



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO



LAIS REGINA ROSSI

Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética.

São Paulo

2018

LAIS REGINA ROSSI

Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas

São Paulo

2018

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Rossi, Lais Regina.

Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética/Lais Regina Rossi ; orientador Guilherme Araújo Lucas. – São Paulo, 2018.

Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, 2018.

1. Neuralgia pós herpética 2. Dor neuropática 3. Vírus HSV-1 4. MAPK 5. CREB . Lucas, Guilherme de Araújo. Título: Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética.

Folha de aprovação

Lais Regina Rossi

Título: Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 11/01/2018

Banca Examinadora

Prof. Dra. Eliane Comoli

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Gelson Genaro

Instituição: Centro Universitário Barão de Mauá

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali

Instituição: Departamento de Ciências Fisiológicas/Universidade Estadual de Maringá

Julgamento: _____ Assinatura: _____

ROSSI, L.R. Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética. Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:11/01/2018

Banca Examinadora

Prof. Dra. Eliane Comoli

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Gelson Genaro

Instituição: Centro Universitário Barão de Mauá

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali

Instituição: Departamento de Ciências Fisiológicas/Universidade Estadual de Maringá

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais Roseli e Luis Carlos Rossi pelo incentivo e incansável apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

A essa conquista dedico unicamente a vocês com todo meu amor e gratidão por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida! Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, concedendo sabedoria para aqueles momentos mais difíceis e incertos.

Ao professor Dr. Guilherme de Araújo Lucas, pela oportunidade da realização do mestrado.

A professora Dr. Maria Inês Nogueira pela contribuição durante o mestrado.

À Sonia Aparecida Zanon, por todos os ensinamentos técnicos e disponibilidade na condução desse trabalho não me deixando esmorecer.

À Flaviane, pela importante colaboração nesse projeto de mestrado.

À minha família, principalmente meus pais Luis Carlos e Roseli pelo apoio e amor incondicional cedido em toda minha trajetória.

À meus irmãos Glaciele Aparecida Rossi Ferreira e Erick Aparecido Ferreira por acreditar em mim me incentivando sempre através da parceria.

Ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao prof. Dr. Eurico Arruda, por ceder material viral utilizado neste trabalho.

Aos animais. Que suas vidas sejam justificadas pelos frutos deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa GPFIS da UNESP – Presidente Prudente em especial a Prf.Dra Patricia Monteiro Seraphim e Rafael Junges Moreira pelos ensinamentos, amizade e incentivo transmitidos durante a minha iniciação científica.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

ROSSI, L.R. **Sensibilização central induzida pelo vírus HSV-1: uma análise de mecanismos de dor crônica em modelo experimental de neuralgia pós-herpética.** 2018. 65 f. Dissertação - Faculdade de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A dor é descrita como uma sensação sensorial e emocional desagradável de extrema importância para sobrevivência e integridade do organismo. As dores crônicas de origem neuropática são de difícil tratamento e seus mecanismos fisiopatológicos pouco conhecidos. Este estudo foi realizado após inoculação do vírus HSV-1 na pata traseira esquerda de camundongos machos da linhagem Balb/C, e teve como objetivo investigar comportamentalmente o desenvolvimento de alodínia mecânica e hipernocicepção nas fases herpética e pós herpética, caracterizar a atividade de vias intracelulares de sinalização das proteínas JNK, AKT CREB, P38, ERK, Glutamina Sintetase e Stat 3, através de western blot na coluna dorsal da medula espinal nas fases herpética e pós herpética, além de verificar a presença do vírus HSV-1 na medula espinal e gânglio dos animais por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Os resultados evidenciaram alteração de sensibilidade nos animais a partir do 7º dia que permaneceu até o 28º dia após a inoculação do vírus. Houve uma mudança na expressão das proteínas MAPKs, com aumento na expressão de JNK, AKT e CREB no corno dorsal da medula no 8º e 21º dia após a inoculação do vírus HSV-1, aumento na expressão de P 38 e P ERK no 8º dia após inoculação do vírus e uma diminuição na expressão da proteína Stat 3 no 8º e 21º dia após a inoculação do vírus, sugerindo assim a participação dessas proteínas na alteração de sensibilidade tanto no período herpético quanto pós herpético. Também ocorreu um aumento na amplificação do DNA viral HSV-1 na medula espinal e gânglio espinal esquerdo no período herpético após inoculação do vírus HSV-1.

Palavras chaves: Neuralgia pós herpética; dor neuropática, vírus HSV-1, MAPK, CREB.

ABSTRACT

ROSSI, L.R. **Central sensibilization inducted by HSV-1 virus: an analysis of chronic pain mechanisms in experimental model of post herpetic neuralgia.** 2018, 65 f. Dissertation – Psychology College, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The pain is described as a sensorial and emotional unpleasant sensation of extreme importance for survival and integrity of the organism. The chronic pains that has neuropathic source are hard to treat and its physiopathologic mechanisms not well known. This study was performed after inoculation of the virus HSV-1 in the left back foot of male Balb/C mouse, and had as main objectives to behaviorally investigate the development of mechanical allodynia and hyper nociception during the herpetic and post-herpetic phase, characterize the activity of the intracellular signalization paths of the proteins JNK, AKT CRB, P38, ERK, glutamine synthetase and Sat 3 during herpetic and post-herpetic phase using Western Blot, besides checking as well for the presence of HSV-1 viral load in the spinal cord and ganglions using RT-PCR.

The results evidenced alteration of sensitivity in the animals from the 7th day that remained until the 28th day after inoculation of the virus, a change in the MAPK's proteins expression, with a raise of expression of JNK, AKT e CREB in the dorsal horn of the spinal cord in the 8th and 21st day after the HSV-1 virus inoculation, thus suggesting the participation of these proteins in the alteration of sensitivity both in the herpetic and post herpetic periods. It is also possible to observe the presence of viral load in the spinal cord and left spinal ganglion in the herpetic period after HSV-1 virus inoculation.

Key words: Post Herpetic Neuralgia, neuropathic pain, HSV-1 virus, MAPK, CREB, glutamine synthetase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de patologias associadas a dor neuropática.....	21
Tabela 2. Resumo da expressão proteica na fase herpética e pós herpética.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HSV-1.....	23
Figura 2. Patogênese do HSV-1.....	24
Figura 3. Imagem fotográfica de lesões vesiculares causadas por HSV-1	25
Figura 4. Imagem ilustrativa de vesículas produzidas no dermatomo correspondente ao GRD da face após infecção primária do mesmo por HSV-1.....	25
Figura 5. Modelo de interação entre neurônios via fusão por junção de hiato das células glias satélite.....	28
Figura 6. Aspecto das lesões cutâneas 8 dias após inoculação do vírus HSV1.....	35
Figura 7. Cronograma de execução da metodologia.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Figura 1. Alodínea mecânica em animais Balb/C expressa como média do limiar de retirada da pata (g), utilizando o teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia (Vonfrey) e latência térmica em animais Balb/C expressa como média da latência (s), utilizando o teste baseado no método de Hargreaves, no momento basal, após 7, 14, 21 E 28 dias da inoculação do HSV1 ativo na pata traseira esquerda do camundongo40
- Figura 2. Perfis de amplificação do DNA viral HSV-1 expresso em comparação com curva padrão em (A) DRG direito e esquerdo e (B) corno direito e esquerdo da SC de animais Balb/C após 8 e 21 dias de inoculação do vírus HSV1 ativo e inativo na pata traseira esquerda dos animais..... 41
- Figura 3. Perfis de expressão das proteínas (A) JNK, (B) P38, (C) ERK, (D) AKT, (E) Glutamina (F) CREB e (G) Stat 3 em seus estados fosforilado e total fosforilação de JNK expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em SC de animais Balb/C inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após a inoculação..... 44

LISTA DE SIGLAS

AKT	Proteína serina/treonina quinase
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
CGS	Célula glial satélite
GABA	Ácido gama aminobutírico
GRD	Gânglio da raiz dorsal
JNK	c-JUN NH2-terminal quinase
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
IL -1 b	Interleucina um beta
IL – 6	Interleucina seis
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HSV-1	Vírus da Herpes simples tipo 1
HSPs	Proteínas de choque térmico
HZ	Herpes zoster
LPS	Lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas
MEM	Meio essencial mínimo
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
Nav 1.3	Canal de sódio voltagem dependente 1.3
Nav 1.8	Canal de sódio voltagem dependente 1.8

Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
NFκ	Fator de transcrição nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento nervoso
NMDA	N-metil aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS1	Enzima óxido nítrico sintase neural
NOS2	Enzima óxido nítrico sintase induzida
NP-40	Tergitol tipo NP-40
PI3K/Akt	Via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase
P 38	Proteína 38
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonil
PRRS	Receptores de reconhecimentos padrões
RPM	Rotação por minuto
RT- PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio (detergente)
STAT 3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3
TLR 2	Receptor do tipo toll 2
TLR 9	Receptor do tipo toll 9
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Trisaminometano
TRPV1	Receptores vanilóides específicos
USP	Universidade de São Paulo
VVZ	Vírus varicela-zóster

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Dor inflamatória.....	19
1.2 Dor neuropática.....	20
1.3 Herpes zoster (HZ).....	22
1.4 Mudança do perfil fenotípico de neurônios após infecção por Herpes zoster (HZ).....	26
2. Objetivos	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos	34
3.1 Animais.....	34
3.2 Propagação dos estoques virais.....	34
3.3 Modelo experimental de neuropatia herpética e pós-herpética.....	34
3.4 Teste algesimétrico.....	35
3.5 Imunodeteção do fator de transcrição MAPKs (Erk1,2, p38 e JNK/ SAP), CREB, AKT, STAT 3 e seus resíduos fosforilados.....	36
3.6 PCR para amplificação de fragmentos do gene Viral HSV-1.....	37
3.7 Aspectos éticos sobre o uso de animais de experimentação.....	38
3.8 Análises estatísticas.....	38
4. Resultados	40
4.1 Inoculação do vírus HS-1 na pata esquerda de camundongos Balb/C provoca o desenvolvimento de alodínia mecânica e hipernocicepção.....	40
4.2 Presença de carga viral de HSV-1 no corno dorsal esquerdo da SC e DRG esquerdo após inoculação do mesmo na pata traseira esquerda de camundongos Balb/C.....	41
4.3 HSV1 promove aumento da expressão de fosfo-JNK, P38, fosfo-AKT, fosfo-CREB e CREB e diminuição da expressão de fosfo-STAT 3 em SC nas fases herpética e pós herpética em corno dorsal esquerdo da medula dorsal de camundongos Balb/C.....	42
5. Discussão	47
6. Conclusões	54
REFERÊNCIAS	56

Introdução

1. Introdução

De acordo com a Associação Internacional de Estudo da Dor, a dor é descrita como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, é de extrema importância para sobrevivência e integridade do organismo, uma vez que informa sobre a ocorrência de uma lesão ou dano tecidual.

O estudo da dor crônica é de grande relevância devido ao alto índice de ocorrência. Há estimativa de que em média 35% da população mundial sofra em decorrência de dor crônica (CIPRIANO, ALMEIDA & VALL 201), sendo que o maior índice de dor crônica encontra-se na Europa aonde 19% dos europeus adultos sofrem de dor crônica de tal forma que essa afeta seriamente a qualidade de suas vidas sociais e de trabalho (BREIVIK et al, 2006). Desses adultos diagnosticados 21% tinham como causa principal a depressão, 61% eram menos capazes ou incapazes de trabalhar fora de casa e 19% tinha perdido seu trabalho (BREIVIK et al, 2006).

A dor persistente pode ser dividida em inflamatória e neuropática. A dor inflamatória é provocada pela ativação do sistema imune decorrente de danos teciduais, contato com substâncias químicas, exposições bacterianas ou virais, clinicamente a mesma pode ser identificada através de edema, febre, eritema, hiperalgesia e dor, devido a ativação das células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos levam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL- 6) que agem diretamente sobre os nociceptores (BASBAUM & BUSHNEL, 2002).

A dor crônica de origem neuropática é descrita clinicamente como uma dor que vai além do período de cura, ou seja, persiste após um processo de reparação de determinada lesão (MERSKEY & BOGDUK 1994).

Na dor crônica de origem neuropática ocorrem várias modificações fisiológicas tanto a nível periférico quanto central, Em nível periférico ocorrem alterações da expressão gênica, aumento da expressão de nociceptores, ativação de células da glia, alteração da expressão de canais iônicos, alteração na liberação de neurotransmissores, aumento de marcadores de lesão neuronal, contudo a nível central também podemos observar algumas mudanças como aumento na descarga

aferente, alteração da expressão gênica, aumento da expressão de nociceptores, reorganização anatômica e hiperativação de vias intracelulares (MERSKEY & BOGDUK 1994).

Indivíduos com dor crônica apresentam alterações táteis como disestesia, parestesia, hiperestesia e alodinea. Parestesia é uma sensação anormal espontânea ou evocada mas não desagradável. A disestesia é uma sensação anormal e desagradável sobre a pele como queimação, dormência, coceira entre outras que também pode se dar de uma forma evocada ou espontânea, já a hiperestesia é um aumento da dor de um estímulo que normalmente provoca dor. (IASP 2016) e alodinia é a mais relatada em indivíduos portadores de dor crônica e caracteriza-se por dor causada por um estímulo que normalmente não provoca dor (KUNER, 2010).

1.1 Dor inflamatória

Após um trauma, ocorre uma reação inflamatória, levando a uma dor inflamatória, causada pela liberação de substâncias pró-inflamatórias como acetilcolina, bradicinina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxanas, interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados. Os nociceptores (fibras nervosas tipos A δ e C) são ativados por essas substâncias pró inflamatórias, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e conseqüentemente o quadro de hiperalgesia (KRAYCHETE, CALASANS E VALENTE, 2006).

A nocicepção periférica, tem como principais agentes causadores a bradicinina, a prostaglandina, o fator de crescimento nervoso (NGF) e as interleucinas pró-inflamatórias. Os receptores vanilóides específicos (TRPV1) acoplados a canais iônicos ligante-dependente, sofrem alterações em seu formato pela prostaglandina e a bradicinina via ativação do adenosina monofosfato cíclico (AMPC), e das proteinocinases A e C reduzindo o tempo pós hiperpolarização da membrana neural, causando, então, redução do limiar para disparo da fibra nervosa. A síntese, o transporte axonal anterógrado, a quantidade de substância P (SP) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina nas fibras C tipo I, são aumentados pelas neurotrofinas tanto nas terminações nervosas periféricas quanto nas centrais. Ao

lado disso, provocam mudanças nos receptores vanilóides de fibras A δ acoplados a canais iônicos ligante-dependente e acionam as proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK) que podem fosforilar o AMPc e iniciar a transcrição gênica, responsável por alterações fenotípicas que contribuirão para amplificação da eficácia sináptica. Portanto os neuromediadores periféricos facilitam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, exacerbando a hiperalgesia ou a alodínia. Isso pode ser evidenciado pelo aumento da condutividade de canais de sódio ou cálcio ou pela redução do influxo de potássio ou cloro para o intracelular (KRAYCHETE, CALASANS E VALENTE, 2006).

1.2 Dor neuropática

A dor neuropática é causada por uma lesão, anormalidade ou doença no sistema nervoso central e/ou periférico (MERSKEY et al; 1979), Periféricamente ocorrem alterações bioquímicas em neurônios sensoriais como o aumento da expressão da substância P e acetilcolina neurotransmissores que medeia a via da dor e de Fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento neural [NGF do inglês, *Nerve Growth Factor*], de BDNF [BDNF do inglês, Brain-derived neurotrophic factor] e de GDNF [GDNF do inglês], ativação espontânea de fibras aferentes, descargas repetidas do gânglio da raiz dorsal, ativação das células da glia, liberação de citocinas pro-inflamatórias o TNF α , IL-1 β , IL- 6 (KRAYCHETE & SAKATA, 2011) e outras substâncias neuroexcitatórias como bradicinina, radica ácidos e prostaglandinas (KRAYCHETE, CALASANS & VALENTE, 2006). Também foi observado que em uma lesão de neurônio sensorial periférico ocorre a ativação de nociceptores silenciosos que só são ativados em situações patológicas aumentando assim a excitabilidade neural (HUNT & MANTYH, 2001).

A dor neuropática pode ser dividida em dor de origem central e/ou periférica. A dor neuropática de origem central é definida como uma dor associada à lesões do sistema nervoso central, é um quadro de difícil e demorada resolução e possui alguns sintomas característicos como dor em queimação nos membros e parestesias. Esse tipo de dor é considerada mais rara que as de origem periférica e possui como causas mais comuns acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e outras mielopatias (SCHESTATSKY, 2008).

A dor periférica é mais comum do que a central, é caracterizada como uma lesão comprometedoras do sistema nervoso periférico mais especificamente dos nervos periféricos. As neuropatias periféricas podem ocorrer por disfunção sensorial ou motora. Nas disfunções sensoriais a manifestação mais comum é a sensação de formigamento já nas causas motoras são frequentes os espasmos musculares, fasciculações, clônus, perda da destreza e força muscular (KRAYCHETE & SAKATA, 2011).

Há inúmeros fatores que podem ser a causa de uma neuropatia periférica dolorosa como diabetes mellitus (FERNANDES et al, 2001), quimioterapia (COSTA et al, 2015) , infecção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) (BELTRÁN; MORENO & HERNÁNDEZ, 2016) e pelo vírus varicela-zóster (VVZ) (PORTELLA; SOUZA & GOMES, 2013), além desses citados várias outras patologias podem ser a causa de dor neuropática como citadas abaixo na tabela:

Classe	Sub-tipo de dor neuropática
Lesão mecânica traumática	Neuropatia por aprisionamento Transecção do nervo Lesão da medula espinhal Dor pós cirúrgica
Metabólica ou nutricional	Neuropatia alcoólica Pelagra Síndrome dos pés em chamas
Viral	Neuralgia pós-herpética Dor HIV/AIDS
Neurotóxica	Vincristina Cisplatina Taxol Tálio Arsênio Terapia de radiação
Doença não viral	Diabetes Malignidades Esclerose múltipla Neuralgia do trigêmeo Síndrome de Guillian-Barre Vasculite

Isquemia	Síndrome talâmica Dor pós acidente vascular cerebral
Função do neurotransmissor	Síndrome dolorosa complexa regional

Tabela 1. Classes de patologias associadas a dor neuropática.

1.3 Herpes zoster (HZ)

O vírus varicela-zóster (VVZ) é composto de DNA linear, de fita dupla, da família Herpesviridae, agente causador da varicela apenas em humanos, o mesmo se aloja no gânglio da raiz dorsal (GRD) e lá persiste de forma latente durante toda a vida do hospedeiro após a infecção primária. A reativação do VVZ leva a sua replicação no GRD e o seu deslocamento antidromico ao longo do nervo aferente primário para a pele do hospedeiro (WATSON et al., 1991) resultando em uma doença infecciosa intitulada herpes zoster (HZ) caracterizada por manifestações cutâneas dolorosas (PORTELLA; SOUZA & GOMES, 2013) acompanhada frequentemente de dor herpética aguda e de dor crônica pós-herpética (WELLER, 1983; STRAUS ET AL., 1988).

Devido a diferenças de especificidade entre espécies, o vírus herpes simples do tipo 1 (HSV-1, herpes simplex vírus type -1) é o que apresenta, no camundongo, os sinais mais aproximados com os fenômenos observados em humanos infectados com o vírus varicela-zoster e que apresentam dor herpética (STRAUSS, 1998; TAKASAKI et al., 2000).

O vírus HSV-1 faz parte da família Herpesviridae, possui um diâmetro que varia entre 120 a 200 nm, é constituído por quatro componentes (Figura 1): um cerne elétron-denso que contém o DNA viral, um capsídeo icosadeltaédrico, uma camada amorfa de proteínas denominada tegumento que possui a função de separar o capsídeo da camada mais externa composta de pelo menos 20 proteínas virais e um envelope formado por uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 diferentes glicoproteínas virais embutidas nele (ZOLINI, 2012).

O reconhecimento viral pelo sistema imune inato ocorre através de receptores intitulados receptores de reconhecimento padrões (PRRS), no vírus da herpes simples (HSV) ocorre um reconhecimento específico, aonde a partícula viral

completa constituída por DNA e cercada por proteínas e glicoproteínas (viriões) é reconhecida pelo receptor do tipo toll 2 (TLR 2) e o DNA viral pelo receptor do tipo toll 9 (TLR 9) no endossomo celular (SORENSEN et al, 2008).

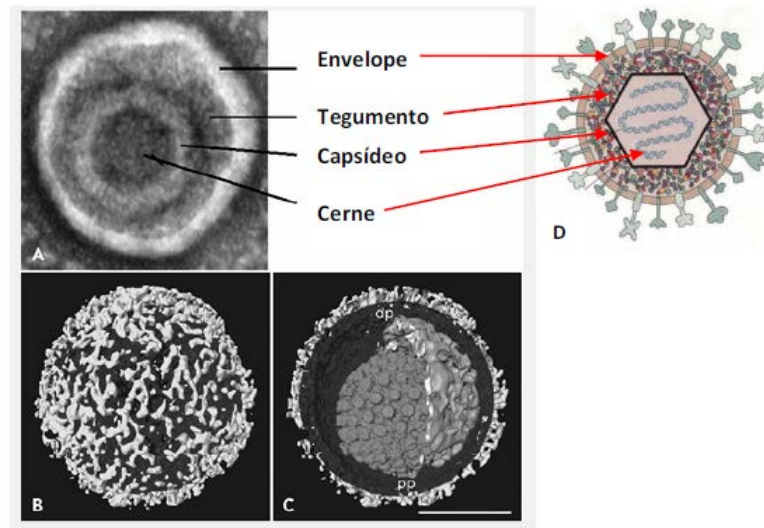


Figura 1. Estrutura do HSV-1. Estrutura do vírus HSV-1 por microscopia eletrônica (A), imagem superficial do HSV-1 com tomografia crioelétrica (B), imagem de tomografia crioelétrica em corte do HSV-1 evidenciando suas estruturas (C), estrutura do vírus mostrada por desenho esquemático (D). As setas indicam o envelope, o tegumento, o capsídeo e o cerne. Fonte: ZOLINI, 2012.

O HSV-1 é um vírus neurotrópico (crescimento preferencial no sistema nervoso) e pode infectar não somente humanos, mas também camundongos, ratos, cobaias e coelho (SIMMONS & NASH, 1984; ANDOH et al., 1995). Após invadir o hospedeiro, o vírus inicia sua replicação primária em células epiteliais da pele ou mucosas. Em seguida ele penetra nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais e ascende por transporte axonal até o GRD, onde permanece alojado (COOK e STEVENS, 1973; PENFOLD et al., 1994). Uma vez reativado, o vírus HSV-1 se desloca pelo nervo aferente primário e produz erupções tegumentares na forma de vesículas nos dermatomos correspondentes dos gânglios infetados (COHRS et al., 2004). Em seguida, os vírus cessam sua replicação e entram em latência nos neurônios do GRD, onde permanece alojado indefinitivamente por toda a vida do hospedeiro, quando o vírus cessa a sua replicação ocorre o desaparecimento dessas erupções porém a dor permanece, sendo essa caracterizada dor crônica pós-herpética, que é tipicamente descrita como uma dor contínua, em queimação, e frequentemente apresenta alodínia na forma de uma dor muito intensa

desencadeada pelo simples toque da área afetada (LOESER, 1986, PORTENYO ET AL., 1986; NURMIKKO ET AL., 1990; COHRS, 2004).

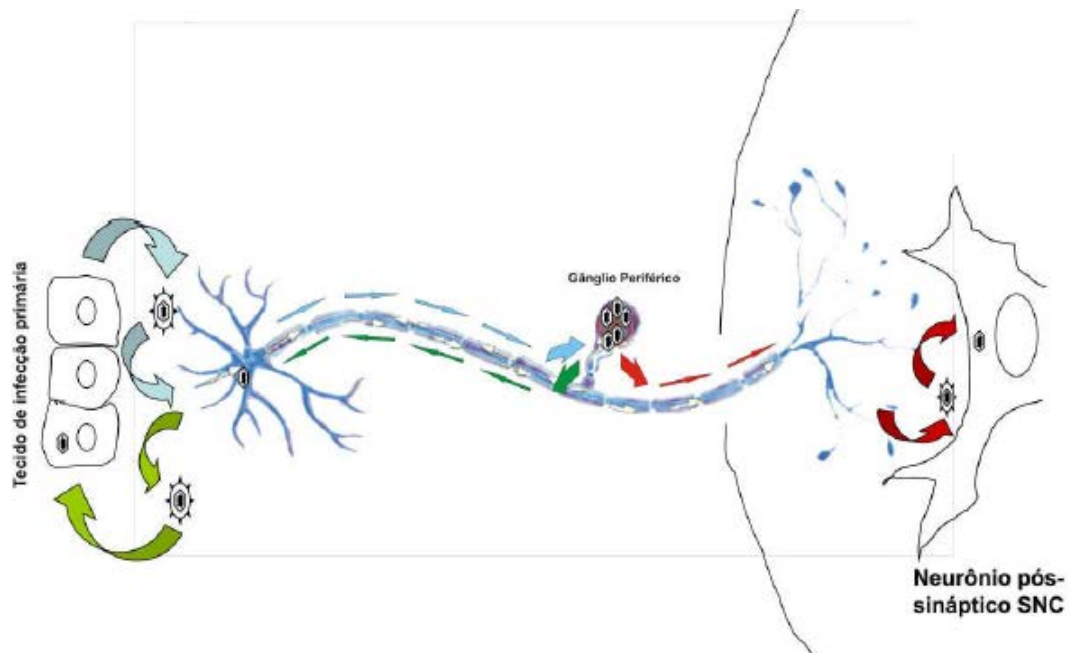


Figura 2. Patogênese do HSV-1. Nas células epiteliais ocorre a infecção viral primária produtiva, a partir dessas células o vírus se desloca por transporte retrógrado através de axônios até os gânglios sensoriais periféricos que se tornam sítios secundários da infecção, onde o vírus se aloja e permanece em latência (**setas azuis**). Se ocorrer a reativação viral, o mesmo é conduzido por transporte anterógrado até às células epiteliais (**setas verdes**), onde ocorre novamente infecção produtiva. Raramente também pode ocorrer reativação e condução do vírus ao sistema nervoso central (**setas vermelhas**). Fonte: ZOLINI, 2012.

Clinicamente, pacientes infectados com HSV-1 apresentam sinais e sintomas muito parecidos com o Herpes zoster como parestesia, disestesia, hiperalgesia e formigamento no dermatomo correspondente. A dor pode ocorrer, tanto antes da erupção das vesículas, quanto após o desaparecimento das lesões cutâneas, caracterizando a chamada neuralgia pós-herpética (LAYZER & CONANT, 1974; KROHEL et al., 1976; GONZALES et al., 1992).

Existem dois tipos de HSV, os quais possuem estruturas semelhantes, porém diferem antigenicamente. O vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-1) afeta geralmente regiões superiores do tronco como face, olhos, boca, braços, abdômem entre outros, em contrapartida o vírus da herpes simples tipo 2 (HSV-2) afeta geralmente regiões inferiores ao tronco como órgãos genitais, pernas, entre outros, no entanto o

tipo 1 quanto o tipo 2 pode provocar infecções em ambos os locais (AZAMBUJA, VERCINI & FURLANETTO, 2004).



Figura 3. Imagem fotográfica de lesões vesiculares causadas por HSV-1. A-lesão ao longo do dermatomo T4 em adulto.

Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Herpes_zoster_3days_passed.jpg

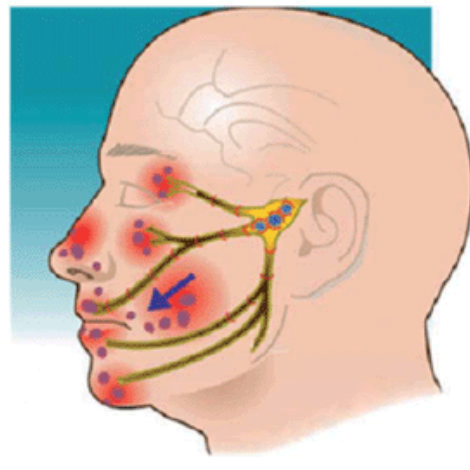


Figura 4. Imagem ilustrativa de vesículas produzidas no dermatomo correspondente ao GRD da face após infecção primária do mesmo por HSV-1. Fonte adaptada: MARTIN et al 2011.

A neuralgia pós-herpética é caracterizada pelo desenvolvimento de hiperalgesia, alodínia mecânica e dor espontânea, sendo considerada uma dor do tipo neuropática (ROWBOTHAM E FIELDS, 1996), no entanto a predisposição para a ocorrência da mesma ainda desconhecida, embora represente uma das principais causas de morbidade, além de ser resistente aos analgésicos disponíveis atualmente (BOWSER, 1995; TENSER, 2001).

Os mecanismos fisiopatológicos associados a dor aguda e crônica causada pela infecção do vírus HSV-1 e a dor crônica pós-herpética são pouco conhecidos. Modelos experimentais têm tentado esclarecer alguns desses mecanismos, mas os resultados são ainda muito incipientes e restritos à fase aguda do processo infeccioso (TAKASAKI et al., 2000; GARRY et al., 2005).

1.4 Mudança do perfil fenotípico de neurônios após infecção por Herpes zoster (HZ)

Um fator preponderante na plasticidade neural desencadeada por lesões do sistema nervoso é a mudança dramática do perfil fenotípico de neurônios a partir de alterações na expressão de diversos genes (CUMMINS et al., 2000; HOKFELT, et al., 1994; WOOLF & SALTER, 2000; XIAO et al., 2002), a investigação desses mecanismos neuronais associados ao desenvolvimento da neuralgia pós-herpética tem sido facilitada pelo desenvolvimento, recente, de modelos animais de infecção por diferentes tipos de vírus (TAKASAKI et al., 2000; GARRY et al., 2005).

Existe uma relação direta entre a replicação do HSV-1 e a expressão de um importante fator de transcrição intitulado resposta precoce ao crescimento- 1 (EGR 1), que é mediado em parte pelas vias de sinalização NFκB e CREB (BEDADALA et al 2011).

Além das vias de sinalização NFκB e CREB os vírus da herpes expressam múltiplas proteínas que visam a via de sinalização das células PI3K / Akt (via de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) -Akt responsável por regular várias funções celulares, como síntese proteica, crescimento celular, metabolismo da glicose e inflamação) para garantir além de uma replicação viral bem sucedida uma facilitação na infecção e reativação viral (LIU & COHEN, 2015).

Um estudo realizado por Hsia et al, 2017 mostrou que a reativação desse vírus em gânglios também pode ser modulada pela proteína STAT3, a mesma pode governar vários aspectos da proliferação de células mielóides, diferenciação e respostas a infecção, como elevar respostas imunes em resposta a lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (LPS) e infecções bacterianas, contudo a caracterização de STAT3 durante a alteração de sensibilidade provocada pelo vírus HSV-1 não foram totalmente investigadas (HSIA et al, 2017).

Sabe-se que apesar da terapia antiviral supressora, é muito recorrente casos de reativação viral, em contrapartida alguns modelos experimentais mostraram que a taxa de reativação do vírus latente da herpes pode decair em resposta a aplicação da glutamina sintetase em indivíduos infectados pelo vírus (WANG et al 2017).

A glutamina sintetase é uma enzima responsável pela síntese de glutamina a partir do glutamato, além de ser considerada um aminoácido livre não essencial, o termo não essencial se deve ao fato da glutamina ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. A mesma é encontrada em abundância no plasma e tecido muscular, porém o tecido muscular esquelético é responsável pela maior parte de sua síntese, estoque e liberação, também se encontra envolvida em diversas funções, como a proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, síntese de ácidos nucleicos, nucleotídeos e proteínas, além de influenciar diversas vias de sinalização celular (CRUZAT, PETRY & TIRAPEGUI, 2009).

Glutamina sintase também participa da expressão da proteína glial, sendo assim a principal marcadora molecular das células da glia. As células da glia, são células que se localizam em torno dos corpos dos neurônios e da porção axonal proximal com a função de fornecer nutrientes e manter a conformação dos neurônios. Contudo as células gliais celular do sistema nervoso central (SNC) e mais recentemente as dos gânglios sensitivos, vem mostrando ser uma das células responsáveis pela geração e manutenção da dor, devido a comunicação intraganglionar gerada por essas células causando assim uma modulação na atividade dos neurônios (COSTA & NETO, 2015).

Apesar de não existir sinapses em corpo neural, há evidências sobre a presença de vários receptores de neurotransmissores nos mesmos, evidencia essa confirmada por estudos *in vivo*, onde se observou que após estimulação repetida em corpos celulares de neurônios (gânglios) ocorreu uma liberação somática dependente de cálcio mediada por mediadores químicos como substancia P, glutamato entre outros gerando assim uma despolarização transitória em neurônios vizinhos. Contudo sugere-se que a influencia desses mediadores nos neurônios adjacentes seja indireta, envolvendo as células gliais satélites (CGS) que se encontram completamente envolvida nos corpos neuronais facilitando a comunicação não sináptica. As CGS derivam das células pluripotentes da crista neural e formam uma bainha em torno do corpo de cada neurônio e da porção

proximal do seu axônio, assim cada corpo neuronal forma uma unidade morfológica funcionalmente distinta (COSTA & NETO, 2015).

Um estudo realizado por Warwick e Hanani, (2016) mostrou que a infecção causada pelo vírus HSV-1 causa um aumento intracelular de ondas de cálcio devido a uma alteração na comunicação entre as células da glia e o neurônio dos gânglios sensoriais. Essa alteração na comunicação entre as células ocorre devido a formação de poros de fusão chamado fusão de hiato entre as células da glia que envolvem os neurônios sensoriais proporcionando assim um maior influxo de cálcio nos neurônios após a despolarização o que facilita a propagação de sinais de cálcio por longas distâncias. Essas alterações induzidas pelo vírus podem causar não só um aumento no disparo de potencial de ação dos neurônios dos gânglios sensoriais como também um aumento na liberação de neurotransmissores nos terminais pré sinápticos da medula espinhal (WARWICK & HANANI, 2016)

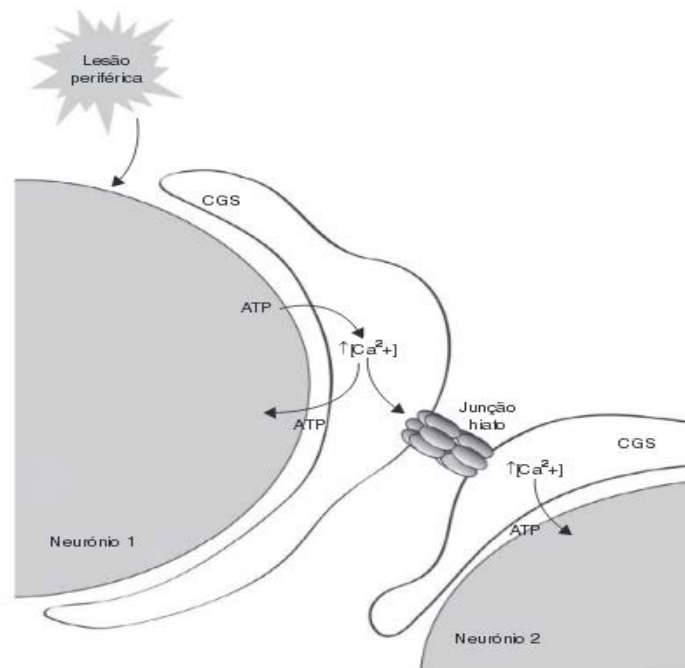


Figura 5. Modelo de interação entre neurônios via fusão por junção de hiato das células glias satélite. Fonte: COSTA & NETO, 2015.

Também há evidências que a hiperexcitabilidade da medula espinhal e a hiperalgesia em modelos de crônica esteja envolvido com a presença de óxido nítrico (NO). A produção de óxido nítrico (NO) no sistema nervoso periférico e central acontece principalmente pela enzima óxido nítrico sintase neural (NOS1), contudo

após invasão viral ocorre uma expressão da isoforma óxido nítrico-sintase induzida (NOS2) (MAYER et al., 1999) Um estudo desenvolvido por Sasaki et al, 2007 sugere que a alodinia presente na fase herpética e pós-herpética é mediada por óxido nítrico no corno dorsal da medula, aonde o NOS2 e NOS1 são responsáveis respectivamente pela alodinea herpética e pós-herpética.

Lesões axonais periférica levam a uma modificação na expressão de canais de Na⁺ que gera uma hipersensibilidade (MATZNER e DEVOR, 1994; Omana-Zapata et al., 1997) aonde a diminuição da expressão de canais Nav1.8 e aumento da expressão dos canais Nav1.3 geram uma hiperexcitabilidade dos receptores NMDA para o glutamato na coluna dorsal da medula espinal (PALECEK et al., 1992; LAIRD & BENNETT, 1993; MAYER et al., 1999).

Lesões do sistema nervoso levam a plasticidade neural que ocorre em parte devido a alterações nas vias intracelulares de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs): p38, JNK e ERK 1, 2 em neurônios da coluna dorsal da medula espinal (JIN et al., 2003; ZUANG et al., 2005, 2006). As MAPKs são expressas na coluna dorsal da medula espinal após lesão do nervo periférico, contudo esse aumento na expressão das mesmas é dependente ao tempo de lesão, nas horas iniciais pós lesão a ERK1,2 têm sua atividade aumentada e em uma fase mais tardia ocorre a ativação da p38 e JNK que permanece por um longo período (JI, 2007; JI et al., 2007). A ativação da ERK1,2 é dada por fatores tróficos enquanto a p38 e JNK são ativados por citocinas pró-inflamatórias (JI, 2007; JI et al., 2007).

Estudos demonstram que uma fosforilação significativa de p38 em neurônios da coluna dorsal da medula epinal após uma lesão neural periférico, além do que a inibição de p38 foi bastante eficaz no alívio da dor neuropática (JIN et al., 2003; ZUANG et al., 2005, 2006), assim evidencia-se que a ativação dessas MAPKS contribuem para a presença de alterações sensoriais principalmente a dor em lesões nervosas periféricas (JI, 2007; JI et al., 2007).

As HSPs (proteína de choque térmico que possui expressão proteica influenciada pela glutamina), conseguem inibir a via de sinalização intracelular das proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e a via do fator nuclear kappa B (NF-κB), conseqüentemente a inibição dessas vias MAPK e NF-κB conseqüentemente leva a redução da ativação de sinais de tradução e expressão de

citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (CRUZAT, . PETRY & TIRAPEGUI, 2009).

EM animais submetidos a estado de sepse, atenuação das MAPKs e a ativação do complexo NF- κ B, ocorreu através da inibição da proteína inibidora, I κ B- α , através do aumento da da glutamina (SINGLETON, BECKEY & WISCHMEYE, 2005). Outro estudo realizado por Singleton e Wischmeyer, 2007 foi verificado que a inibição das vias NF- κ B e das proteínas quinases que compõem a via da MAPK, ocorreu devido a administração de glutamina que promoveu aumento de maneira dose-dependente da expressão da HSP-70.

Embora os mecanismos fisiopatológicos possam ser semelhantes ao de outras formas de dor neuropática, não sabemos ainda se a expressão das MAPKs, CREB , STAT 3, AKT e glutamina sintetase estão relacionadas com a alteração de sensibilidade presente nas neuralgias herpéticas e pós herpéticas aonde o vírus latente interage modificando ou controlando os neurônios do sistema nociceptivo.

Esse projeto tem como objetivo identificar o perfil de sensibilidade mecânica e térmica dos animais após inoculação do vírus HSV-1, as vias proteicas que podem estar relacionadas com o desenvolvimento de hipersensibilidade sensorial na neuralgia hérpetica e pós-herpética além de verificar a presença de carga viral de HSV-1 no corno esquerdo da SC e DRG esquerdo, portanto os resultados deste trabalho devem evidenciar um melhor entendimento na fisiopatologia da dor crônica de origem viral, possibilitando assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento de condições tão debilitantes.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o perfil de sensibilidade mecânica e térmica, as vias de sinalização intracelulares das MAPKs (Erk1,2, p38 e JNK/SAP) CREB, glutamina sintetase e Akt em um modelo experimental de neuropatia periférica de origem viral.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar, comportamentalmente, o desenvolvimento da alodínia mecânica e hipernocicepção após inoculação do vírus HSV-1 na pata posterior esquerda de camundongos da linhagem Balb/C. Estes resultados visam discriminar os períodos de neuralgia herpética e pós-herpética.
2. Investigar a presença de DNA viral HSV-1 na medula dorsal corno direito e esquerdo e gânglios direito e esquerdo de camundongos linhagem Balb/C no 8º dia e 21º dia após inoculação do vírus da herpes.
3. Investigar a atividade de vias intracelulares de sinalização no corno dorsal esquerdo da medula espinal de camundongos da linhagem Balb/C durante as fases de replicação (período herpético) e de latência (período pós-herpético) do vírus HSV-1. Serão investigados o estado de fosforilação das MAPKs (JNK/SAP, Erk1,2 e p38) AKT, CREB, Stat 3 e glutamina sintetase, e quais vias podem estar associadas ao desenvolvimento de hipernocicepção e alodínia mecânica na neuralgia herpética e pós-herpética.

Material e Método

3. Material e Método

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos com peso de 20-25 g (linhagem Balb/C) mantidos em ambiente com temperatura e luminosidade controlados ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro:escuro de 12:12 h) e livre acesso a ração e água. Em cada grupo experimental foram usados de 4 a 6 animais.

3.2 Propagação dos estoques virais

Células Vero foram propagadas com meio MEM (meio essencial mínimo) suplementando com 10% de soro fetal bovino. Quando as células alcançaram 80% de confluência o estoque de vírus foi inoculado, em presença de MEM suplementado com 3% de soro fetal bovino. Após o desenvolvimento do efeito citopático, as culturas foram congeladas a -70°C e descongeladas em banho-maria a 37°C por três vezes, centrifugadas e o sobrenadante passou para uma nova cultura de células. Após algumas passagens o título em TCID₅₀ dos estoques foi determinado em células Vero crescidas em placas de 96 poços.

3.3 Modelo experimental de neuropatia herpética e pós-herpética.

Três dias antes de realizar a inoculação os animais foram depilados com creme depilatório. Os camundongos foram inoculados com HSV-1 (aproximadamente $2 \times 10^{6,5}$) ou com HSV-1 inativado pela incubação em 60°C por 1 hora. Para realizar a infecção primeiramente realizamos a escarificação da pele e em seguida a inoculação do vírus na região anterior da pata esquerda traseira, no dermatomo correspondente a L4-L6 (5 x 5 mm). O aparecimento de lesões cutâneas foi monitorado uma vez ao dia. A figura abaixo mostra o tipo de lesão tegumentar que se observa entre o 7º e 8º dia após a inoculação do vírus HSV-1 na pele da pata traseira. Por volta do 10º dia está lesão desaparece completamente, permanecendo, entretanto, as alterações de sensibilidade.



Figura 6. Aspecto das lesões cutâneas 8 dias após inoculação do vírus HSV-1. Nota-se que as lesões restringem-se ao dermatomo de L4-L6 e a formação de intenso edema na extremidade da pata inoculada.

3.4 Teste algésimétrico

Os estudos comportamentais foram realizados entre 8 e 16 horas e os animais submetidos a um único teste. Teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia: um conjunto de nove filamentos serão aplicados na superfície plantar de cada animal. (de 1,62 mN a 35,59 mN). O limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força de cada estímulo e calculado pelo teste não-paramétrico de Dixon. A resposta flexora ao estímulo mecânico foi monitorada antes da eutanásia e somente os animais com alodínia mecânica participaram dos experimentos. Cada grupo experimental teve 4-6 animais e a comparação entre diferentes grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Friedman. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Teste para monitoramento de hipernocicepção: os animais foram colocados individualmente em compartimentos de 15 cm², sobre superfície de vidro transparente permitindo a passagem do feixe de luz, capaz de provocar estímulo doloroso térmico, quando dirigido à superfície plantar da pata posterior do animal.

Uma vez aplicado o estímulo nociceptivo térmico, foi possível monitorar o período de latência para a retirada da pata antes e após a lesão do nervo periférico ou a indução de inflamação no membro posterior do animal. O estímulo nociceptivo foi aplicado por um período máximo de 15 segundos para evitar lesão na pata do animal. Cada grupo experimental teve 4-6 camundongos e a comparação entre diferentes grupos foi feita pelo teste não-paramétrico de Friedman. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.5 Imunodeteção do fator de transcrição MAPKs (Erk1,2, p38 e JNK/ SAP), CREB, AKT, STAT 3 e seus resíduos fosforilados.

Para a imunodeteção de proteínas e seus resíduos fosforilados, foram obtidos extratos proteicos totais da coluna dorsal da medula espinal lombar (L4-L6) de camundongos inoculados com vírus HSV-1 inativo e HSV-1 ativo. Os extratos foram homogeneizados em tampão contendo 137 mM NaCl, 20mM Tris, pH 8,0, 1% de NP-40, 0,105% de SDS, 10% de glicerol e inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e leupeptina) e de fosfatases (NaF e Na₃VO₄). Após homogeneização, os tecidos foram mantidos a 4°C por 20 min e centrifugados a 13.000 rpm por 15 min. O sobrenadante e o precipitado foram separados e a quantidade de proteína total determinada pelo método de Lowry em cada uma das amostras. Amostras contendo 0,5 mg de proteína total foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 7.5% SDS (SDS-PAGE) e transferidas eletricamente para membrana de PVDF. A detecção das proteínas na membrana foi feita por incubações sequenciais do anticorpo primário e do secundário seguidas pela revelação através do método de quimioluminescência. Anticorpos anti-ERK, anti-P8, anti-JNK, anti-fosfo-AKT, foram usados para a análise da expressão e fosforilação desta proteína. Os filtros foram quantificados por análise de imagem. Foram usados 8 animais para cada grupo experimental e a análise estatística foi feita pelo teste T. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.6 PCR para amplificação de fragmentos do gene Viral HSV-1

Para a quantificação de DNA viral foi realizada uma curva padrão aonde determinou por analogia a quantidade de DNA viral presente por amostra. Para a construção desta curva utilizamos o DNA viral, produzido por cultura in vitro e então, a concentração do DNA extraído foi utilizada no cálculo da quantidade de cópias do DNA viral, pela fórmula: Quantidade de cópias = [Concentração (g/mL) / (nº de pares de base do inserto e de toda a região amplificada pela T7 polimerase x 340)] x Constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$).

A amostra inicial para preparação da curva foi gentilmente cedida pela Dra. Jaqueline Raymond da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e apresentava 3,2 mg/ul de DNA viral de HSV-1 e então foi feita uma diluição a base de 10, onde o primeiro ponto apresentava a concentração de $3,2 \times 10^{-1}$ mg/ul e o último ponto $3,2 \times 10^{-7}$ mg/ul. Essas diluições foram submetidas à RT-PCR em tempo real visando determinar a curva padrão que permitisse quantificar o DNA viral presente em cada amostra testada.

Os tecidos quantificados foram os gânglios da raiz dorsal e a medula espinhal (lado direito e esquerdo) dos camundongos machos (linhagem Balb/C) citados anteriormente. O DNA gênomico dos tecidos foi extraído utilizando o kit de purificação de DNA, DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen), o PCR em tempo real para quantificar HSV-1 foi realizado no aparelho Step-One Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems) com placa para 96 poços, no método de Quantification Comparative CT com iniciadores específicos para região do gene da timidina quinase (TK) de HSV-1 (primer sense: 5'- GCGTCATCTACGGGGGTAAG e primer antisense 5'- GTCTGGGCCACGATCACGTA). A reação de PCR foi realizada por amostra, contendo 1 µL da amostra de DNA, 6,25µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 0,5 µL do primer sense 600mM, 0,5 µL do primer anti-sense 600mM e 4,75 µL de água. A placa foi centrifugada a 1000 rpm durante 2 minutos e foi levada para o aparelho que estava nas condições de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 67 °C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos.

Todas as amostras foram feitas em duplicada, incluindo a curva padrão e o branco.

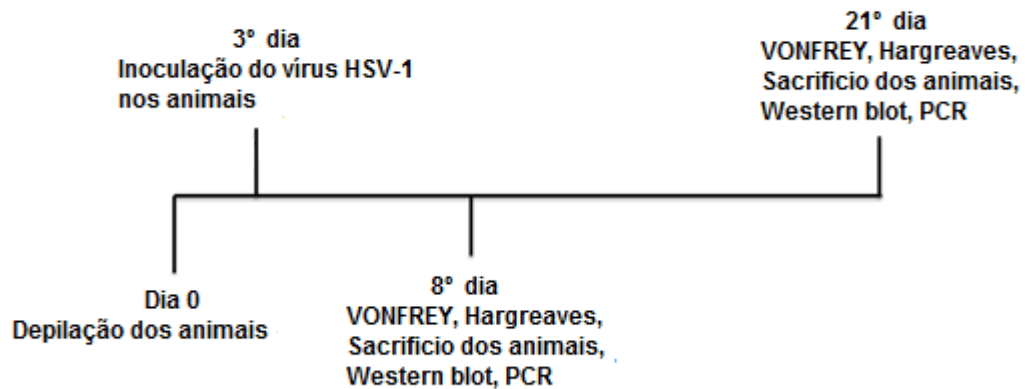


Figura 7. Cronograma de execução da metodologia.

3.7 Aspectos éticos sobre o uso de animais de experimentação

Todos os protocolos experimentais descritos foram realizados de acordo com as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 150/2013) e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os animais utilizados foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical.

3.8 Análises estatísticas

As análises dos testes comportamentais foram realizadas utilizando ANOVA de uma via para análises intragrupo e ANOVA de duas vias para comparações entre os grupos. Para ambos os ensaios foram aplicados pós-testes de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises da imunodeteção de proteínas foram realizadas pelo teste t de Student não pareado para comparação entre o grupo experimental e o controle. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

4. Resultados

4.1 Inoculação do vírus HS-1 na pata esquerda de camundongos Balb/C provoca o desenvolvimento de alodínia mecânica e hipernocicepção .

A inoculação do vírus HSV-1 ativo provocou uma redução na latência mecânica (limiar de resposta a retirada da pata em relação ao estímulo mecânico) da pata traseira esquerda caracterizando assim alodínea mecânica (Fig. 1A), em animais vistos do 7^o ao 28^o dias após a inoculação tanto em relação ao momento basal ($p < 0.001$) quanto em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo ($p < 0.001$).

A latência térmica (limiar de resposta a retirada da pata em relação ao estímulo térmico) da pata traseira esquerda de camundongos Balb/C inoculados com vírus HSV-1 também apresentou-se reduzida do 8^o ao 28^o dia após a inoculação, quando esses momentos foram comparados com o momento basal ($p < 0.001$) e ao grupo inoculado com HSV1 inativo ($p < 0.001$) (Fig 1B), caracterizando hipernocicepção nesses animais.

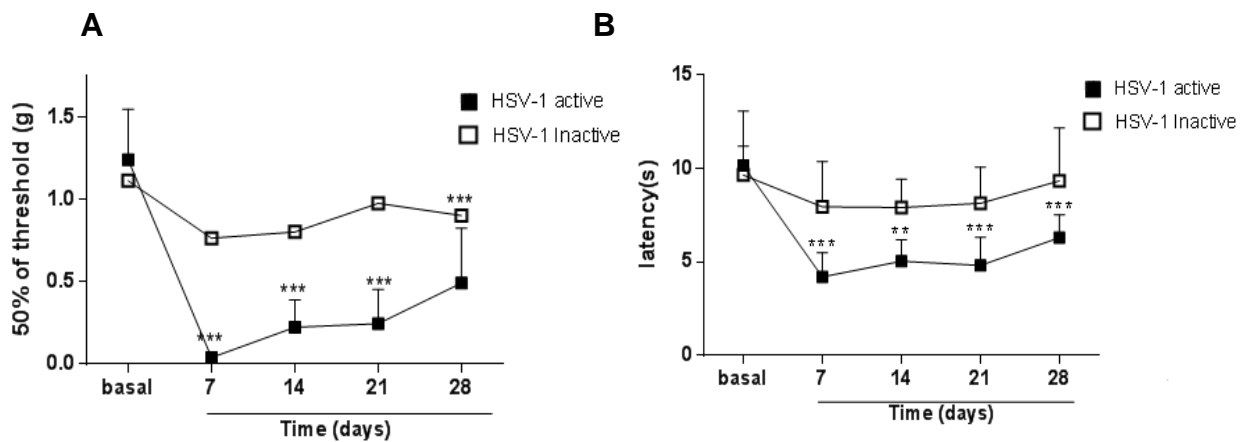


Figura 1. (A) Alodínea mecânica em animais Balb/C expressa como média do limiar de retirada da pata (g), utilizando o teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia (Vonfrey) e (B) latência térmica em animais Balb/C expressa como média da latência (s), utilizando o teste baseado no método de Hargreaves, no momento basal, após 7, 14, 21 E 28 dias da inoculação do HSV1 ativo na pata traseira esquerda do camundongo. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) $p < 0.001$ e (**) $p < 0.01$ em relação ao grupo basal, $n = 5-10$ /grupo).

4.2 Presença de carga viral de HSV-1 no corno dorsal esquerdo da SC e DRG esquerdo após inoculação do mesmo na pata traseira esquerda de camundongos Balb/C.

Após inoculação do vírus HSV1 na pata traseira esquerda dos animais o mesmo se alojou em DRG esquerdo e posteriormente em corno dorsal esquerdo da SC de camundongos Balb/C . /

Na imagem A, pode-se verificar através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) um aumento na amplificação do DNA viral HSV-1 no DRG esquerdo quando comparado ao DRG direito no 8º dia ($p < 0,001$) e 21º dia ($p < 0,001$) após inoculação do vírus da herpes. No DRG direito não houve amplificação DNA viral HSV-1.

Na imagem B, pode-se verificar através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) um aumento na amplificação do DNA viral HSV-1 na SC esquerda quando comparada a SC direita no 8º dia ($p < 0,01$) e 21º ($p < 0,01$) dia após inoculação do vírus da herpes.

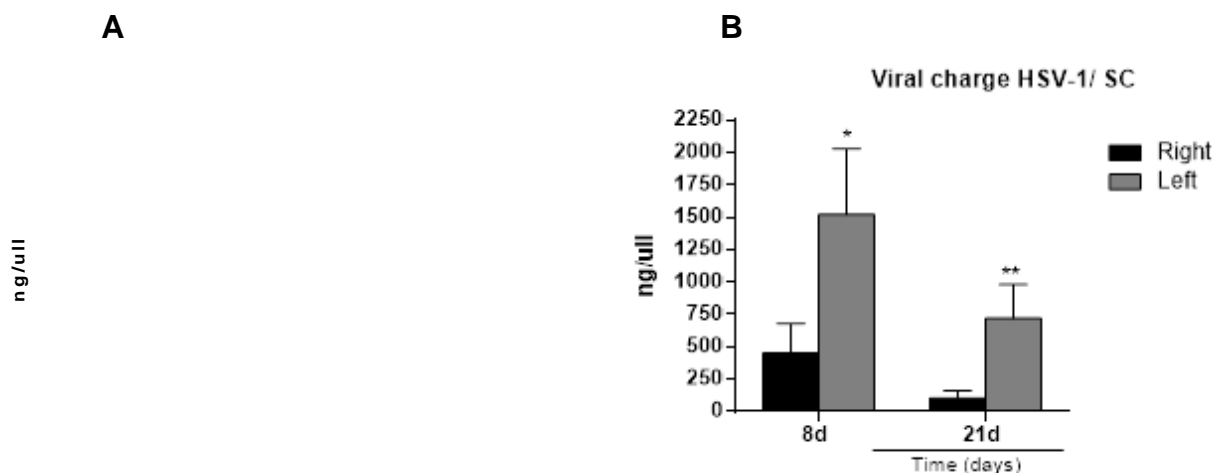


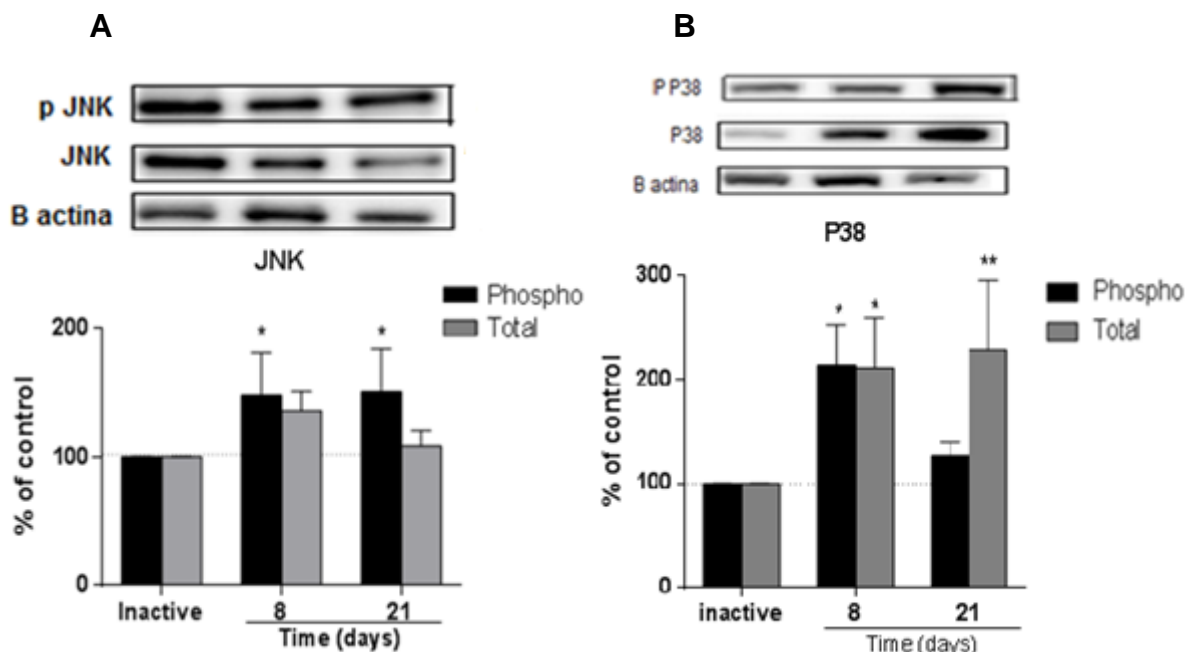
Figura 2. Perfis de amplificação do DNA viral HSV-1 expresso em comparação com curva padrão em (A) DRG direito e esquerdo e (B) corno direito e esquerdo da SC de animais Balb/C após 8 e 21 dias de inoculação do vírus HSV1 ativo e inativo na pata traseira esquerda dos animais. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (* $p < 0,01$ em relação ao grupo 8d direito, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo 21d direito utilizando teste t de Student não pareado, $n=5-10$ /grupo).

4.3 HSV1 promove aumento da expressão de fosfo-JNK, P38, fosfo-AKT, fosfo-CREB e CREB e diminuição da expressão de fosfo-STAT 3 em SC nas fases herpética e pós herpética em corno dorsal esquerdo da medula dorsal de camundongos Balb/C.

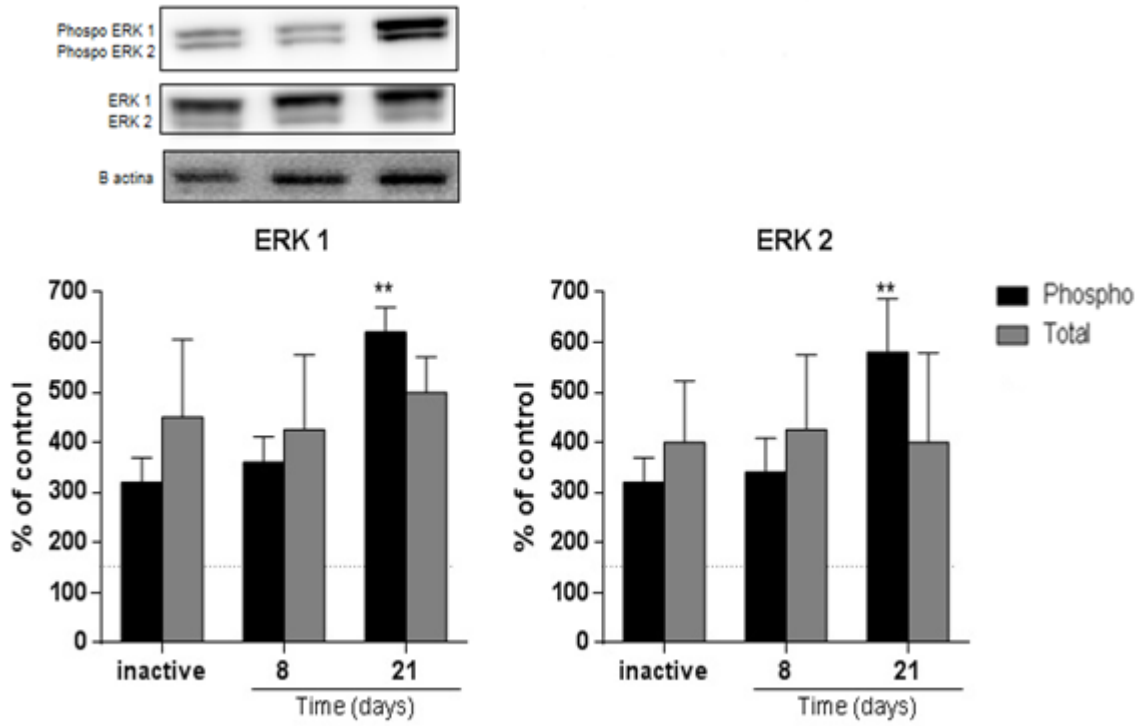
O HSV1 provocou alteração dos perfis de expressão e de fosforilação da MAPKS (JNK, P38, ERK) e de outras proteínas como AKT, STAT 3, CREB e Glutamina Sintetase, em SC de camundongos Balb/C .

No período herpético, houve aumento da expressão de fosfo-JNK ($p < 0.05$), fosfo-P38 ($p < 0.05$), P38 ($p < 0.05$), fosfo-AKT ($p < 0.01$), fosfo-CREB ($p < 0.05$), CREB ($p < 0.01$) e diminuição da expressão de fosfo-STAT 3 ($p < 0.01$) em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo.

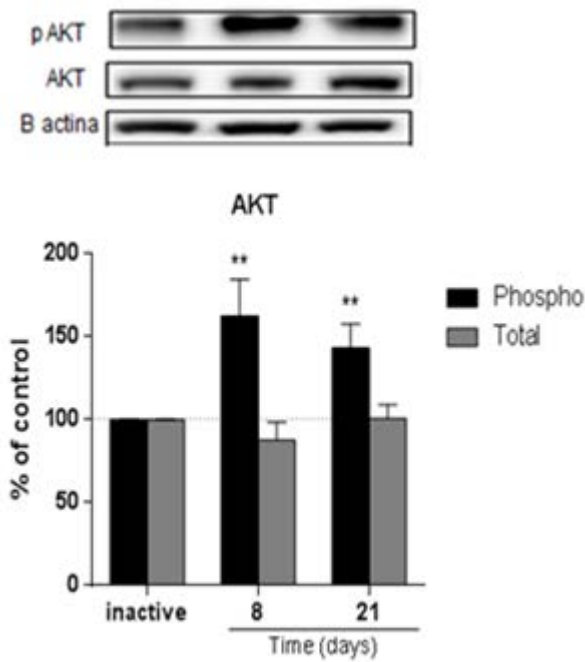
No período pós-herpético, houve aumento da expressão de fosfo-JNK ($p < 0.05$), P38 ($p < 0.01$), fosfo-AKT ($p < 0.01$), fosfo-CREB ($p < 0.01$), CREB ($p < 0.001$) e diminuição da expressão de fosfo-STAT 3 ($p < 0.01$), STAT 3 ($p < 0.01$), glutamina ($p < 0.01$), fosfo Erk1 ($p < 0.01$) e fosfo Erk2 ($p < 0.01$) em comparação ao grupo inoculado com HSV1 inativo.



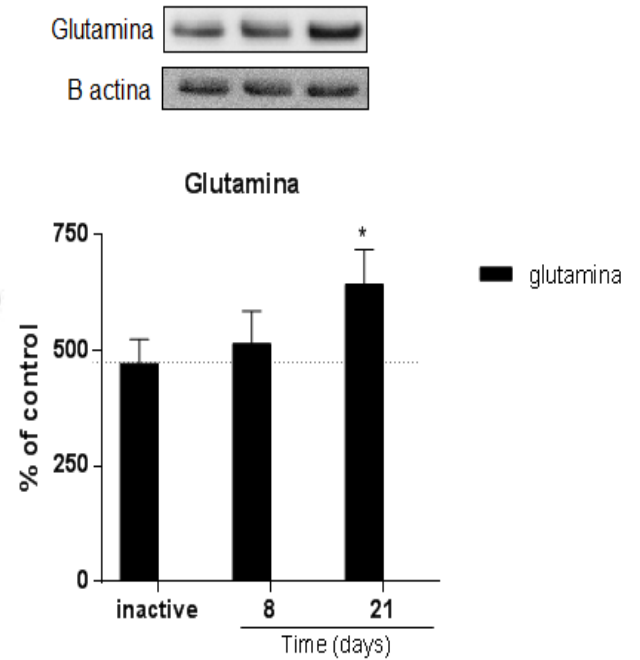
C



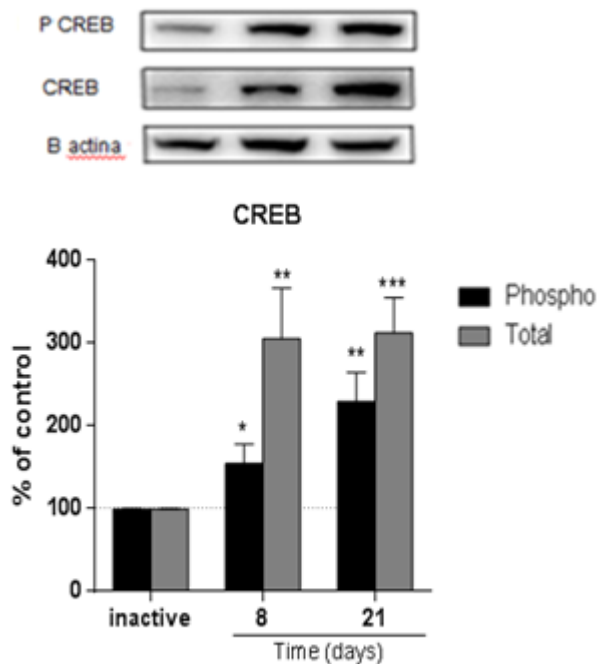
D



E



F



G

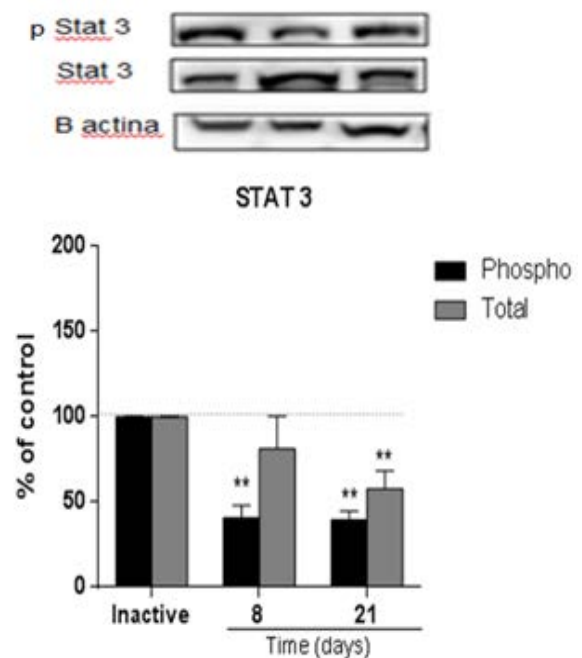


Figura 3. Perfis de expressão das proteínas (A) JNK, (B) P38, (C) ERK, (D) AKT, (E) Glutamina (F) CREB e (G) Stat 3 em seus estados fosforilado e total fosforilação de JNK expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β -actina em SC de animais Balb/C inoculados com HSV1 inativo, HSV1 ativo no 8^o ou 21^o dias após a inoculação. Resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) p <0.001, ** p <0.01 e * p <0.05 em relação ao grupo inativo, utilizando o teste t de Student não-pareado, n =5-10/grupo).

Proteínas	Aumento a expressão no período herpético	Aumento da expressão no período pós herpético
JNK total	Não	Não
Fosfo JNK	Sim	Sim
JNK total	Sim	Sim
Fosfo P38	Sim	Não
ERK1 / ERK 2 total	Não/não	Não/não
Fosfo ERK	Não/não	Sim/sim
AKT total	Não	Não
Fosfo AKT	Sim	Sim
Glutamina	Não	sim

CREB total	Sim	Sim
Fosfo CREB	Sim	Sim
STAT 3	Não	Não
Fosfo STAT 3	Sim	Sim

Tabela 2. Resumo da expressão proteica na fase herpética e pós herpética

Discussão

5. Discussão

Nesse presente estudo identificamos através de testes comportamentais que a inoculação do vírus HSV-1 desenvolveu um modelo de dor crônica de origem neuropática de causa viral, com manifestações de hiperalgesia térmica e alodínea mecânica, também foi possível notar através de abordagens genéticas e moleculares a presença de carga viral HSV-1 em GRD e SC e que o mesmo é capaz de modular diversas vias de sinalização intracelulares como as MPKs, CREB, Stat 3 e glutamina sintetase na SC dos camundongos.

Considerando estudos anteriores, o modelo experimental utilizado nesse trabalho permiti a reprodução de fenômenos que ocorrem durante os períodos herpético e pós herpético (LOESER, 1986; TAKASAKI et al., 2000; INOMATA et al., 2013). É possível observar que até o 8º dia ocorrem sinais e sintomas de alodínia, hiperalgesia e lesões cutâneas, semelhantes ao período herpético e que, neste momento, teriam transcorrido sete dias referentes à inoculação do vírus HSV1, portanto entende-se que os efeitos observados no 8º dia de experimentação se dão em decorrência dos efeitos da infecção viral, e não de um processo inflamatório referente ao procedimento de inoculação. Em um período distante do momento da inoculação viral ainda permaneceu os fenômenos de alodínia e hiperalgesia, o que melhor representou as modificações funcionais das lesões neuropáticas provocadas pela infecção viral. Diante disso, os experimentos referentes ao período pós-herpético foram realizados no 21º dia após a inoculação do vírus HSV1.

Em nosso estudo identificamos o período herpético a partir do 7º dia onde iniciaram as erupções cutâneas no dermatomo correspondente a região de inoculação do vírus com a presença de alodínia e hipernocicepção, após o 10º dia houve a cicatrização das lesões cutâneas e a permanência dos sintomas de alodínia e hipernocicepção térmica até o 28º dia após a inoculação do vírus, portanto conseguimos através desse estudo reproduzir clinicamente em camundongos os fenômenos observados em um quadro de neuralgia herpética e pós-herpética em humanos. Esse período pós herpético é caracterizado por estudos realizados por Inomata et al. (2013) e Loeser (1986) como o momento em que ocorre a cicatrização das lesões porém permanece as alterações sensoriais como os sintomas de hiperalgesia e alodínia (caracterizando assim a dor neuropática pós herpética).

Considerando os períodos herpético e pós-herpético, utilizamos o 8^o e o 21^o dias após a inoculação como parâmetros para análises moleculares. Os animais utilizados para este fim passaram por triagem para confirmar a alodínia e hipernocicepção e, então, somente após a mesma passaram pela eutanásia e extração de GRD de L3-L6 e corno dorsal esquerdo da SC, pois o HSV1 permaneceu latente no GRD do nervo que faz parte do dermatomo infectado e se locomoveu até a SC causando alterações fenotípicas na mesma.

Estudos realizados sobre o vírus HSV-1 evidenciam que após o alojamento do mesmo no GRD da medula o seu deslocamento ocorre a nível anterógrado, ou seja, em direção à pele quando reativado. Não foi encontrado nenhum trabalho que citasse o deslocamento do vírus em direção à medula espinal (WATSON et al., 1991; LOESER, 1986), contudo através desse estudo detectamos uma carga de DNA viral no tecido ganglionar e medular esquerdo de camundongos a partir do 8^o dia até 21^o dia após a inoculação do vírus HSV-1 sugerindo assim a ocorrência do deslocamento viral HSV-1 do gânglio em direção a medula espinal no período herpético que permaneceu até o período pós herpético.

Também foi possível observar uma possível participação das CGS nas alterações de sensibilidade presentes no período pós herpético, através do aumento de expressão da proteína glutamina sintesase, que atua como marcador dessas células gliais. Essa possível participação das células gliais satélites em quadros de dor já foi citado em outros estudos aonde após lesão periférica a mesma reage exibindo alterações morfológicas e liberando mediadores gliais, implicando assim em ativação de mecanismos de sinalização entre os neurônios e as células da glia, aumentando o disparo neuronal induzido pela lesão nervosa (LIU et al, 2012; OHARA & BHARGAVA, 2008) , no estudo de Oha e Bhargava (2008) foi realizado uma axotomia do nervo espinal L4 e após o implante de uma bomba de perfusão de tetrodotoxina (bloqueador de potencial de ação nervosa), foi possível verificar uma redução da ativação das CGS através de imunohistoquímica, o que está de acordo com o nosso achado de participação das CGS no modelo de dor crônica neuropática.

Nesse trabalho também foi possível encontrar uma relação positiva entre a expressão de algumas proteínas com as alterações de sensibilidade presente nos animais (neuralgia herpética e pós herpética). Identificamos uma maior expressão de

AKT, JNK e CREB na forma fosforilada tanto no período herpético (8º dia pós inoculação do vírus HSV-1) quanto pós herpético (21º dia após inoculação do vírus HSV-1) , e uma diminuição da Stat 3 nos mesmos períodos. Em contrapartida a proteína p 38 obteve um aumento da expressão proteica somente na fase herpética e a proteína ERK1 e 2 fosforilada um aumento da expressão proteica somente na fase pós herpética.

Portanto podemos inferir que as alterações de sensibilidade presente no período herpético possui relação com o aumento da expressão das proteína JNK, p38, AKT e CREB e a perduração dessas alterações no período pós herpético possui uma relação positiva com o aumento da expressão da proteína JNK, AKT , ERK 1 e 2 e CREB.

Em 1996 já havia conhecimento da relação: alteração de sensibilidade com aumento da expressão das MAPKs através de um trabalho realizado por Baeuerle e Baltimore. Entretanto nesse presente estudo foi possível identificar uma relação mais específica relacionando a modificação na expressão proteica das MAPKS no tecido medular com a infecção pelo vírus HSV-1 tanto no período herpético quanto pós herpético. Sabe-se que as MAPKs são proteínas quinases ativadas por mitógenos e a ativação das mesmas (uma proteína da família das MAPK) conduz à síntese e libertação de múltiplos mediadores inflamatórios através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFk), responsável por regular a síntese de proteínas envolvidas na via da dor e inflamação, portanto quando as mesmas são ativadas levam a sensibilização nociceptiva na dor inflamatória (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996).

O presente estudo apresentou um aumento na expressão da proteína p38 fosforilada na fase herpética da lesão o que esta de acordo com os resultados encontrados em alguns estudos realizados por Ji e Suter (2007), Makoto et al (2004), Sorkin et al (2008) e Boyle et al (2006), aonde o aumento da mesma teve ocorrência principalmente na fase aguda da lesão.

Ji e Suter (2007) reproduziu um modelo de dor crônica neuropática através de uma lesão de nervo periférico em camundongos, aonde houve um aumento da proteína p 38 do 1º ao 3º dia após a lesão, iniciando a partir do 3º dia uma declinação da expressão da mesma perdurando até a 3ª semana, nesse mesmo estudo foi aplicado nos animais uma única dose de inibidor de p38 no 10º dia após a

lesão o que levou uma reversão no quadro de alodinea por mais de 6 horas com inversão completa do quadro 3 horas após a aplicação, também foi possível observar que injeções múltiplas (1x ao dia) de inibidores de p38 atenuou o quadro de alodinea por vários dias, tendo essa atenuação mantida por mais dois dias após a última aplicação .

Outro estudo realizado por Makoto et al (2004) com modelo de lesão de nervo periférico também mostrou um aumento da expressão da proteína p38 na fase aguda da lesão no corno dorsal da medula de ratos, e uma supressão da alodinia tátil após a administração intratecal do inibidor de p38

Em um modelo de dor inflamatória realizado por Sorkin et al (2009) pode-se relacionar o aumento da expressão da proteína quinase p38 fosforilada no corno dorsal da medula com a alodinia tátil desenvolvida por queimadura de primeiro grau na pata traseira de ratos machos, foi possível visualizar uma concentração elevada de p38 fosforilada após 10 min da queimadura através da imunorreatividade no corno dorsal da medula.

Portanto cada vez mais evidências indicam que a ativação de p38 desempenha um papel importante no desenvolvimento da dor neuropática e inflamatória (BOYLE et al 2006), paralelo a esses resultados alguns estudos vem mostrando que a administração diária de inibidor de p38 via intratecal ameniza o quadro de alodínia mecânica tanto nos sintomas de dores inflamatórias (JIN, WOOLF & JI, 2003; TSUDA et al, 2004) quanto nos sintomas de dor neuropática (WEN, et al 2007; Milligan, et al 2003).

A expressão elevada da proteína AKT na fase aguda (herpética) e crônica (pós herpética) não esta de acordo com outros estudos de neuropatias de origem neuropática ou inflamatória realizados (XU et al, 2007; GUEDES et al, 2008; SUN, YAN & WILLIS 2007), pois esses estudos encontrados evidenciaram um aumento na expressão de AKT principalmente na fase aguda das neuropatias. Portanto podemos inferir que modelos de dor neuropática não seguem sempre o mesmo perfil de ativação proteica, sendo portanto essa ativação dependente do agente causador da neuropatia.

O modelo de dor neuropática através da lesão do nervo periférico na altura de L5 estudado por Xu et al (2007) induziu um aumento da expressão da proteína AKT no gânglio da raiz dorsal ipsilateral a lesão a partir de 12 h após a cirurgia e mantido

até o 3º dia , em contrapartida a injeção intratecal de inibidor de AKT no primeiro dia após a lesão reduziu os sinais comportamentais de dor neuropática além de inibir a ativação da Akt na medula espinal visualizada pela imuno-histoquímica, mostrando assim uma relação direta entre a dor neuropática e a expressão da proteína AKT.

Outro estudo desenvolvido por Guedes et al, 2008 mostrou uma relação linear entre a dor neuropática e o aumento da expressão da proteína kinase AKT em ratos através de um corte transversal no nervo isquiático dos mesmos, aonde no 7º dias após a lesão houve um aumento na expressão da proteína AKT total que voltou a níveis basais a partir do 15º dia após a lesão.

Também foi possível observar um aumento na expressão da proteína kinase AKt em modelo de dor inflamatória aonde após 5 minutos de injeção intradérmica de capsaicina é observado um aumento na expressão da mesma no gânglio da raiz dorsal de ratos. Nesse mesmo modelo é observado uma inibição na mudança do comportamento exploratório do rato após injeção intradérmica de inibidor da AKt (SUN, YAN & WILLIS 2007).

Outros estudos (SORKIN et al, 2009; BOYLE et al 2006; SUN, YAN & WILLIS 2007) relacionam modelos de dor inflamatória aguda com a expressão das MAPKs, um deles foi realizado por Ji et al (2009), que evidenciou um aumento na expressão da ERK no corno dorsal da medula espinhal após 1 minuto de inoculação de capsaicina intraplantar em ratos com um retorno para nível basal em duas horas após a inoculação. Contudo esse estudo segue um modelo de dor inflamatória, diferente do presente estudo, aonde o foco é dor neuropática, fato esse que pode explicar o aumento da fosforilação de ERK na fase crônica da infecção viral (fase pós-herpética) sendo co-responsável pelas alterações de sensibilidades presente nessa fase.

Além da participação das MAPKs nos quadros de dor inflamatória e neuropática como visto anteriormente também podemos relacionar através dos resultados desse estudo um aumento na expressão da CREB (proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc) fosforilada nos períodos herpéticos e pós herpéticos e uma diminuição de Stat 3 (Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3) nos mesmos períodos, contudo na literatura alguns estudos (BREMENT & SLUKA 2013, SONG et al, 2005) trazem um aumento na expressão da CREB somente nos períodos agudos de dor inflamatória e neuropática.

Um estudo realizado por Ji e Rupp (1997) mostrou uma forte fosforilação bilateral de CREB nas lâminas I, II, V, X da medula espinal que atingiu pico dentro de 10 minutos após a injeção de formalina na pata traseira unilateral de ratos, porém essa fosforilação de CREB na medula espinal foi suprimida após anestesia com halotano.

A administração de solução salina ácida no músculo gastrocnêmio também levou a um aumento na expressão de CREB fosforilada (pCREB) no corno dorsal da medula após 24 horas da aplicação e conseqüentemente induziu uma hiperalgesia mecânica bilateral da pata (BEMENT & SLUKA, 2003)

Outro estudo realizado por Dominguez et al (2008) com um modelo de lesão do nervo periférico em L5-L6 mostrou uma aumento na expressão de STAT 3 na forma fosforilada em células microgliais da medula espinal dorsal no 1º e 2º dia após a lesão que se manteve até o 15º dia nas áreas de projeção dos nervos lesionados, essa expressão de fosfo STAT 3 na medula espinal foi diminuída após uma injeção intratecal de anti IL-6, em nosso presente estudo identificamos uma diminuição da expressão proteica de fosfo STAT 3 tanto no período herpético quanto pós herpético o que corrobora os resultados do estudo citado, contudo devemos considerar o fato dos mesmos apresentarem modelos de dor neuropática diferentes, fato esse que pode levar a expressão de diferentes proteínas.

STAT 3 também participa de quadros inflamatórios dolorosos, como no trabalho realizado por Liu et al (2013) aonde após injeção intratecal de lipolissacarídeo os ratos apresentaram um quadro de alodínea mecânica que foi amenizado com a aplicação do inibidor sintético (Stattic) bloqueador da atividade de STAT3 na medula espinal de rato e assim conseqüentemente reverteu a expressão de quimiocinas inflamatórias como IL-6 no corno dorsal da medula.

Podemos evidenciar que ainda há uma escassez na literatura relacionando a dor crônica herpética e pós herpética com a ativação das MAPKs, CREB, Stat 3 e glutamina sintetase sendo assim o presente estudo pode contribuir para o avanço desse conhecimento relacionando a super expressão dessas proteínas com os distúrbios sensitivos e dolorosos de hiperalgesia e alodínea tátil causados pela neuralgia herpética .

Conclusões

6. Conclusões

- Através desse trabalho podemos inferir que o vírus HSV-1 foi capaz de gerar alteração de sensibilidade nos camundongos da linhagem Balb/C caracterizada pela presença de alodínia e hipernocicepção a partir do 7º dia até o 28º dia de inoculação do vírus.

Sendo assim foi possível discriminar o período de neuralgia herpética a partir do 7º dia de inoculação do vírus devido a presença de alteração na sensibilidade e erupções cutâneas, e o período pós herpético após o 21º dia aonde mesmo após a cicatrização das erupções cutâneas permaneceu a alodínia e hipernocicepção.

- Podemos inferir que a vírus se aloja no gânglio onde é capaz de se mover até a medula espinal, podendo provocar alterações fisiológicas a níveis centrais.
- Podemos inferir que há uma relação positiva com o aumento da expressão das proteínas fosforiladas JNK, AKT e CREB e a diminuição da expressão da proteína fosforilada Stat 3 tanto na fase herpética quanto pós herpética com as alterações sensitivas e dolorosas apresentadas nessas fases. Entretanto a proteína fosforilada p38 apresenta-se aumentada somente na fase herpética, e a proteína glutamina e ERK 1 e 2 aumentada somente na fase pós-herpética, portanto podemos relacionar o aumento da proteína p38 somente com as alterações sensitivas e dolorosas apresentadas durante a fase herpética e o aumento de expressão das células da glia e das proteínas ERK 1 e 2 somente com as alterações sensitivas e dolorosas apresentadas durante a fase pós-herpética.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALEY, K. O; MARTIN, A; MCMAHON, T; MOK, J; LEVINE, J. D; MESSING, R. O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **J Neurosci**, v. 21, n.17, p.6933-6939, 2001.
- ANDOH, T; SHIRAKI, K; KUROKAWA, M; KURAISHI, Y. Paresthesia induced by cutaneous infection with herpes simplex virus in rats. **Neurosci Lett**, v.190, n.2, p.101-104, 1995.
- BAEUERLE, P. A; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v.87, n.1, p. 13-20, 1996.
- BASBAUM, A; BUSHNELL, M. A. Pain: Basic Mechanisms, em: Giamberardino, M. A. **Pain 2002 – an updated Review: Refresher Course Syllabus**. 1ed., Seattle, IASP, p.3-7, 2002.
- BEDADALA, G. R; PALEM, J. R; GRAHAM, L; HILL, J. M; FERRIN, H. M; HSIA, S. Lytic HSV-1 infection induces the multifunctional transcription factor Early Growth Response-1 (EGR-1) in rabbit corneal cells. **Virology Journal**. V.8, p.262, 2011.
- BELTRÁN, N. H; MORENO, C. B; HERNÁNDEZ, J. Tratamiento de la neuropatía sensitiva dolorosa asociada al VIH. **Acta Neurol Colomb**. v.32, n.1, p.72-79, 2016.
- BEMENT, M. K. H; SLUKA, K, A. Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections. **The Journal of Neuroscience**,v.23, n.13, p. 5437-5445, 2003.
- BLOOM, D. C; GIORDANI, N. V; KWIATKOWSKI, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochim Biophys Acta**. v. 1799, n.3-4, p.246-256, 2010.
- BOWSHER, D. Pathophysiology of postherpetic neuralgia: towards a rational treatment. **Neurology**, v.45, n.12, p.56-70, 1995.
- BOYLE, D. L; JONES, T. L; HAMMAKER, D; SVENSSON, C. I; ROSENGREN, S; ALBANI, S; SORKIN, L; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **Plos med**, v.3, n.9, p.1616-1624, 2006.

BREIVIK, H; COLLET, B; VENTAFRIDDA, V; COHEN, R; GALLACHER, D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v.10, n.4, p.287–333, 2006.

CAMARENA, V; KOBAYASHI, M; KIM, J. Y; ROEHM, P; PEREZ, R; GARDNER, J; WILSON, A. C; MOHR, I; CHAO, M. V. Nature and duration of growth factor signaling through receptor tyrosine kinases regulates HSV-1 latency in neurons. **Cell Host Microbe**, v.21, n.8, p.320-330, 2010.

CIPRIANO, A; ALMEIDA, D. B; VALL, J. Perfil do paciente com dor crônica atendido em um ambulatório de dor de uma grande cidade do sul do Brasil. **Rev Dor**, v.12, n.4, p.297-300, 2011.

COHRS, R. J; GILDEN, D. H; MAHALINGAM, R. Varicella zoster virus latency, neurological disease and experimental models: an update. **Front Biosci**, v.9, p.751-762, 2004.

COOK, K; STEVENS, J. G. Pathogenesis of herpetic neuritis and gangionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. **Infect Immun**, v.7, p. 272-288, 1973.

COSTA, T. C; LOPES, M; ANJOS, A. C; ZAGO, M. M. F. Neuropatia periférica induzida pela quimioterapia: revisão integrativa da literatura. **Rev Esc Enferm USP**, v.49, n.2, p.335-345, 2015.

COSTA, F. A.L; MOREIRA NETO, F.N. Células gliais satélite de gânglios sensitivos: o seu papel na dor. **Rev. Bras. Anesthesiol.** V.65, n.1, p. 73-81, 2015.

CRUZAT, V. F; PETRY, E. R; TIRAPEGUI, P. J. Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação. **Rev Bras Med Esporte**, v.15, n.5, p.392-397, 2009.

CUMMINS, T. R; DIB-HAJJ, S. D; BLACK, J. A; WAXMAN, S. G. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. **Prog Brain Res**, v.129, p.3–19, 2000.

DOMINGUEZ, E; MAUBORGNE, A; MALLET, J; DESCLAUX, M; POHL, M. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. **J Neurosci**, v.30, n.16, p.5754-5766, 2010.

FANTONI, D. T; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e Controle da Dor. In: FANTONI, D. T; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, 2ª edição, p.323-334, 2002.

FERNANDES, S. R. C; FERNANDES, J. S; TAVARES, J. S; SILVA, FRAGOSO, Y.D. Neuropatia Periférica Dolorosa no Diabetes Mellitus: Atualização Terapêutica. **Rev. Neurociências**, v.9, n.3, p.97-102, 2001.

FÔNSECA F. P. B; BORGES, N. H. P. B.; SILVA, L. D. P; SILVA, R. S. M. Astrócitos: aspectos normais e patológicos das maiores células neurogliais. **X encontro de iniciação à docência**, 2009.

GARRY, E. M; DELANEY, A; ANDERSON, H. A; SIRINATHSINGHJI, E. C; CLAPP, R. H; MARTIN, W. J; KINCHINGTON, P. R; KRAH, D. L; ABBADIE, C; FLEETWOOD-WALKER, S. M. Varicella zoster virus induces neuropathic changes in rat dorsal root ganglia and behavioral reflex sensitisation that is attenuated by gabapentin or sodium channel blocking drugs. **Pain**, v.118, n.1-2, p.97-111, 2005.

GLASER, R; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.3, p.243-251, 2005.

GONZALES, G. R. Post-herpes simplex type-1 neuralgia simulating post herpetic neuralgia. **J Pain Sympt Manag**, v.7 n.5, p.320-323, 1992.

GUEDES, R, P; ARAÚJO, A, S; JANNER, D; BELLÓ-KLEIN, A; RIBEIRO, M. F; PARTATA, W. A; Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. **Cell Mol Neurobiol**, v.28, n.8, p. 1049-1056, 2008.

HILL, J. M; GARZA, H. H; HELMY, M. F; COOK, S. D; OSBORNE, P. A; JOHNSON EM JR; THOMPSON, H. W; GREEN, L. C; O'CALLAGHAN, R. J; GEBHARDT, B. M. Nerve growth factor antibody stimulates reactivation of ocular herpes simplex virus type 1 in latently infected rabbits. **J Neurovirol**, v.3, n.3, p.206-211, 1997.

HOKFELT. T; ZHANG. X; WIESENFELD-HALLIN Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. **Trends Neurosci**, v.17, n.1, p.22-30, 1994.

HSIA, H. C; STOPFORD, C. M; HANG, Z; DAMANIA, B; BALDWIN, A. S. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) regulates host defense and protects mice against herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v.101, n. 4, p.1053-1064, 2017.

HUNT, S. P; MANTH, P. The molecular dynamics of pain control. **Nature reviews**, v.2, n.2, p.83-91, 2001.

INOMATA, Y; GOUDA, M; KAGAYA, K; YAMAGAMI, K; SASAKI, A; ANDOH, T; KURAISHI, Y. Association of denervation severity in the dermis with the development of mechanical allodynia and hyperalgesia in a murine model of postherpetic neuralgia. **Anesthesia and Analgesia**, v.116, n.3, p.722-729, 2013.

ITOI, D; TANAKA, K; DEMBO, T; FUKUUCHI, Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1208-1215, 2001

JI, R. R. Mitogen-activated protein kinases as potential targets for pain killers. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 5, n. 1, p. 71-75, 2004.

JI, R. R. et al. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 12, p. 1114-1119, 1999.

JI, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2002.

JI, R. R; KAWASAKI, Y; ZHUANG, Z. Y; WEN, Y. R; ZHANG, Y. Q. Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain. **Handb Exp Pharmacol**, v.177, p. 359-389, 2007.

JI, R. R; RUPP, F. Phosphorylation of Transcription Factor CREB in Rat Spinal Cord after Formalin-Induced Hyperalgesia: Relationship to Fos Induction. **Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 5, p. 1776-1785, 1997.

JI, R. R; SUTER, M.R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 3, n. 33, p. 1-9, 2007.

JIN, S. X; ZHUANG, Z. Y; WOOLF, C. J; JI, R. R. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 23, n. 10, p. 4017-22, 2003.

KENNEY, A. M; KOCSIS, J. D. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. **J Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 1318-1328, 1998.

KNICKELBEIN, J. E; KHANNA, K. M; YEE, M. B; BATY, C. J; KINCHINGTON, P. R; HENDRICKS, R. L. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 268–271, 2008.

KNIPE, D. M; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 211–221, 2008.

KRAYCHETE, D. C; SAKATA, R. K. Neuropatias Periféricas Dolorosas. **Rev Bras Anestesiol**, v. 61, n. 5, p. 641-658, 2011.

KRAYCHETE, D. C; CALSASANS, M. T. A; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006

KROHEL, G. B; RICHARDSON, J. R; FARRELL, D. F. Herpes simplex neuropathy. **Neurology**, v. 26, n. 6, p. 596-597, 1976.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.

LAIRD, J. M; BENNETT, G. J. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. **J Neurophysiol**, v. 69 n. 6, p. 2072–2085, 1993.

LAYZER, R. B; CONANT, M. A. Neuralgia in recurrent herpes simplex. **Neurology**, v. 31, n. 4, p. 233-237, 1974.

LIU, X. Q; COHEN, J.I. The role of PI3K/Akt in human herpesvirus infection: From the bench to the bedside. **Virology**. v. 479-480, p. 568-577, 2015.

LIU, F. Y; SUN, Y. N; WANG, F. T. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. **Brain Res**. v. 1427, p. 55-77, 2012

LOESER, J. D. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. **Pain**, v. 25, n. 2, p. 149-64 1986.

MAKOTO, T; MIZOKOSHI, A; SHIGEMOTO-MOGAMI, A; SCHUICHI, K; KAZUHIDE, I. Activation of p38 Mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia**, v. 45, n. 1, p. 89–95, 2004.

MARTIN, C; LORETTO, S; CONCHA, M. I; OTTH, C. Herpes simplex virus tipo 1 como factor de riesgo asociado con la enfermedad de Alzheimer. **Rev Med Chile**, v. 139, n. 6, p. 779-786, 2011.

MATZNER, O; DEVOR, M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive NaC channels. **J Neurophysiol**, v. 72, n. 1, p. 349–59, 1994.

MAYER, D. J; MAO, J; HOLT, J; PRICE, D. D. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 14 p. 7731–7736, 1999.

MERKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. In: MERSKEY, H; BOGDUK, N. (editors). Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. IASP task force on taxonomy. Seattle: **IASP Press**; p. 209-214, 1994.

MERKEY, H; ALBE-FESSARD, D; BONICA, J. J; CARMON, A; DUBNER, R.; KERR, F. W. L.; LINDBLOM, U.; MUMFORD, J. M.; NATHAN, P. W.; NORDENBOS, S. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**, v.6, n.3, p.249-252, 1979.

MILLIGAN, E. D; TWINING, C; CHACUR, M; BIEDENKAPP, J; O'CONNOR, K; POOLE, S; TRACEY, K; MARTIN, D; MAIER, S. F; WATKINS, L. R. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **J Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 1026-1040, 2003.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews**, v.10, n.4, p.283-294, 2009.

MOORE, K. A; KOHNO, T; KARCHEWSKI, L. A; SCHOLZ, J; BABA, H; WOOLF, C. J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. **J Neurosci**, v.22, n.15, p.6724-31, 2002.

NURMIKKO, T. J; RAËSAËNEN, A; HAËKKINEN, V. Clinical and neurophysiological observations on acute herpes zoster. **Clin J Pain**, v.6, n.4, p.284-290, 1990.

OBATA, K; YAMANAKA, H; KOBAYASHI, K; DAI, Y; MIZUSHIMA, T; KATSURA, H; FUKUOKA, T; TOKUNAGA, A; NOGUCHI, K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. **J Neurosci**, v. 24, n. 45, p. 10211-10222, 2004.

OHSAWA, K.; IMAI, Y; KANAZAWA, H; SASAKI, Y; KOHSAKA, S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. **Journal of Cell Science**, v.113, n.17, p.3073-3084, 2000.

OMANA-ZAPATA, I; KHABBAZ, M. A; HUNTER, J. C; CLARKE, D. E; BLEY, K. R. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. **Pain**, v.72, n.1-2, p.41-49, 1997.

PALECEK, J; PALECKOVA, V; DOUGHERTY, P. M; CARLTON, S. M; WILLIS, W. D. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. **J Neurophysiol** v.67, n.6, p.1562-1573, 1992.

PENFOLD, M. E; ARMATI, P; CUNNINGHAM, A. L. Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. **Proc Natl Acad Sci**, v.91, n.14, p.6529-6533, 1994.

PORTELLA, A. V. T; SOUZA, L. C. B; GOMES, M. A. Herpes-zóster e neuralgia pós-herpética. **Rev Dor**. São Paulo, v.14, n.3, p.210-215, 2013.

PORTENOY, R. K; DUMA, C; FOLEY, K. M. Acute herpetic and postherpetic neuralgia: clinical review and current management. **Ann Neurol**, v.20, n.6, p.651-64, 1986.

SAMMONS, M. J. et al. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Res**, v.876, n.1-2, p.48-54, 2000.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Rev HCPA**, v.28, n.3, p.177-187, 2008.

SIMMONS, A; NASH, A. A. Zosteriform spread of herpes simplex virus as cause to investigate the role of immunecells in prevention of recurrent disease. **J Virol**, v.52, n.3, p.816-821, 1984.

SINGLETON, K. D; BECKEY, V. E; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Schock**. v.24, n.6, p.583-589, 2005.

SINGLETON, K. D; WISCHMEYER, P. E. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.292, n.5, p. 1839-1345, 2007.

SONG, X.; Jun, C.; XU,Y.B.; HE, J.H.; ZHANG, L.C.; ZENG, Y.M. Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. **Acta Pharmacologica Sinica,** v.26, n.7, p. 789–798, 2005.

SORENSEN, L. N; REINERT, L. S; MALMGAARD, L; BARTHOLDY, C; THOMSEN, A. R; PALUDAN, S. R. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain. **J Immunol.** v.181, n.12, p.8604-8612, 2008.

SORKIN, L; SVENSSON, C. I; JONES-CORDERO, T. L; HEFFERAN, M. P; CAMPANA, W. M. Spinal p38 MAP kinase mediates allodynia induced by first-degree burn in the rat. **J Neurosci Res.** v.87, n.4, p.948–955. 2009.

STRAUS, S. E; OSTROVE, J. M; INCHAUSPE, G; FELSER, J. M; FREIFEL, A; CROEN, K. D. Varicella zoster infections. Biology, natural history, treatment, and prevention. **Ann Intern Med,** v.108, n.2, p.221-37, 1988.

SUN, R.; YAN, J.; WILLIS W, D. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. **Neuroscience.** v. 144, n.1, p.286-94, 2007.

SVENSSON, C. I. et al. Spinal p38 MAP kinase is necessary for NMDA-induced spinal PGE(2) release and thermal hyperalgesia. **Neuroreport,** v. 14, n. 8, p. 1153-1157, 2003.

TAKASAKI, I.; ANDOH, T.; SHIRAKI, K.; KURAIISHI, Y. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **Pain,** v. 86, n. 1-2, p. 95-101, 2000.

TENSER, R. B. Herpes zoster infection and postherpetic neuralgia. **Curr Neurol Neurosci Rep** v.1, n.6, p.526–32, 2001.

THOMPSON, R. L; PRESTON, C. M; SAWTELL, N. M. De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. **PLoS Pathog.** v.5, n.3, 2009.

TSUDA, M. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia,** v. 45, n. 1, p. 89-95, 2004.

WAGNER, E. K; BLOOM, D. C. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.3, p.419–443, 1997.

WANG, K; HOSINO, Y; DOWDELL, K; BOSCH-MARCE,M; MYERS, T, G; SARMIENTO, M; PERNICAK, L; KRAUSE, P, R; COHEN, J.I. Glutamine supplementation suppresses herpes simplex virus reactivation. **The Journal of Clinical Investigation**. v.127, n.7, p.2626-2630, 2017.

WARWICK, R. A; MENACHEM, H. Involvement of aberrant calcium signalling in herpetic neuralgia. **Experimental Neurology**, v.277, p.10-18, 2016.

WATSON, C. P. N; DECK, J; MORSHED, C; VAN DER KOOY, D; EVANS, R. J. Post-herpetic neuralgia: further postmortem studies of case with and without pain. **Pain**, v.44, p.105-117, 1991.

WELLER, T. H. Varicella and herpes zoster: changing concept of the natural history, control, and importance of not-so-benign virus. **N Engl J Med**, v.309, n.23, p.1362-1368, 1983.

WEN, Y. R. et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. **Anesthesiology**, v.107, n.2, p.312-321, 2007.

WILCOX, C. L; SMITH, R. L; FREED, C. R; JOHNSON EM, J. R. Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro. **J Neurosci**. v.10, n.4, p.1268-1275, 1990.

WOOLF, C. J; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, n.5472, p.1765-1769, 2000.

XIAO, H. S; HUANG, Q. H;ZHANG, F. X; BAO, L; LU, Y. J; GUO, C; YANG, L; HUANG, W. J; ZHU, Z. D; ZHANG, X; CHEN, Z; HAN, Z. G. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain.**PNAS**, v.99, n.12, p.8360–8365, 2002.

XU, J. T; TU, H.Y; XIN, W. J; LIU, X. G;ZHANG, G. H;ZHAI, C. H; HONG, Z. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Exp Neurol**. v.206, n.2, p.269-79, 2007.

ZHUANG, Z. Y; GERNER, P; WOOLF, C. J; JI, R. R. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, v.114, n.1-2, p.149-159, 2005.

ZHUANG, Z. Y; WEN, Y. R; ZHANG, D. R; BORSELLO, T; BONNY, C; STRICHARTZ, G. R; DECOSTERD, I; JI, R. R. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **J Neurosci**, v.23, n.13, p.3551-3560, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, 1983.

ZOLINI, G. P. P. Ativação da Resposta Imune Inata Mediada por Receptores do Tipo Toll na Infecção com Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) em Modelo Murino. 2012. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de concentração de Biologia Celular e Molecular) - Pós-graduação em **Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte. 2012.