do CBX e quinina	28
5.2 Curva dose-resposta para os bloqueadores de Junções Comunicantes.....	29
5.3 Efeito dos bloqueadores de JCs sobre a atividade motora dos animais.....	34
5.4 Coleta de material para Imunofluorescencia.....	37
5.5 Avaliação do efeito dos bloqueadores no limiar nociceptivo dos animais.....	39
5.6 Efeito dos oligonucleotídeos antisense sobre a atividade motora dos animais...	40
5.7 Efeito dos oligonucleotídeos antisense sobre a hiperalgesia.....	40
5.8 Imunofluorescencia.....	44
5.9 Expressão Gênica de Cx 36 e Cx43 no Gânglio da Raiz Dorsal.....	56
5.10 Quantificação de níveis proteicos de Cx 36 e Cx43 no Gânglio Raiz Dorsal...	61
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÃO.....	69
REFERENCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conexinas

A comunicação celular no sistema nervoso ocorre, usualmente, por meio de sinapses químicas, contudo, essa comunicação pode ocorrer também, por meio de sinapses elétricas. Existem diferenças entre essas duas sinapses, como por exemplo, na distancia entre as células pré e pós-sináptica - que no caso das sinapses químicas varia entre 20 e 40 nanômetros (nm), enquanto na sinapse elétrica, esta distancia está em torno de 3,5 nm -, ou no sentido da transmissão (unidirecional na sinapse química e usualmente bidirecional, na sinapse elétrica). Uma diferença morfológica fundamental também pode ser observada entre as duas sinapses, uma vez que a transmissão química necessita de vesículas pré-sinápticas, zonas ativas e receptores pós-sinápticos, enquanto a sinapse elétrica ocorre por meio de canais nas junções comunicantes (JCs).

Os canais de JCs são formados por dois hemicanais, cada um deles situado em uma das células que formam a sinapse (LOEWENSTEIN, 1981). Cada hemicanal, chamado de conexônio, possui um diâmetro que varia entre 1,5 a 2,0 nm. O conexônio é formado por seis subunidades protéicas que atravessam toda a membrana citoplasmática, medindo cerca de 7,5 nm em seu eixo mais longo. Essas subunidades são chamadas de Conexinas (Cxs) (UNWIN; ZAMPIGHI, 1980). Ao formarem o conexônio, as Cxs se arranjam de maneira a formar um poro no centro do conexônio (UNWIN; ZAMPIGHI, 1980). É por este poro que transitam moléculas com massa de até 1 kDa, como AMPc e IP3, além de íons Ca^{2+} .

Cada molécula de Cx atravessa a membrana citoplasmática quatro vezes, formando duas alças extracelulares (C1 e C2), quatro domínios transmembrana (M1 a M4) e dois segmentos citoplasmáticos carboxi e amino terminais (Figura 1). Com relação à estrutura protéica, o segmento da molécula entre M2 e M3 forma uma alça intracelular, cujo comprimento e homologia determinam o grupo a que pertence a Cx: se o segmento for curto, a Cx é classificada como sendo do grupo I, também conhecido como Cxs α (grupo ao qual pertence a Cx43); se for longo, como pertencente ao grupo II, ou Cxs β (BENNETT et al., 1991). A Cx36 e, mais recentemente, várias outras conexinas têm sido classificadas como pertencentes ao grupo III ou conexinas γ , a partir dos estudos que consideram a posição e tipo particular dos introns dos genes (CRUSIANI; MIKALSEN, 2006; FUSHIKI et al., 2010).

Figura 1 - Representação gráfica da estrutura das junções comunicantes.

(A) Disposição dos conexônios e da junção em células adjacentes. (B) Conformação de abertura ou *gating* de hemicanais. (C) Estrutura transmembranaral de cada subunidade proteica ou conexina.

Fonte: Adaptado de Kandel et al. (1991)

No sistema nervoso, a presença de JCs, entre células da glia, é bem conhecida e constitui uma via importante de passagem de metabólitos e sinalização por segundos mensageiros. A propagação de ondas de Ca^{2+} através de JCs entre astrócitos, em resposta à aplicação de glutamato ou estímulo mecânico, foi detectada tanto em primária de hipotálamo como em cortes de hipotálamo (CHARLES, 1998).

Cerca de 14 Cxs (Cx26, Cx29, Cx30, Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Cx46, Cx47, Cx50 e Cx57) já foram identificadas e expressas no sistema nervoso de mamíferos. Os canais formados por diferentes Cxs possuem regulação diferenciada, tanto no que se refere à dinâmica biofísica do canal (BARRIO et al., 1992), quanto à expressão gênica e aos níveis proteicos da conexina. A expressão gênica e os níveis proteicos de cada uma das conexinas podem ser distintamente modulada por hormônios, condições da matriz extracelular e fases cíclicas da célula (BENNETT et al., 1991).

Estudos funcionais mostraram que camundongos deficientes em proteína Cx36 apresentam menor excitabilidade neuronal do que camundongos normais (MEIER et al., 2002). Dados recentes têm mostrado que as JCs, via Cx37, estão envolvidas na dor crônica causada por lesão do sistema nervoso (WU et al., 2012).

Dados de literatura tem evidenciado também a importância das JCs na ativação da glia, por meio da amplificação de sinais por propagação de ondas de cálcio provenientes de células gliais distantes e proximais. Uma vez ativadas, as células da glia podem liberar substâncias envolvidas na dor e inflamação (ARAQUE et al., 1999; NEWMAN, 2001; VERKHRATSKY; ORKAND; KETTENMANN, 1998). Cabe ressaltar que os dados sobre o papel das conexinas na gênese de processos nociceptivos, particularmente decorrentes de inflamação aguda são ainda escassos e os mecanismos responsáveis por esse efeito não estão ainda caracterizados. Assim, no presente estudo, avaliaremos o envolvimento das conexinas 36 e 43 na nocicepção inflamatória aguda, por meio de ensaios comportamentais in vivo e de estudos de mapeamento da sua expressão em células do gânglio da raiz dorsal de ratos.

É importante salientar que estudos de expressão de conexinas nos diferentes tipos celulares no sistema nervoso têm mostrado que os astrócitos expressam principalmente Cx43, enquanto que a Cx32 é encontrada principalmente em oligodendrócitos (BENNETT et al., 1991; SPRAY; DERMIETZEL, 1995). Pouco se conhece ainda, sobre as conexinas que participam da formação de junções comunicantes neuronais. A conexina 36 foi caracterizada como a primeira proteína de junção comunicante que é expressa de forma predominante em neurônios (CONDORELLI et al., 2000; RASH et al., 2000; TEUBNER et al., 2000). Condoirelli et al. (2000) descreveram mais detalhadamente, a distribuição de Cx36 no sistema nervoso central; contudo pouco ainda se conhece sobre a expressão dessa conexina no sistema nervoso periférico. Uma vez que o gânglio da raiz dorsal (DRG) é um local importante para a transmissão e manutenção dos processos de hiperalgesia, o presente trabalho estudará a expressão gênica e proteica das conexinas 36 e 43 no DRG e a correlação com a nocicepção observada in vivo.

1.2 Dor – Considerações Gerais

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias, as quais possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos, denominadas nociceptores (receptores da dor). Os nociceptores são terminações nervosas livres desprovidas de estruturas receptoras específicas sendo, portanto, uma continuação da própria fibra nervosa. Os nociceptores são normalmente ativados por estímulos de alta intensidade tanto mecânica, quanto térmica e/ou química. Os neurônios aferentes primários desempenham três funções principais no que diz respeito à nocicepção: 1- detecção do estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução); 2- condução do impulso da periferia para a medula espinhal; 3- transferência desses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (CAVIEDES et al., 2002). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHIAFFO et al., 2004; WOOLF, 2004).

Muitas fibras aferentes nociceptivas são desprovidas de mielina e, portanto possuem baixa velocidade de condução (fibras C). As fibras C são também caracterizadas como nociceptores polimodais, uma vez que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas A δ , conduzem mais rapidamente os estímulos periféricos. As fibras nociceptivas terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, formando conexões sinápticas com os neurônios secundários que se dirigem ao tálamo (BELMONTE; CERVERO, 1996; RANG et al., 1997). Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, fibras nociceptivas, particularmente as do tipo C, são sensibilizadas e, por consequência, podem ser ativadas por estímulos de menor intensidade, acarretando hiperalgesia ou alodinia (DWORKIN; CORBIN; YOUNG, 2006; KIDD; URBAN, 2006). É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores "silenciosos" ou "adormecidos" (silent/ sleeping nociceptors), é ativado durante processos inflamatórios, contribuindo para a hiperalgesia. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAEFFER et al., 1988; SCHEMELZ et al., 2004).

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, tais como prótons extracelulares, mediadores lipídicos, bradicinina, prostaglandina, entre outros, podem interferir com a atividade dos neurônios nociceptivos primários (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os mediadores periféricos da hiperalgesia atuam via receptores ligados a

intermediários celulares regulatórios (proteína G, segundos mensageiros), que regulam a permeabilidade da membrana e a concentração iônica celular (REICHLING; LEVINE, 1999). A sensibilização dos neurônios nociceptivos primários é decorrente, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínoquinases, como PKA induzindo a fosforilação de canais iônicos e aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular. A consequência destes efeitos metabólicos é a despolarização parcial da membrana neuronal facilitando a geração e a transmissão de impulsos nervosos (CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Alguns mediadores hiperalgésicos elevam diretamente as concentrações intracelulares de AMPc, enquanto outros, cujos receptores não estão acoplados a adenilato ciclase, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação da proteínoquinase C (PKC). A ativação da PKC acarreta a fosforilação e o aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca^{2+} e Na^{+} (JULIUS; BASBAUM, 2001). Tem sido proposto ainda que a via das proteínoquinases ativadas por mitógeno (MAPKs), ativada pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina, pode ser ativada independentemente da ativação da PKC ou PKA (DINA et al., 2003). Esta via de sinalização é composta por 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK. Dai e colaboradores (2002) demonstraram a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hiperalgésicos. Independentemente do mecanismo de sinalização intracelular, o aumento na expressão e fosforilação de canais iônicos em membranas de neurônios periféricos é o principal fator responsável pelo aumento da excitabilidade da membrana destas células (WOOLF, 2000). Os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos são os canais de sódio e de cálcio dependentes de voltagem (SAEGUSA et al., 2002; WOOLF, 2004).

Além da sensibilização dos neurônios nociceptivos primários, outros mecanismos podem estar envolvidos na gênese da hiperalgesia e alodinia de origem inflamatória como excitabilidade ectópica, aumento da excitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal ou no núcleo trigeminal do tronco cerebral (Sensibilização Central), reorganização estrutural e redução da atividade de sistemas inibitórios endógenos (WOOLF, 2004). Contudo, alterações no corno dorsal da medula espinhal têm sido associadas principalmente ao desenvolvimento dos fenômenos que caracterizam a dor de origem neuropática.

O corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação da informação nociceptiva da periferia para o SNC (YAKSH, 1999). O principal neurotransmissor excitatório envolvido na sensação nociceptiva é o glutamato, enquanto

neuropeptídeos como a substância P, a neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina parecem atuar como neuromoduladores da transmissão nociceptiva (KIDD; URBAN, 2001; SCHAIBLE et al., 2004). Tais neuromoduladores agem em receptores específicos na membrana pós-sináptica, favorecendo a transmissão da informação nociceptiva. A ativação e a modulação dos receptores NMDA para glutamato parece ter um papel importante na indução e manutenção da sensibilização dos neurônios medulares (Sensibilização Central) (SCHAIBLE et al., 2004). Contudo, a liberação de neuropeptídeos, de fatores neurotróficos e de prostaglandinas, neste sítio medular, também contribui para a gênese do processo de Sensibilização Central (BESSON, 1999; WOOLF, 2000). Dados da literatura têm evidenciado que as células da glia (astrócitos e microglia) presentes na medula espinhal, devido à liberação de vários mediadores nociceptivos, contribuem também para a sensibilização central (WIESELER-FRANK, 2004).

A caracterização dos mediadores químicos e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da dor tem contribuído para o avanço no conhecimento da fisiopatologia dos processos nociceptivos e de seu controle, bem como para a descoberta de novos fármacos analgésicos. Para possibilitar estes estudos, vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos e utilizados. Estes modelos têm favorecido o estudo das dores manifestas e das hiperalgesias tanto de origem inflamatória quanto neuropática.

Vários agentes indutores de hiperalgesia inflamatória têm sido utilizados experimentalmente, dentre eles, a carragenina, um agente inflamatório e a prostaglandina E2 (PGE2), um mediador inflamatório. O aumento da sensibilidade à dor causado pela carragenina é caracterizado por um componente periférico, resultante da sensibilização dos nociceptores e por um componente central, com a participação de circuitos centrais de dor (FERREIRA; LORENZETTI; CORRÊA, 1978). A mediação química da hiperalgesia envolve a liberação sequencial de mediadores nociceptivos. Em ratos, esta cascata inicia-se com a formação de bradicinina (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993), que estimula a liberação do fator de necrose tumoral alfa – TNF α (CUNHA et al., 1992), que por sua vez induz a secreção de interleucina-6 e interleucina-1* 40, que estimulam a formação de produtos da ciclooxigenase, resultando principalmente na produção de PGE2 41. O TNF- α é também capaz de induzir a liberação de quimiocinas (interleucina-8/CXCL8 em humanos, CINC-1 em ratos) (LORENZETTI et al., 2002), que estimulam a liberação/produção de aminas simpatomiméticas. Prostanóides e aminas simpatomiméticas representam os mediadores finais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro hiperalgésico. Cabe ressaltar que em camundongos, existe diferença na hierarquia de liberação de citocinas. Assim, foi

demonstrado que não só o TNF- α , mas também a quimiocina derivada de queratinócitos KC/CXCL1 são as primeiras citocinas liberadas pela carragenina, sendo sucedidas pela IL-1 β . Porém, diferentemente do TNF- α , o KC/CXCL1 age também via liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005).

1.3 Gânglio da Raiz Dorsal e Células Satélites

Os gânglios sensoriais, tais como o gânglio da raiz dorsal (DRG), o gânglio tirgeminal (TRG) e os gânglios nodosos (GN), contêm os corpos celulares dos neurônios aferentes primários, que transmitem informação sensorial desde a periferia para o SNC (ALDSKOGIUS et al., 1986; MATTHEWS; CUELLO, 1982). Os ramos periféricos de axônios do DRG se estendem para a periferia e formam terminações sensoriais na pele, músculos, vísceras, articulações e outros órgãos; os ramos centrais entram no corno dorsal da medula espinhal e no núcleo espinhal do trigêmeo, no caso do TRG. Além disso, os gânglios sensoriais contêm células gliais satélites (SGCs) que envolvem completamente os neurônios sensoriais (PANNESE, 1981; PANNESE et al., 2003). Em contraste com a grande quantidade de informação disponível sobre as células gliais no SNC, pouco se sabe sobre as SGCs nos gânglios sensoriais. Morfologicamente, as SGCs são células laminares e não apresentam processos (prolongações membranais acompanhadas de citoplasma) em condições fisiológicas (em condições de axotomia, alguns processos são evidentes, ver Hanani et al., 2002), ao contrário das células da astroglia no sistema nervoso central (HANANI, 2005). Em geral, cada neurônio sensorial tem a sua própria SGC e, assim, os neurônios e suas SGCs formam uma unidade funcional morfolologicamente distinta (HANANI, 2005). Da mesma forma que outras células da glia, tais como células de Schwann e astrócitos, as SGCs têm receptores para vários neurotransmissores e outras moléculas bioativas (HANANI, 2005; KETTENMANN; STEINHÄUSER, 2005).

Dados de literatura têm mostrado que lesões nervosas causadas, por exemplo, por axotomia de fibras pós-ganglionares, acarretam alterações morfológicas e fisiológicas marcantes nos neurônios (DE STEFANO et al., 2007; SHADIACK et al., 2001) e também nas SGCs, sendo provável que as SGCs estejam envolvidas nas alterações neuronais causadas por essas lesões (DE STEFANO et al., 2007). Durante inflamação periférica, foi observado aumento no acoplamento entre SGCs, particularmente entre SGCs que formam envelopes ao redor de neurônios, particularmente aqueles com projeções para a região inflamada (HANANI

et al., 2010). Estes achados sugerem que células satélites podem ser relevantes para a gênese e manutenção de hiperalgesia inflamatória e indicam a importância do acoplamento mediado por junções comunicantes para esse fenômeno. Apesar destes dados, não é ainda conhecido quais tipos de conexinas estão envolvidas nos fenômenos de hiperalgesia e os mecanismos envolvidos nesse processo.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é avaliar o envolvimento das conexinas 36 e 43 no processo de nocicepção inflamatória aguda, por meio de ensaios comportamentais in vivo e estudos de mapeamento da sua expressão em células do gânglio da raiz dorsal de ratos. Os objetivos específicos são:

- ✓ analisar o efeito do tratamento intratecal com carbenoxolone (CBX) e quinina, bloqueadores de JCs, na indução e manutenção de hiperalgesia induzida por carragenina em ratos;
- ✓ estudar o efeito do tratamento intratecal com oligonucleotídeos antisense para confirmar o papel das conexinas 36 e 43 no processo de hiperalgesia induzida por carragenina em ratos;
- ✓ avaliar expressão gênica e os níveis proteicos das conexinas 36 e 43 no gânglio da raiz dorsal (DRG) de animais “naive” e submetidos a hiperalgesia, utilizando técnicas combinadas, como reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR), imunohistoquímica, imunofluorescência e western blot.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 160 g e 180 g, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-22 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração balanceada para ratos e água ad libitum. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (protocolo número 808/11).

3.2 Indução de hiperalgesia

Para a indução de hiperalgesia foi utilizada carragenina (250 µg/0,1 ml/pata) (SIGMA-ALDRICH, EUA), um polissacarídeo sulfatado que produz reação inflamatória aguda. A carragenina foi injetada por via subcutânea na superfície plantar posterior direita do rato.

Para avaliação da hiperalgesia, foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação.

Este teste foi aplicado antes (medida basal) e em diferentes tempos após a injeção de carragenina ou das injeções intratecais de bloqueadores de JCs.

3.3 Avaliação da atividade motora dos animais

Uma vez que nosso trabalho visa avaliar a atividade antinociceptiva de bloqueadores de JCs e oligonucleotídeos antisense para conexinas 36 e 43, administrados por via i.t. e que o método para avaliação da sensibilidade dolorosa utilizado atualmente emprega uma resposta motora (retirada da pata), torna-se necessária a determinação da atividade geral dos animais.

Para essa avaliação foi utilizado o teste do Campo Aberto, de acordo com o proposto por Broadhurst (1960). O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular de 97 cm de diâmetro, pintada de branco.

O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais.

Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de três minutos. Os parâmetros avaliados foram:

a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena;

b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto.

Experimentos de campo aberto foram realizados com animais submetidos à injeção previa de bloqueadores de junções comunicantes e PBS. Para isto, cada animal foi monitorado 3 minutos, sendo registrada a quantidade de vezes que se locomovia entre dois quadrantes e a quantidade de vezes que se levantava, como parte do comportamento exploratório.

3.4 Injeção por via intratecal

Os procedimentos de injeção intratecal foram realizados em animais anestesiados com Isoflurano na forma gasosa. A vértebra lombar, imediatamente anterior, em sentido cranial, às duas cristas ilíacas, foi localizada e segurada com o dedo indicador, possibilitando a localização do processo espinoso lombar da L6, por palpação externa. Uma agulha conectada a uma seringa Hamilton de 50 μ L foi inserida perpendicularmente à posição do dedo indicador e empurrada suavemente em direção cranioventral. A presença da agulha no espaço intratecal foi confirmada pela manifestação de um rápido movimento lateral da cauda (flick) que ocorreu após a penetração do ligamento Flavum. Os animais foram então injetados com um volume de 10 μ L de solução de PBS contendo diferentes doses de CBX (carabenoxolone ou sal 3-hemisuccinato de sódio do ácido 3 β -hidroxi-11-oxooleano-12-em-30oico) ou quinina (Sigma-Aldrich, EUA), bloqueadores de junções comunicantes. Animais controles foram injetados, por via i.t., com 10 μ L de PBS.

3.5 Avaliação do efeito do bloqueio de JCs por CBX e Quinina

Com o objetivo de avaliar o envolvimento das conexinas presentes no DRG, na hiperalgesia inflamatória, foram usados bloqueadores de junções comunicantes (CBX, sal 3-hemisuccinato de sódio del ácido 3 β -hidroxi-11-oxooleano-12-em-30oico e quinina, SIGMA-ALDRICH, EUA). Para tanto, foram realizadas injeções intratecais de CBX (concentração determinada em testes preliminares) e quinina (concentração determinada em testes preliminares), diluídos em PBS, ou PBS (controle), foram administrados por via intratecal. A administração dos bloqueadores foi realizada 2 horas e meia após a injeção intraplantar de carragenina para conseguir o seu efeito na vigência do pico de ação inflamatória do agente flogístico.

3.6 Coleta de Tecidos

Para a coleta dos tecidos (os gânglios correspondentes à L4, L5 e L6), os animais foram anestesiados com ketamina (5 mg/100 g do peso corpóreo) e xilazina (1 mg/100g), ministradas por via intravenosa. Os animais cujos gânglios da raiz dorsal destinaram-se para PCR e Western Blotting foram sacrificados e o material coletado e depositado imediatamente em fase intermediária de nitrogênio líquido. Já para a coleta do material destinado aos estudos histológicos, os animais foram submetidos a procedimento de perfusão com solução salina tamponada e fixação com paraformaldeído. Após 4 horas em paraformaldeído 4%, as medulas espinhais foram retiradas junto com os gânglios da raiz dorsal (de L4 a L7) para a realização das análises histológicas durante a marcação ulterior de fluorescência. Os tecidos foram deixados por 24 horas em solução crioprotetora de sacarose 30%. O material foi então incluso em gel para corte em criostato. Além dos DRGs as medulas espinhais das regiões correspondentes aos gânglios foram coletadas para estabelecer uma relação meramente topológica dos gânglios e não foram estudadas no presente trabalho

3.7 Oligodeoxinucleotídeos Antisense (ODNs)

Os ODNs utilizados neste estudo foram obtidos da Bionner (USA) e todos os experimentos desde o desenho até a extração dos tecidos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos A. Parada e com a colaboração da Dra. Dionéia Araldi e da Doutoranda Maria Carolina Athié. Os ODNs antisenses (ODNs-AS) específicos para Conexina 43 e Conexina 36 foram desenhados a partir do genoma de rato disponível no GeneBank (Pubmed – Medline). Os desenhos dos ODNs foram feitos por um programa cujo algoritmo continha 8 critérios para a melhor sequência possível segundo estabelecido por Stone e Vulchanova (2003) para uma sequência de 15-20 pares de bases:

1. 30% a 52% da sequência de bases CG
2. No mínimo 3 “A” ou “T” nas posições de 15 a 19
3. Ausência de repetições internas
4. “A” na posição 3
5. “A” na posição 19
6. “T” na posição 10
7. Ausência de C ou G na posição 19
8. Ausência de G na posição 13

ODN antisense específico para Conexina 43

>gi |33285446|ref|NM_012567| PREDICTED: Rattus norvegicus gap junction protein, alpha 1 (Gja1), mRNA.

Target: GGATTGAAGAGCACGGCAA

Complementar: CCTAACTTCTCGTGCCGTT

Reverso: TTGCCGTGCTCTTCAATCC

ACGAGGTATCAGCACTTTTCTTTTCATTGGGGGAAAGGCGTGAGGAAAGTACCAAA
 CAGCAGCAGACTTTTAACTTTTAAACAGACAGGTCTGAGAGCCTGAACTCTCATT
 TTTCCTTTGACTTCAGCCTCCAAGGAGTTCCACCAACTTTGGCGCGCCGGCTTCAC
 TTTCATTAAGTGAAAGAGAGGTGCCCAGACATGGGTGACTGGAGTGCCTTGGGG
 AAGCTTCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACCGCTGGAGGGAAGGTGTGGCTGT
 CAGTGCTCTTCATATTCAGAATCCTGCTCCTGGGGACAGCTGTTGAGTCAGCTTGG
 GGTGATGAACAGTCTGCCTTTCGCTGTAACACTCAACAACCTGGCTGCGAAAACG
 TCTGCTATGACAAGTCCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTCTGGGTCTTCAGATC
 ATATTCGTGTCTGTGCCACCCCTCCTGTACTTGGCCCATGTGTTCTATGTGATGAG
 GAAGGAAGAGAAGCTAAACAAGAAAGAAGAGGAGCTCAAAGTGGCCCAGACTG
 ACGGGGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGCAGATTGAAATCAAGAAGTTCAAGT
 ACGGGATTGAAGAGCACGGCAAGGTGAAAATGAGGGGCGGCTTGCTGAGAACC
 TACATCATCAGCATCCTCTTCAAGTCTGTCTTCGAGGTGGCCTTCTGCTCATCCA
 GTGGTACATCTATGGGTTCAAGCTTGAGCGCGGTCTACACCTGCAAGAGAGATCCC
 TGCCCCCACCAGGTAGACTGCTTCTCTCACGTCCCACGGAGAAAACCATCTTCA
 TCATCTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCTCTCGCTTTGAACATCATTGAGCTC
 TTCTACGTCTTCTTCAAAGGCGTTAAGGATCGCGTGAAGGGAAGAAGCGATCCTT
 ACCACGCCACCCTGGCCCACTGAGCCCATCAAAAGACTGCGGATCTCCAAAATA
 CGCCTACTTCAATGGCTGCTCCTCACCAACGGCTCCACTCTCGCCTATGTCTCCTC
 CTGGGTACAAGCTGGTTACTGGTGACAGAAACAATTCTCGTGCCGCAATTACAA
 CAAGCAAGCTAGCGAGCAAAACTGGGCGAACTACAGCGCAGAGCAAAATCGCAT
 GGGGCAGGCCGGAAGCACCATCTCCAACCTCGCACGCCAGCCGTTTCGATTTCCCC
 GACGACAACCAGAATGCCAAAAAAGTTGCTGCTGGACATGAACTCCAGCCATTA
 GCCATCGTGGACCAACGACCTTCCAGCAGAGCCAGCAGCCGCGCCAGCAGCAGG
 CCTCGGCCTGATGACCTGGAGATTTAAACCGGCTTGAGCATCGAGCTGTCGATTA
 TGGAGGAGAAAAAAAGGTGCTTGACAGAACATGCACCTAGGGTGTTCATTTTCGTT
 CCCGTGGAGTTGGTACTCAACAACCTCAGCAATGAGGCATAGAAAACAAAGACA
 TTACAATACCTAGGTTCCCTTGGGGGTGCTTGGGATAGCTGGGCGGAACAGGTGGG
 GATAAGGGAGGTACACATTGATATTTAATGTAGAAGATTCAAAGAACTTAAATTC
 TAGTAAGAGTCGCATTGGGTGAACATAGATAAGGGCTTTCTCTCTCTGCCCCCAT
 CCCCCAACTGAACCTTAAGAATGAGTCTGTGTACATGAATTGAGTGAGTGATATT
 TTTTTTTAATTTTGTTTTACTGAGATTCTGCGATAGCTTTGAGCAGAAATCTGAGT
 CCTCCACATAGCGTTTCCTTTATGAAAAGACAGATTGTCCTACATCCCCCCCCCCCC
 AAAAAAAACATTCCAGTGTTTAAAAAACTTGCATTTTGCAGGTAAGCTTCCCTGGT
 CTACCCCTCTGGGTGTGAGTGGACCTTGTGTTATTTGCTAGACACGATTTTCATTC
 TTAGTATCAATCTGAAGTTCAGACAAGGCTCAAAGAAAAACGACCGCCCATGTA
 GTTGCATCTCACTGGGTTCTTTGCTGAATCTGTCTCACCTTTGTGCCTTCCAAACA
 TCATCCTCGACTGGTCCTCGCCCTCACCAAACGGCTTCTATCAACATTTTTTAAAC
 AGTCATAACGTCATTTTTTAGTTTTAGTTTTTTTTTTTTTTCTTTTGAGTTAGCATCAGGG
 AGGTGAGCCATGCTCAAGATTTAACAATCGCTTCTACGTGTGGATGTGCGCATGT
 GTAAGTGTGTGTTTTGTTCATTATTGGTACAAGCAGAGGCAGTCTAGACTCACAAA

TACAGATTTGAATCTAATGCACAGTGTTCAAATTTGAACCTTCCTAGTGGATTTTT
 GTGGTGTGGGCCAATGCGGTGTTTACATTATAGAATTCCTGCCGTGCAAGTAAAG
 CACAGTTTTTCCCTGAAAATTTTTTTTCCAGGTATTCCATTATGGATACTGGTTTTG
 TTAATTATAATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC
 TCTTTTAGAATGTAGCAGTAATCGCCATTACTGAAATGAATGATTTTTCTTTTTTTTT
 GAAATATAATCATTGATGCTTGAATGATAGAGTTTTAGTACTGTAAACGGGCTTT
 AGTCATTAATGTGAGAGACTTAGATGGGGATTGCCTAGAGTGGACTATCAAGTGA
 GCCTAAAGGAACTTTGTAGTAACTGGTAATCTGATTTTTTTTTTTTGTCTACTTAAC
 TACACATAACTCAGAACTTGTATTCTGAGTTTAAACAGTCTTTTAGATTGACGAGCA
 ACTTGGATGTTTGCCTAAGACTTTGTTTGAAACACTAAGGGGCGAGGGAGGTTT
 CAACAGTGCACATGTAATAATTTATTTGAACTGTATGCTAAAGACACCAGTTTC
 TTCAAATGACTTTTTTTTAAAAAAAAAACAAAAACAAAACATCACAGATGATTGA
 AATGTTCGAGTTATCATGTGTTTCCCTCTTGCGCGTCAGCTACAGAAAAGAGTTTTT
 GTACAATGAGAACTAATGTGTTTGACATTCCACGTTAAACTGCTGTCGTGTTTCG
 GCTTCGTAGCATGTAATGTAGACCTAGCCCATCCATTCATGTGCTCGGGAGAGTG
 TTCTTTATCCAATAAAGTTTTTAATTTAGTATATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

O controle utilizado foi o mismatch, que corresponde a mesma sequência do antisense exceto pela substituição de 3 a 6 bases (Mismatch: AATTCGTGCTTTTAAATCC).

ODN antisense específico para Conexina 36

>gi|9506728|ref|NM_019281.1| PREDICTED: Rattus norvegicus gap junction protein, delta 2 (Gjd2), mRNA.

Target: TCCAAGTGGTGTTCGAAA

Complementar: AGGTTCAACCACAAAGCTTT

Reverso: TTTCGAAACACCACTTGGA

TCTTTAATTGGGGGCAATTAGCTCCCTGCCAGGAGGTGCGGCCCCGGGGAGGGGCC
 AGGACCAAGAACGTGCCCCGTACTGCCAGTCTTTGTCTGCTGCCTCCGGATGCA
 CAGCGATGGGGGAATGGACCATCTTGGAGAGGCTGCTGGAAGCCGCGGTGCAGC
 AGCACTCCACTATGATTGGGAGGATCCTGTTGACTGTGGTGGTGATCTTCCGGAT
 ACTCATTGTGGCCATTGTAGGGGAGACGGTGTACGATGATGAGCAGACCATGTTT
 GTGTGCAACACCCTGCAGCCCCGGCTGTAACCAGGCCTGCTATGACCGCGCCTTTC
 CCATCTCCCATATACGTTACTGGGTCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGT
 CTCTGTTTCATCACCTATTCTGTGCATCAATCTGCCAAGCAGAGAGAACGCCGGT
 ACTCGACTGTCTTCCCTAGCCCTGGACAGAGACCCTGCTGAGTCTATAGGGGGACC
 TGGAGGAACGGGGGGTGGTGGCAGTGGTGGGAGCAAGCGAGAAGATAAGAAGT
 TGCAAAATGCCATTGTCAATGGGGTGCTCCAGAACACAGAGACCACCAGTAAGG
 AGACAGAACCAGATTGCTTAGAGGTTAAAGAGCTGGCTCCACATCCATCTGGGCT
 GCGCACAGCAGCAAGGTCCAAGCTTCGAAGACAGGAAGGTATTTCCCGCTTCTAC
 ATCAT**TCCAAGTGGTGTTCGAA**ATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAG
 TACTTTCTATATGGCTTCAGTGTCCCAGGGTTGTATGAGTGCAACCGCTACCCCTG
 CATCAAGGAGGTAGAATGTTATGTGTCTAGACCTACGGAGAAGACGGTCTTTCTG
 GTGTTTCATGTTTGCTGTGAGCGGCATTTGTGTGGTGCTCAATCTGGCTGAACTTAA
 CCATCTGGGATGGCGGAAGATCAAACCTGGCTGTCCGGGGAGCCCAGGCCAAGAG
 GAAGTCAGTCTATGAGATTCGTAACAAAGACCTGCCAAGAGTCAGTGTTCCTCAAT
 TTCGGCAGGACTCAGTCCAGTGACTCCGCCTATGTGTGAAAGGGCAGGTTTGGGG
 AAGGCCTGCTAGGTGGCAAGTAGCCCCAAGGCAGAGGATGACTCGAGGGTGTAC
 AGGTTTGCCCTCATTTGCGTAGTGCTCGCTGTGAAGGTCTAGGATACAGATATTA
 AGAGGTTCGTCATCAACACAAAGGAGAGGTAGAACTGTCATCACATGTCACACCA
 TCAGTTCTACTGAGACCACCGGGTAGAGTGACAAGATGGCTAAGTTGGATGTCCT
 TGGGCCTTCTTCTTTCGTGGCCCTTCCTGCTCCTGATAATAGTGAACCTGGCATAGC
 TGCCAAGCAAGAATTAGCTCGGCTGAGCTCTGTATTCTGGTGAATGGCATGAGTC
 AAACACTCATTGATATAAAATTTGTGACCCATCTCAGCACATACCTTTATCCTGGG
 CTGCAGAAAAAAAATCCTGGAGGATATTTTTCCCCCTTCAGCATGCCCTTTCCC
 TCAAACCCAGGATAGCATGCCAGCTTTTCTTTTTTCCTTGATCTGGCCTTACATTAG
 CCCTAACACAGTTTATCTGCAAGCTGGAGGGAATTACATGGGGTGCTTTTTGGAG
 ACTGGCCAGGGCAGAGGTTTGCAGTAGAGCCCCATATGACTGGCCCTTAGTCATT
 AAAACAAAACAAAACCTTAGGAATGTCTCAATATTTCCAATTTTTTAAAACTCAA
 ATTGCACTGGTGTGTTTATTAGGGGTGGGGGATGGGAGGGAGGGGAATCTCAAC
 AACACTTCTGTGAGATGGTCATTTCACTGTTGAGCATGTGTTTATGAGCTTTGAGA
 TATTTCTGCCTTCTAGATTATGGCCCCG

Mismatch: TTTCGAAAAACCCCTTAGA

Os ODNs foram liofilizados e reconstituídos em solução NaCl 0,9% livre de nuclease à concentração 3 µg/µL. Os ODNs-AS ou os mismatches foram administrados por via intratecal (30 µg/10 µL) uma vez ao dia, durante 5 dias consecutivos.

3.8 Procedimento para retirada do gânglio da raiz dorsal

Ao final dos experimentos os animais foram anestesiados (Tiopental sódico, 50 mg/kg, i.p.) para a retirada dos gânglios das raízes dorsais (DRG, L4, L5 e L6). Os ratos foram colocados em uma mesa cirúrgica própria para tricotomia da região dorso-lombar, seguida de assepsia e antisepsia da região com povidine iodado. Posteriormente foi feita a incisão póstero-mediana, seguida de abertura por planos até lamina óssea e feita laminectomia para expor e visualizar os DRG correspondentes às vértebras L4, L5 e L6 na sua emergência. Depois de retirados, os gânglios foram imediatamente congelados em gelo seco e estocados em -70 °C até o momento do uso para quantificação da expressão gênica e de níveis proteicos.

3.9 Quantificação da expressão gênica de Cxs por PCR em tempo real

- Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o método do TRIzol. Finalizada a extração, a quantificação dos ácidos nucleicos foi feita utilizando-se uma alíquota para leitura em espectrofotômetro. Após a extração do RNA foi realizada a transcrição reversa, seguindo o protocolo padrão da enzima SuperScript III.

- PCR em tempo real (PCR Real-Time)

A partir da síntese do cDNA, foi efetuado o PCR Real-Time (Applied Biosystems- GeneAmp 5700). Neste sistema, a amplificação da sequência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluoróforo que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação foi obtida pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho. O agente emissor de fluorescência usado foi o SYBR Green. Neste sistema não existe sonda, e o fluoróforo se encontra no tampão do PCR. Em cada fase de anelamento, o fluoróforo se intercala na dupla fita, liberando a fluorescência que é proporcional ao número de cópias.

3.10 Quantificação de proteínas por western blot

O tecido foi homogeneizado em solução Tris-HCL 25 mM contendo inibidores de protease. Após dosagem pelo método de Bradford, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida. As proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas para membrana, que foram coradas com Ponceau (0,1%). As membranas foram bloqueadas em uma solução de albumina 3% em PBS (Na_2HPO_4 0,08 M, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 50 mM e 0,1% de Tween 20) antes de serem incubadas com anticorpo primário por 12-14 horas (4°C) em PBS contendo leite 5%. Após lavagens em TTBS (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 50 mM, Tween 20 0,1%), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário marcado com peroxidase em TTBS contendo leite 5%, por 2 horas a temperatura ambiente. A revelação foi feita em câmara escura utilizando o kit ECL (1:1, Amersham).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via (SNEDECOR et al., 1946) associada ao teste de Tukey (SOKAL; ROHLF, 1981), ou de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização experimentos de ação antinociceptiva do CBX e da quinina

A partir de experimentos piloto com animais submetidos à hiperalgesia induzida por carragenina, foi possível obter medidas comportamentais em diferentes tempos após a injeção intratecal com CBX e com quinina.

Neste ensaio, foi inicialmente determinada a medida do limiar nociceptivo basal (antes de qualquer tratamento) dos ratos. Os animais foram então injetados com carragenina e 30 minutos depois foram divididos em 3 grupos para a realização das injeções intratecais - 25 µg de CBX ou quinina diluídos em 10 µL de PBS, ou PBS 10 µL (grupo controle). A dose de 25 µg foi escolhida baseada em dados de literatura (ROH, 2010). Transcorridos 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com os bloqueadores de JCs, os animais foram novamente avaliados no teste de pressão da pata. Os resultados apresentados na Figura 2, mostram que a carragenina acarretou diminuição do limiar nociceptivo, em comparação com a medida basal, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia. Este fenômeno foi observado por pelo menos até a 4ª hora após o tratamento. O tratamento com CBX ou quinina reverteu o efeito hiperalgésico da carragenina até a 3 h após os tratamentos (Fig. 2). Estes dados indicam o envolvimento das conexinas no fenômeno nociceptivo causado pela carragenina.

Figura 2 - Padronização do udo do efeito do tratamento como bloqueadores de junções comunicantes sobre a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). As medidas foram realizadas antes (tempo 0), e 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução de tampão fosfato salina (PBS). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial (tempo 0), ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, # $p < 0,05$ por comparação com a medida obtida para a quinina.

Ainda, nesses estudos pilotos foi possível observar que animais tratados somente com o bloqueador não apresentaram alteração do limiar nociceptivo, em comparação com os valores basais obtidos antes de qualquer tratamento (figura 8).

5.2 Curva dose-resposta para os bloqueadores de Junções Comunicantes

Baseados nos dados iniciais, completamos o estudo da curva dose-resposta para os inibidores das conexinas. Neste ensaio, os bloqueadores de junções comunicantes CBX e Quinina foram administrados i.t., em diferentes doses, 2 horas após a injeção intraplantar de carragenina. O tempo de 2 horas foi escolhido para permitir a manipulação da totalidade de animais em cada experimento, levando-se em consideração o pico de ação da carragenina. As mediadas no teste de pressão de pata foram realizadas antes e 2 e 2,5 h após a injeção de carragenina. Os grupos de animais foram divididos de acordo com o esquema descrito a seguir:

1) Tratamento com CBX

Grupo 1: Carragenina (i.pl) + CBX 2 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 2: Carragenina (i.pl) + CBX 5 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 3: Carragenina (i.pl) + CBX 10 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 4: Carragenina (i.pl) + CBX 15 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 5: Carragenina (i.pl) + CBX 20 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos)

Grupo 6: Carragenina (i.pl) + CBX 25 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos),

Grupo 7: Carragenina (i.pl) + CBX 50 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos)

Grupo 8: Carragenina (i.pl) + PBS (i.t.) (12 ratos)

Grupo 9: Salina (i.pl)+ CBX 50 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos)

Grupo 10: Salina (i.pl) + PBS (i.t.) (6 ratos)

Observação: Experimento realizado em duas etapas, uma vez que não é possível fazer medidas de nocicepção em um único experimento, com n superior a 35 animais.

2) Tratamento com Quinina

Grupo 1: Carragenina (i.pl) + Quinina 2 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 2: Carragenina (i.pl) + Quinina 5 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 3: Carragenina (i.pl) + Quinina 10 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 4: Carragenina (i.pl) + Quinina 15 μ g / μ L (i.t.) (6 ratos)

Grupo 5: Carragenina (i.pl) + Quinina 20 μ g / μ L (i.t.)6 ratos)

Grupo 6: Carragenina (i.pl) + Quinina 25 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos),

Grupo 7: Carragenina (i.pl) + Quinina 50 μ g / μ L (i.t.)6 ratos)

Grupo 8: Carragenina (i.pl) + PBS (i.t.) (12 ratos)

Grupo 9: Salina (i.pl)+ Quinina 50 μ g / μ L (i.t.) 6 ratos)

Grupo 10: Salina (i.pl) + PBS (i.t.) (6 ratos)

Observação: Experimento realizado em duas etapas, uma vez que não é possível fazer medidas de nocicepção em um único experimento, com n superior a 35 animais.

Os resultados mostraram que, novamente, a administração intraplantar de carragenina acarretou diminuição significativa do limiar de dor, em comparação com a medida basal, caracterizando o fenômeno de hiperalgesia (Figuras 3 e 4). A administração i.t. de CBX (Fig. 3) ou Quinina (Fig. 4) reverteu, significativamente e de forma dose-dependente, a hiperalgesia induzida pela carragenina.

Figura 3 - Efeito do CBX sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). As medidas foram realizadas antes (tempo 0 indicado como medida basal tracejada), e 30 minutos após a injeção intratecal de bloqueador (tempo que corresponde a 2,5 horas após a injeção intraplantar de carragenina). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução de tampão fosfato salina (PBS). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida obtida dos controles; ** $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0); # $p < 0,05$ por comparação com a medida na qual foi obtida o efeito máximo.

Figura 4 - Efeito da Quinina sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). As medidas foram realizadas antes (tempo 0 indicado como medida basal tracejada), e 30 minutos após a injeção intratecal de bloqueador (tempo que corresponde a 2,5 horas após a injeção intraplantar de carragenina). O grupo controle foi composto por animais injetados com solução de tampão fosfato salina (PBS). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida obtida dos controles; ** $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0).

5.3 Efeito dos bloqueadores de JCs sobre a atividade motora dos animais

Neste ensaio, foi avaliado o possível efeito dos bloqueadores sobre a atividade locomotora dos ratos, avaliada no campo aberto. Para este estudo, foram utilizadas as maiores doses (15, 25 e 50 µg/Kg) de CBX e quinina, utilizadas nos ensaios anteriores. Os resultados mostram que ambos os bloqueadores, nessas doses, não interferiram com a frequência de levantamento e de locomoção (Figuras 5 e 6) dos animais, indicando que o efeito antinociceptivo observado para o CBX e a quinina não é decorrente de alterações na atividade motora dos ratos.

Figura 5 - Efeito do tratamento com CBX sobre atividade geral dos ratos.

A

B

As frequências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação. O grupo controle foi composto por animais que foram injetados com PBS nas mesmas condições experimentais. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

Figura 6 - Efeito do tratamento com quinina sobre atividade geral dos ratos.

A

B

As frequências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação. O grupo controle foi composto por animais que foram injetados com PBS nas mesmas condições experimentais. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

5.4 Coleta de material para Imunofluorescencia

A partir dos resultados obtidos, mostrando que não há diferença na intensidade do efeito dos inibidores, a partir da dose de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, os experimentos subsequentes foram realizados com essa dose. Como mencionado anteriormente, até o momento, os tecidos foram coletados e preparados para a análise, a qual será realizada na próxima fase de desenvolvimento desse projeto. Neste ensaio foi determinada a medida basal no teste de pressão de pata. Os animais receberam, então, carragenina por via intraplantar e, duas horas depois, foi realizada uma nova medida no analgesímetro. Na sequência, os bloqueadores foram administrados por via intratecal e meia hora depois foi avaliada a presença de hiperalgesia (Fig. 7). Os animais foram então eutanasiados, para a coleta dos tecidos. Os tecidos foram preparados para marcação de conexina 36 e conexina 43. Os respectivos grupos foram distribuídos de acordo com o esquema descrito abaixo:

Imunohistoquímica Conexina 36 (Cx36)

Grupo 1: Salina (i.pl) + PBS (i.t.) (3 ratos)

Grupo 2: Carragenina (i.pl) + PBS (i.t.) (3 ratos)

Grupo 3: Carragenina (i.pl) + Quinina (i.t.) (3 ratos)

Grupo 4: Carragenina (i.pl) + CBX (i.t.) (3 ratos)

Grupo 5: Naive (3 ratos)

Imunohistoquímica Conexina 43 (Cx43)

Grupo 1: Salina (i.pl) + PBS (i.t.) (3 ratos)

Grupo 2: Carragenina (i.pl) + PBS (i.t.) (3 ratos)

Grupo 3: Carragenina (i.pl) + Quinina (i.t.) (3 ratos)

Grupo 4: Carragenina (i.pl) + CBX (i.t.) (3 ratos)

Grupo 5: Naive (3 ratos)

Figura 7 - Efeito do tratamento com CBX e quinina sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). As medidas foram realizadas antes (tempo 0) e 2 horas após a injeção intraplantar de carragenina, e 30 minutos após a injeção intratecal de bloqueador (tempo que corresponde a 2,5 horas após a injeção intraplantar de carragenina). A seta indica o momento no qual os animais foram injetados por via intratecal. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução de tampão fosfato salina (PBS). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0); ** $p < 0,05$ por comparação com a medida obtida dos controles.

5.5 Avaliação do efeito dos bloqueadores, per se, no limiar nociceptivo dos animais

Nesta fase de desenvolvimento do projeto, foi também avaliado o efeito da administração intratecal de bloqueadores de JCs (CBX e quinina, 20 µg) per se, sobre o limiar de resposta dos animais ao estímulo nociceptivo mecânico (teste de pressão de pata), na ausência de sensibilização por carragenina. Neste estudo, solução salina foi injetada por via i.pl., nas mesmas condições experimentais utilizadas para a carragenina. A administração destes bloqueadores não acarretou alterações significativas no limiar de resposta dos animais, em ambos os testes (Figura 8), durante todo o período de observação.

Figura 8 - Avaliação do efeito do tratamento com CBX e quinina, per se, sobre o limiar nociceptivo dos animais.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata. As medidas foram realizadas antes (tempo 0), e 2 horas após a injeção intraplantar de salina (100 µL) e 30 minutos após a injeção intratecal dos bloqueadores (tempo que corresponde a 2,5 horas após a injeção intraplantar de salina). A seta indica o momento no qual os animais foram injetados por via intratecal. O grupo controle foi composto por animais injetados com solução de tampão fosfato salina (PBS). Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0); ** $p < 0,05$ por comparação com a medida obtida nos animais controles.

5.6 Efeito dos oligonucleotídeos antisense sobre a atividade motora dos animais

No projeto de pesquisa, para confirmar o papel das conexinas na gênese da hiperalgesia induzida por carragenina, foram utilizados os oligonucleotídeos antisense para Cx36 e Cx43. Uma vez obtidos os antisenses, avaliamos inicialmente se a injeção intratecal de 10, 15 e 50 $\mu\text{g/Kg}$ dos antisenses (em 10 μL de solução), por 5 dias, interferiria com a atividade locomotora dos animais, avaliada no campo aberto. Os resultados mostraram que ambos os oligonucleotídeos, nessas doses, não interferiram com a frequência de levantamento e de locomoção (Figuras 9 e 10) dos animais.

5.7 Efeito dos oligonucleotídeos antisense sobre a hiperalgesia

Neste ensaio foi determinada a medida basal no teste de pressão de pata. Os animais receberam, então, os ODN's administrados por via intratecal. Antes da administração os ODNs-AS foram liofilizados e reconstituídos em solução NaCl 0,9% livre de nuclease à concentração 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os ODNs-AS ou os mismatches foram administrados por via intratecal (30 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos, e logo após a última injeção, foi realizada uma nova medida no analgesímetro. Na sequência, a carragenina foi administrada segundo especificações dos outros testes e 2 horas depois foi avaliada a presença de hiperalgesia (Fig. 11 e 12). Os animais foram então eutanasiados, para a coleta dos tecidos.

Figura 9 - Efeito do tratamento com oligonucleotídeos antisense para Cx43 sobre atividade geral dos ratos.

A

B

As frequências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação. Os oligonucleotídeos foram administrados por via intratecal, durante 4 dias e o teste do Campo Aberto realizado 2 horas após a última dose. O grupo controle foi composto por animais que foram injetados com PBS nas mesmas condições experimentais. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo.

Figura 10 - Efeito do tratamento com oligonucleotídeos antisense para Cx36 sobre atividade geral dos ratos.

A

B

As frequências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação. Os oligonucleotídeos foram administrados por via intratecal, durante 4 dias e o teste do Campo Aberto realizado 2 horas após a última dose. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo.

Figura 11 - Efeito do tratamento com oligonucleotídeos antisense para Cx43 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). Os oligonucleotídeos foram administrados por via intratecal, durante 4 dias e o teste de hiperalgesia foi realizado antes do início das injeções, logo após a última injeção e no pico de ação da carragenina. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0).

Figura 12 - Efeito do tratamento com oligonucleotídeos antisense para Cx36 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata (eixo das abscissas). Os oligonucleotídeos foram administrados por via intratecal, durante 4 dias e o teste de hiperalgesia foi realizado antes do início das injeções, logo após a última injeção e no pico de ação da carragenina. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida basal (tempo 0).

5.8 Imunofluorescência

Neste ensaio, os bloqueadores de junções comunicantes CBX e Quinina foram administrados por via i.t., em dose determinada pelas curvas para cada bloqueador (20 $\mu\text{g/Kg}$), 2 horas após a injeção intraplantar de carragenina. Os animais foram divididos em grupos para análise da expressão proteica de Cx36 e Cx43, antes e em diferentes tempos após a administração de carragenina. Nesta fase de desenvolvimento do projeto, foi coletado o material para análise. Este material foi obtido de animais pré-tratados por via i.pl., com carragenina. Antes de cada coleta, foi realizada a determinação da instalação do fenômeno de hiperalgesia, pelo teste de pressão da pata.

Os animais foram eutanasiados por dose alta de anestésico e os gânglios da raiz dorsal (DRG, L4-L6) foram removidos. Para tanto, foi realizada uma incisão no dorso do animal, a

camada muscular foi retirada e a medula espinhal exposta após a retirada das vértebras. Os gânglios foram coletados (ipsilateral e contralateral à injúria) juntamente com a medula e imediatamente congelados em gelo seco. Foram feitos cortes transversais de 10 µm em criostato e os cortes obtidos foram colocados em lâminas gelatinizadas.

Para avaliar se a modulação da marcação de Cxs ocorre em células da glia e/ou subgrupos específicos de neurônios, alguns estudos de dupla marcação também foram realizados. Anticorpos contra GFAP (marcador para astrócitos) foram utilizados em ensaios de imunofluorescência para a análise em microscopia confocal. Os anticorpos primários foram diluídos em 0,5% Triton X-100 em PB e a incubação foi feita por 12-24 horas a 4 °C. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpos secundários conjugados com fluoresceína isotiocianato (FITC) ou tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC, Jackson Lab.) contra as IgG das espécies onde os anticorpos primários foram produzidos, diluídos 1:100-1:200 em PB com Triton X-100 por 1-2 horas em temperatura ambiente. Controles para especificidade de marcação incluíram: (1) omissão dos anticorpos primários; (2) pré-adsorção com o peptídeo imunogênico usado para a produção do anticorpo. A marcação é considerada específica se abolida nessas condições. Em estudos prévios, a especificidade para os anticorpos contra Cx36 e Cx43 já foi determinada nos respectivos camundongos knock-out. Após este período, a fluorescência será detectada em microscópio óptico com filtro para rodamina (ZEISS), com objetiva de 20x, acoplada a uma câmera digital.

A marcação para conexina 36 foi virtualmente inexistente em todos os grupos (figuras 13 a 17), motivo pelo qual o anticorpo foi testado para outros tecidos mostrando sua capacidade de reconhecer o epítipo correspondente na proteína (marcações positivas). No caso particular da proteína conexina 43, a marcação foi conspícua em todos os grupos (figuras 18 a 22), porém com uma distribuição pouco uniforme ao longo da extensão do gânglio. Estes dados só permitem elucidar a presença da conexina 43 no gânglio da raiz dorsal, mas a sua modulação durante o processo de hiperalgesia inflamatória foi obtida com os estudos de expressão gênica e quantificação de níveis proteicos.

Figura 13 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de solução salina e injeção i.t. de PBS.

A marcação em verde (NT) foi realizada com NeuroTrace para corpos neuronais e em vermelho com anticorpo para conexina 36.

Figura 14 - Microfotografia de corte de DRG de animal Naive.

A marcação em verde (NT) foi realizada com NeuroTrace para corpos neuronais e em vermelho (Cx36) com anticorpo para conexina 36.

Figura 15 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de PBS.

A marcação em verde (NT) foi realizada com NeuroTrace para corpos neuronais e em vermelho com anticorpo para conexina 36.

Figura 16 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de quinina

A marcação em verde (NT) foi realizada com NeuroTrace para corpos neuronais e em vermelho com anticorpo para conexina 36.

Figura 17 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de CBX.

A marcação em verde (NT) foi realizada com NeuroTrace para corpos neuronais e em vermelho com anticorpo para conexina 36.

Figura 18 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de solução salina e injeção i.t. de PBS.

A marcação em vermelho (GFAP) foi realizada com anticorpo para proteína gliar fibrilar ácida que permite identificar células satélites e em verde com anticorpo para conexina 43.

Figura 19 - Microfotografia de corte de DRG de animal Naive.

A marcação em vermelho (GFAP) foi realizada com anticorpo para proteína gliar fibrilar ácida que permite identificar células satélites e em verde com anticorpo para conexina 43.

Figura 20 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de PBS.

A marcação em vermelho (GFAP) foi realizada com anticorpo para proteína gliar fibrilar ácida que permite identificar células satélites e em verde com anticorpo para conexina 43.

Figura 21 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de quinina.

A marcação em vermelho (GFAP) foi realizada com anticorpo para proteína gliar fibrilar ácida que permite identificar células satélites e em verde com anticorpo para conexina 43.

Figura 22 - Microfotografia de corte de DRG após injeção i.p de carragenina e injeção i.t. de CBX

A marcação em vermelho (GFAP) foi realizada com anticorpo para proteína gliar fibrilar ácida que permite identificar células satélites e em verde com anticorpo para conexina 43.

5.9 Expressão Gênica de Cx 36 e Cx43 no Gânglio da Raiz Dorsal

Durante fases preliminares de trabalho no laboratório de Neurobiologia Celular iniciamos o estudo dos genes que codificam as Cxs no genoma do coelho. Neste período, por meio de programas e análises computacionais, determinamos primers específicos para diversas Cxs que foram utilizados em nossos estudos. Os primers que foram utilizados para Cx36 e Cx43 são provenientes de *Rattus norvegicus*.

Desta forma foram utilizados para conexina 36 (Código GenBank NM019281) os primers:

Up: 5'-CTGCAGCCCCGGCTGTAA-3' 58°C

Down: 5'-AGTAACGTATATGGGAGATGGGAAA-3' 58°C (tamanho do Amplicon 64 bp)

Por outro lado, para conexinas 43 (Código GenBank AY576039) foram utilizados os primers:

Up: 5'-GCCATCCAAGGACCCTCAT-3' 58°C

Down: 5'-ACCGAGATCTTGGCCATCTG-3' 59°C (tamanho do Amplicon 69 bp)

Na representação gráfica do PCR em tempo real o ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de CT (*cycle threshold*) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o CT, teoricamente maior é a expressão de determinado gene. A conexina 36 apresentou valores muito altos de CT sem diferenças significativas em nenhum dos tratamentos com relação ao grupo Naive (Figura 23). Da mesma forma, nos experimentos com ODNs antisense, os valores de CT mostraram valores muito altos que permitem inferir uma expressão de conexina 36 virtualmente ausente no gânglio da raiz Dorsal (Figura 24).

Nossos resultados indicaram que a conexina 43 não teve regulação com a injeção de bloqueadores, e a expressão relativa de mRNA com relação ao grupo Naive não apresentou diferenças significativas (Figura 25). OS grupos que receberam ODNs Antisenses para Cx43 apresentaram níveis mais baixos de mRNA em comparação com animais Naive e animais que receberam Mismatch (Figura 26) Em todos os experimentos, a expressão gênica de GAPDH foi utilizada como controle interno.

Figura 23 - Expressão gênica de Cx36 em DRG de animais injetados com bloqueadores de junções comunicantes.

Os resultados foram analisados e expressos como a média e desvio standard para n=5. A figura mostra a comparação de níveis de expressão de Cx36 pela quantidade de ciclos (CT). A expressão gênica de Cx36 foi virtualmente ausente tanto no grupo Naive (N) quanto nos diferentes tratamentos.

Figura 24 - Expressão gênica de Cx36 em DRG de animais injetados com ODNs antisense para Cx36.

Os resultados foram analisados e expressos como a média e desvio standard para n=10. A figura mostra a comparação de níveis de expressão de Cx36 pela quantidade de ciclos (CT). A expressão gênica de Cx36 foi virtualmente ausente tanto no grupo Naive (N) quanto nos diferentes tratamentos.

Figura 25 - Expressão gênica de Cx43 em DRG de animais injetados com bloqueadores de junções comunicantes.

Os resultados foram analisados e expressos de forma relativa com respeito à média obtida para o grupo Naive com a média e desvio standard para $n=5$. A expressão gênica de Cx43 não apresentou regulação significativa entre os grupos que receberam veículo ou bloqueadores (quinina e CBX) e os animais Naive.

Figura 26 - Expressão gênica de Cx43 em DRG de animais injetados com ODNs antisense para Cx43

Os resultados foram analisados e expressos de forma relativa com respeito à média obtida para o grupo Naive. A expressão gênica de Cx43 apresentou regulação significativa nos grupos que receberam ODNs antisense. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a média do grupo Naive.

5.10 Quantificação dos níveis proteicos de Cx 36 e Cx43 no Gânglio da Raiz Dorsal

Para a caracterização dos níveis proteicos das conexinas estudadas foram realizados Western Blots a partir de homogenatos de Gânglios. Análises de densitometria óptica das bandas de experimentos preliminares diferentes revelaram ausência da Cx36 nos Gânglios das Raízes Dorsais tanto de animais naïve quanto de animais que receberam bloqueadores ou ODNs antisense. Este resultado foi verificado posteriormente com a análise densitométrica de bandas provenientes da extração proteica de retinas de animais naïve como controles positivos da presença de Cx36 em ratos adultos (Figura 27 e 28). Por outro lado, as análises realizadas para Cx43 mostraram que não houve diferença significativa entre os níveis proteicos de animais naïve e animais que receberam injeções com bloqueadores de junções comunicantes (Figura 29). Já os níveis proteicos dos animais que receberam ODNs Antisenses para Cx43 apresentaram diferença significativa com relação aos animais naïve e àqueles que receberam as sequências mismatch (Figura 30) permitindo verificar a eficácia do tratamento e complementando os resultados obtidos a partir das análises obtidas dos experimentos para expressão gênica de conexina 43. Em todos os experimentos de western blot, os resultados foram expressos como a relação entre as densidades ópticas da conexina em questão e a banda correspondente na marcação com Ponceau S.

Figura 27 - Análise semi-quantitativa dos níveis proteicos de Cx36 em DRGs de animais injetados com bloqueadores de junções comunicantes

Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica relativa das bandas obtidas com relação às geradas pelo Ponceau S. As bandas provenientes de DRG foram virtualmente ausentes em todos os grupos. Como controle positivo foram usadas retinas de animais naive (n=5).

Figura 28 - Análise semi-quantitativa dos níveis proteicos de Cx36 em DRGs de animais injetados com ODNs antisense para Cx36

Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica relativa das bandas obtidas com relação às geradas pelo Ponceau S. As bandas provenientes de DRG foram virtualmente ausentes em todos os grupos. Como controle positivo foram usadas retinas de animais naïve (n=10).

Figura 29 - Análise semi-quantitativa dos níveis proteicos de Cx43 em DRGs de animais injetados com bloqueadores de junções comunicantes

Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica relativa das bandas obtidas com relação às geradas pelo Ponceau S. Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Figura 30 - Análise semi-quantitativa dos níveis proteicos de Cx43 em DRGs de animais injetados com ODNs antisense para Cx43

Os dados plotados no gráfico indicam a densidade óptica relativa das bandas obtidas com relação às geradas pelo Ponceau S. Os resultados obtidos apresentaram diferença significativa entre os grupos que receberam os ODNs e os animais Naive. Os grupos que receberam os mismatch não apresentaram diferença significativa com respeito aos animais naïve. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

As junções comunicantes (JCs) são canais transmembrana especializados que permitem uma sinalização elétrica rápida e a comunicação intercelular direta. Os canais de JCs são formados por hemicanais denominados conexônio, os quais são formados por unidades proteicas denominadas conexinas. No sistema nervoso, as JCs medeiam o acoplamento celular entre células gliais e entre neurônios e dados de literatura têm mostrado que elas contribuem para os mecanismos inflamatórios e também para os processos de dor; contudo os mecanismos pelos quais as JCs contribuem para esses processos são ainda pouco caracterizados. Assim, no presente trabalho de pesquisa, é nosso objetivo avaliar o papel desses canais, mais especificamente, das proteínas conexinas 36 e 43 que formam esses canais, em processo de dor inflamatório.

Neste estudo, foi escolhido o modelo de hiperalgesia inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina em ratos. Esse é um modelo bastante utilizado em estudos de dor inflamatória e os mediadores químicos envolvidos na sua gênese estão bem caracterizados. Para avaliar o envolvimento das conexinas nesse fenômeno, utilizamos bloqueadores que (1) têm eficácia de amplo espectro em canais JCs formado por diferentes Cx, como o carbenoxolone (HUANG et al., 2010; KIHARA et al., 2009), ou (2) que agem em Cx específicos, sem grandes efeitos sobre outros JCs ou canais de membrana (quinina que bloqueia canais formados por Cx36 como reportado por Srinivas et al. em 2001). O efeito desses bloqueadores sobre apoptose e propagação de ondas de cálcio foi determinado em estudos anteriores (CUSATO et al., 2003; HANSEN et al., 2005; SINGER et al., 2001).

Os nossos resultados mostraram que as conexinas são importantes para a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina, uma vez que os bloqueadores utilizados foram eficazes em reverter o processo. Cabe ressaltar que as doses presentemente utilizadas estiveram baseadas em dados de literatura e em padronizações realizadas em estudos preliminares.

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa foi utilizado o teste de pressão da pata de rato. Este teste emprega um estímulo mecânico (pressão em gramas), aplicado sobre a pata dos animais, e evoca resposta motora, traduzida pela retirada da pata. Dessa forma, como estudo complementar, foi realizada a avaliação da atividade locomotora dos animais no campo aberto, com o objetivo de determinar se as respostas obtidas no teste de retirada de pata não seriam decorrentes de ação dos bloqueadores das JCs e dos antisenses sobre essa atividade. Os dados obtidos, mostrando que essas substâncias não alteraram a atividade de

locomoção e levantar dos animais, sugerem que nas nossas condições experimentais, o efeito antinociceptivo observado não é decorrente de alterações na atividade locomotora dos ratos.

Como mencionado na Introdução, a hiperalgesia acarretada pela carragenina é um processo multimediado, envolvendo ativação direta e também sensibilização neuronal. Algumas das substâncias liberadas durante a inflamação induzida por carragenina são caracteristicamente passíveis de serem transportadas via junções comunicantes, e, portanto, é possível sugerir que a sua ação em células alvo poderia ser alterada a partir do bloqueio farmacológico desses canais.

Hanani et al. em 2010, mostraram que após instalação de processos inflamatórios periféricos, o acoplamento entre SGCs é marcadamente aumentado, particularmente entre as SGCs que formam envelopes ao redor dos diferentes neurônios. No mesmo trabalho, é mostrado que esse acoplamento é inibido por bloqueadores de JCs e que o efeito parece confinado aos gânglios com projeções à região afetada pela inflamação. Têm sido observadas também alterações na ativação das células da glia (gliose) no sistema nervoso na vigência de lesão neuronal (PEKANY; NILSSON, 2005; RAIVICH et al., 1999). A expressão de filamentos intermediários, em particular de GFAP e vimentina é marcadamente aumentada em astrócitos após lesão neuronal, levando a glioses de SGCs (ELFVIN et al., 1987). Ainda, aumento de JCs pode ser parte da ativação das SGCs em gânglios sensoriais (HUANG et al., 2010). Dessa forma é importante entender a expressão gênica e proteica das conexinas 36 e 43 envolvidas nos processos de glioses. Os gânglios da raiz dorsal são elementos essenciais para a transmissão de sinais de origem periférica para o sistema nervoso central (FASANO; NIEL, 2009; KLIMASCHEWSKI et al., 1996; MCLACHLAN, 2003; SZURSZEWSKI; MILLER, 2006). Os neurônios dos gânglios da raiz dorsal estão individualmente envolvidos por uma camada de células satélites gliais (SGCs), as quais são diferentes das células de Schwann e compartilham muitas similaridades com os astrócitos. Em contraste com a grande quantidade de informação disponível sobre os neurônios, relativamente pouco é conhecido sobre as SGCs nos gânglios da raiz dorsal. Aparentemente, mudanças neuronais são acompanhadas por mudanças bioquímicas e morfológicas nas SGCs (HANANI, 2005; OHARA et al., 2009). Além disso, já está caracterizado o envolvimento dessas células na resposta a injúria neuronal (DE STEFANO et al., 2007; MATTHEWS; NELSON, 1975). O envolvimento dessas células no processo inflamatório acarretado pela carragenina, nas nossas condições experimentais foi melhor caracterizado neste projeto, com os estudos envolvendo marcação específica para conexinas e, de forma concomitante, com GFAP (proteína ácida fibrilar glial), que permitiu entender algumas mudanças morfológicas, histológicas e de expressão de conexinas neste

modelo. Na continuidade desse estudo, a obtenção de micrografias por imunofluorescência foi fundamental para o conhecimento das alterações que ocorrem nas SGCs e nos neurônios.

É importante salientar que a ação bloqueadora do carbenoxolone sobre junções comunicantes e hemicanais não é a única ação celular da substância. Entre os efeitos relatados na literatura estão a modulação das propriedades da membrana neuronal (CHEPKOVA et al., 2008) e a modulação de propriedade da transmissão sináptica (TOVAR et al., 2009). Além disso, o carbenoxolone modula canais de ânions em astrócitos (YE et al., 2009). Desta forma, não podemos excluir a possibilidade de que um ou mais destes outros efeitos do carbenoxolone tenham contribuído para o seu efeito de reversão da hipernocicepção. Cabe ressaltar ainda que Akiyoshi et al. (2007) evidenciaram que a quinina gera aumento, dependente da dose, no potencial de membrana a partir da modulação do fluxo de cálcio mediado por tipos específicos de canais de cálcio (efeito similar ao identificado para carbenoxolone por Bramley et al. em 2011).

A conexina 36 apresentou resultados indicando que o seu papel não deve ser contemplado nas células do gânglio da raiz dorsal. Sua marcação inconspícua nos cortes submetidos a imunofluorescência foi condizente com os resultados obtidos por Gulisano et al. (2000), quem encontrou uma expressão baixa em fases de desenvolvimento mas nenhuma expressão no estado adulto. Estes dados foram confirmados ao se estudarem a expressão gênica e a quantificação dos níveis proteicos. A diferença menos expressiva com respeito a diminuição de hiperalgesia no tratamento com quinina levanta hipóteses sobre o papel da conexina 50 ou de efeitos não relacionados com a conexina 36 advindos da injeção intratecal com quinina. O acoplamento entre neurônios, que foi o fator inicial que levou à escolha da conexina 36 está relatado na literatura para modelos crônicos e para modelos inflamatórios de mais de um dia (HANANI; CASPI; BELZER; 2010).

Por tais motivos, o uso de oligonucleotídeos se apresenta como uma alternativa plausível para avaliar/confirmar a participação das conexinas 43 e 36 no processo de hiperalgesia, uma vez que não existem inibidores/bloqueadores farmacológicos totalmente específicos, principalmente no que se refere aos canais de conexinas (Cxs). Assim, iniciamos nessa fase do projeto, a confecção de oligonucleotídeos para essas conexinas. Os estudos iniciais mostraram que esses oligonucleotídeos, nas nossas condições experimentais, não interferiram com a atividade locomotora dos animais e dados ainda preliminares indicam que a sua administração acarretou inibição do fenômeno de hiperalgesia, suportando os dados farmacológicos do envolvimento destas conexinas nesse fenômeno.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que:

- ✓ a carragenina induz diminuição, dose e tempo-dependente, do limiar nociceptivo em ratos;
- ✓ o efeito hiperalgésico da carragenina foi bloqueado pelo tratamento com carbenoxolone (nas doses 20-50 μ g) e significativamente inibido por quinina (nas doses 20-50 μ g), sugerindo uma participação das junções comunicantes (JC) nesse processo.;
- ✓ o efeito de reversão da hiperalgesia causada por bloqueadores de junções comunicantes não depende de efeitos sobre a atividade locomotora desses animais;
- ✓ a administração intratecal de oligonucleotídeos antisense contra conexinas 36 e 43 não afeta a locomoção dos animais nas doses utilizadas.
- ✓ a conexina 36 não participa de forma significativa no processo de hiperalgesia inflamatória nas células do gânglio da raiz dorsal
- ✓ a conexina 43 apresenta uma marcação conspícua no gânglio da raiz dorsal e tem um papel importante no processo de hiperalgesia inflamatória nas células do gânglio da raiz dorsal.

REFERÊNCIAS*

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIR, R. P.; HAYDON, P. G. Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosciences**, v. 22, p. 208-215, 1999.

CHARLES, A. Intercellular calcium waves in glia. **Glia**, v. 24, p. 39-49, 1998.

CONDORELLI, D. F.; BELLUARDO, N.; TROVATO-SALINARO, A.; MUDO, G. Expression of Cx36 in mammalian neurons. **Brain Res. Rev.**, v. 32, p. 72-85, 2000.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediators. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p. 1755-1760, 2005.

CUSATO, K.; BOSCO, A.; ROZENTAL, R.; GUIMARAES, C. A.; REESE, B. E.; LINDEN, R.; SPRAY, D. C. Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 6413-6422, 2003.

DAI, Y. et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 7737-7745, 2002.

DE STEFANO, M. E.; LEONE, L.; MORICONI, C.; DEL SIGNORE, A.; PETRUCCI, T. C.; PAGGI, P. Involvement of the plasminogen enzymatic cascade in the reaction to axotomy of rat sympathetic neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 36, p. 174-184, 2007.

DINA, O. A.; MCCARTER, G. C.; DE COUPADE, C.; LEVINE, J. D. Role of the sensory neurons in second messenger signaling for inflammatory pain. **Neuron**, v. 39, p. 613-624, 2003

DWORKIN, R. H.; CORBIN, A. E.; YOUNG, J. P. Pregabalin for the treatment of post-herpetic neuralgia. **Arch. Neurol.**, v. 60, p. 1524-1534, 2003.

ELFVIN, L. G.; BJÖRKLUND, H.; DAHL, D.; SEIGER, A. Neurofilament-like and glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivities in rat and guinea-pig sympathetic ganglia in situ and after perturbation. **Cell and Tissue Research**, v. 250, p. 79-86. 1987.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ELFVIN, L. G.; FORSMAN, C. The ultrastructure of junctions between satellite cells in mammalian sympathetic ganglia as revealed by freeze-etching. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 163, p. 261–274, 1978.

FASANO, C.; NIEL, J. P. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: models for the study of neuronal networks and basic neuronal properties. **Autonomic Neuroscience**, v. 150, p. 8–20, 2009.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORRÊA, F. M. A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 39, 1978.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227–1231, 1993.

GABELLA, G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. **Journal of Anatomy**, v. 111, p. 69–97, 1972.

GULISANO, M.; PARENTI, R.; SPINELLA, F.; CICIRATA, F. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. **Developmental Neurosciences**, v. 11, p. 3823–3828, 2000.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Research Reviews**, v. 48, p. 457–476, 2005.

HANANI, M.; HUANG, T. Y.; CHERKAS, P. S.; LEDDA, M.; PANNESE, E. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience**, v. 114, p. 279–283, 2002.

HANANI, M.; MAUDLEJ, N.; HÄRTIG, W. Morphology and intercellular communication in glial cells of the intrinsic ganglia of the guinea-pig urinary bladder. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 76, p. 62–67, 1999.

HANANI, M.; ZAMIR, O.; BALUK, P. Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled. **Brain Research**, v. 497, p. 245–249, 1989.

HANANI, M.; CASPI, A.; BELZER, V. Peripheral inflammation augments gap junction-mediated coupling among satellite glial cells in mouse sympathetic ganglia. **Neuron Glia Biol.**, v. 6, p. 85–89, 2010.

HERR, J. C. Reflexive gap junctions. Gap junctions between processing arising from the same ovarian decidual cell. **Journal of Cell Biology**, v. 69, p. 495–501, 1976.

HUANG, T.Y.; BELZER, V.; HANANI, M. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. **European Journal of Pain**, v. 14, p. 49–57, 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural Science**. 3rd ed. New York: Elsevier Science Publishers B. V., 1991.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth**, v. 87, p. 3-11, 2001.

KIHARA, A. H.; SANTOS, T. O.; OSUNA-MELO, E.; PASCHON, V.; VIDAL, K. S.; AKAMINE, P. S.; CASTRO, L. M.; RESENDE, R. R.; HAMASSAKI-BRITTO, D. E.; BRITTO, L. R. G. Connexin-mediated communication controls cell proliferation and is essential in retinal histogenesis. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, p. 187-203, 2009.

KLIMASCHEWSKI, L.; KUMMER, W.; HEYM, C. Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. **Microscopy Research and Technique**, v.35, p. 44–68, 1996.

LOEWENSTEIN, W. R. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. **Physiol. Rev.**, v. 61, p. 829-913, 1981.

LORENZETTI, B. B. et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 13, p. 456-461, 2002.

MATTHEWS, M. R.; NELSON, V. H. Detachment of structurally intact nerve endings from chromatolytic neurones of rat superior cervical ganglion during the depression of synaptic transmission induced by post-ganglionic axotomy. **Journal of Physiology**, v. 245, p. 91–135, 1975.

MCLACHLAN, E. M. Transmission of signals through sympathetic ganglia – modulation, integration or simply distribution? **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, p. 227–235, 2003.

MEIER, N.; GULDENAGEL, M.; SOHL, G.; SIEGMUND, H.; WIELLECKE, K.; DRAGUHN, A. Reduction of high frequency network oscillations (tripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice. **J. Physiol.**, v. 541, p. 521-528. 2002.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol**, v. 66, p. 355-474, 2002.

NEWMAN, E. A. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 2215-2223. 2001.

OHARA, P. T.; VIT, J. P.; BHARGAVA, A.; ROMERO, M.; SUNDBERG, C.; CHARLES, A. C. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. **Neuroscientist**, v. 15, p. 450–463, 2009.

PEKKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, p. 427–434, 2005.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue **Arch. Inst. Pharmacodyn.**, v. 111, p. 209-219, 1957.

RAIVICH, G.; BOHATSCH, M.; KLOSS, C. U.; WERNER, A.; JONES, L. L.; KREUTZBERG, G. W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Research Brain Research Reviews**, v. 30, p. 77–105, 1999.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain Suppl.**, v. 6, p. S103-109, 1999.

ROH, D. H.; YOON, S. Y.; SEO, H. S.; KANG, S. Y.; HAN, H. J.; BEITZ, A. J., LEE J. H. Intrathecal injection of carbenoxolone, a gap junction decoupler, attenuates the induction of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Exp. Neurol.**, v. 224, p. 123–132, 2010.

SAEZ, J. C.; SCHALPER, K. A.; RETAMAL, M. A.; ORELLANA, J. A.; SHOJI, K. F.; BENNETT, M. V. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. **Exp. Cell Res.**, v. 316, p. 2377–2389, 2010.

SRINIVAS, M.; MATTHEW, G.; HOPPERSTAD, A.; SPRAY, D. Quinine blocks specific gap junctions. **PNAS**, v. 19, p. 10942–10947, 2001.

SZURSZEWSKI, J. H.; MILLER, S. M. **Physiology of prevertebral ganglia**. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. 4th ed. New York: Raven, 2006. p. 603–628.

UNWIN, P. N.; ZAMPIGHI, G. Structure of the junction between communicating cells. **Nature**, v. 283, p. 545-549, 1980.

VERKHRATSKY, A.; ORKAND, R. K.; KETTENMANN, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 99-141, 1998.

WU, A.; GREEN, C.; RUPENTHAL, I.; MOALEM-TAYLOR, G. Role of Gap Junctions in Chronic Pain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, p. 337–345, 2012.