

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

NAIARA ARAÚJO SILVEIRA

Agonistas α -adrenérgicos modulam canais iônicos
nociceptivos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal

Belo Horizonte

2014

NAIARA ARAÚJO SILVEIRA

Agonistas α -adrenérgicos modulam canais iônicos nociceptivos em neurônios dos gânglios da raiz dorsal

Dissertação submetida ao departamento
de Fisiologia e Biofísica do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Araujo Naves

Co-orientador: Prof. Dr. Christopher Kushmerick

Dedico este trabalho
Ao meu amado esposo Mateus

AGRADECIMENTOS

A Deus, nossa eterna fonte de gratidão;

Aos meus pais, porque família é meu alicerce;

Aos meus colegas de trabalho, pois que conviver é evoluir ideias;

Aos meus orientadores, pela parcimônia e generosidade ao longo deste e outros trabalhos;

Aos mestres em sala de aula, por compartilhar de um saber e de uma experiência de pesquisa inspiradoras;

Aos meus irmãos, amigos e familiares, por serem minhas referências motivadoras de vida e persistência;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, ICB-UFMG, por viabilizar este trabalho;

Ao meu esposo, pelo amor e apoio;

Escolho hoje por esta homenagem recordar em dedicatória e reconhecimento pela concretização deste projeto, que perfaz não apenas neste papel, mas sobretudo em todo o conhecimento que agradecida obtive nesta caminhada. Uma trilha em que o esforço e virtudes em auxiliar-me foi sobremaneira abundante e produtivo. Portanto, regozijo-me com vós outros, porquanto todo o esmero não foi em vão e a honra de apresentar esta dissertação a seguir é uma tarefa cumprida com a certeza de que cada um de vocês foi assaz importante para a obtenção deste feliz resultado.

SUMÁRIO

1.	LISTA DE TABELAS	1
2.	LISTA DE FIGURAS	1
3.	RESUMO	2
4.	ABSTRACT	4
5.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	6
5.1.	Dor e nocicepção.....	7
5.1.1.	Tipos de dor.....	9
5.1.1.1.	Dor nociceptiva.....	9
5.1.1.2.	Dor inflamatória	9
5.1.1.3.	Neuropatias simpáticas	10
5.2.	Receptores Purinérgicos ativados por ATP (família P2X).....	11
5.3.	Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1 (TRPV1).....	12
5.4.	Canais Iônicos Sensíveis a Ácido (ASICs)	13
5.5.	Receptores adrenérgicos.....	14
5.5.1.	Receptores adrenérgicos α	14
5.5.2.	Receptores adrenérgicos β	15
6.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	16
7.	MATERIAIS E MÉTODOS	17
7.1.	Cultura de neurônios.....	17
7.2.	Eletrofisiologia.....	18
7.3.	Protocolo experimental de ativação de correntes iônicas.....	20
7.4.	Protocolos de ativação de potenciais de ação.....	21
7.5.	Análises estatísticas.....	21
8.	RESULTADOS.....	22
8.1.	Correntes iônicas	22
8.1.1.	Receptores purinérgicos da família P2X.....	22
8.1.2.	Receptor Vanilóide de Potencial Transiente tipo 1 e Canais Iônicos Sensíveis a Ácido	23
8.2.	Potenciais de Ação	24
8.3.	Diversidade de tamanho dos corpos celulares dos neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal	25
8.4.	Densidade de correntes registradas em diferentes dias.....	26
8.5.	Fenilefrina.....	28
8.5.1.	Efeito da fenilefrina na densidade de corrente P2X _{não3}	28

8.5.2.	Efeito da fenilefrina sobre as proporções de células responsivas a diferentes estímulos	29
8.5.3.	Proporções de células tônicas versus fásicas mediante tratamento com fenilefrina	30
8.5.4.	Limiares de excitabilidade dos neurônios tratados com fenilefrina	31
8.6.	Clonidina.....	31
8.6.1.	Ação da clonidina na densidade de corrente TRPV1	31
8.6.2.	Efeito da clonidina sobre as proporções de células responsivas a diferentes estímulos	33
8.6.3.	Proporções de células tônicas versus fásicas mediante tratamento com clonidina.....	33
8.6.4.	Limiares de excitabilidade dos neurônios tratados com clonidina..	34
8.7.	Propriedades dos neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal responsivos a ATP, pH sub-fisiológico e capsaicina.....	35
9.	RESUMO DOS RESULTADOS	39
10.	DISCUSSÃO	40
10.1.	Efeito de agonistas adrenérgicos em gânglios da raiz dorsal	40
10.2.	Possíveis mecanismos das interações entre os receptores α 1-adrenérgicos e P2X _{não3} e entre α 2-adrenérgicos e TRPV1	41
10.3.	Características das células responsivas à fenilefrina e à clonidina	43
10.4.	Significado fisiológico da modulação por agonistas adrenérgicos	45
10.5.	Conclusões	45
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12.	AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO.....	56

1. LISTA DE TABELAS

Tabela I - Efeito da fenilefrina na proporção de células com características tônicas versus fásicas.	30
Tabela II - Efeito da fenilefrina no limiar de excitabilidade.	31
Tabela III - Efeito da clonidina na proporção de células com características tônicas versus fásicas.	34
Tabela IV - Efeito da clonidina no limiar de excitabilidade.	35
Tabela V - Propriedades de neurônios responsivos a ATP, a pH sub-fisiológico e a capsaicina.	36
Tabela VI - Síntese dos resultados.	39

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Via ascendente da dor	9
Figura 7.1 - Esquema ilustrativo do sistema de perfusão.	20
Figura 8.1 - Registros representativos de correntes iônicas ativadas por ATP.	23
Figura 8.2 - Correntes representativas ativadas por capsaicina ou baixo pH.	24
Figura 8.3 - Registros representativos de Potenciais de Ação..	25
Figura 8.4 - Correlação entre capacitância e diâmetro dos neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal.	26
Figura 8.5 - Densidade de corrente dos neurônios DRG controles em resposta a diferentes estímulos.	27
Figura 8.6 - A fenilefrina aumenta a densidade de corrente $P2X_{n\tilde{a}o3}$ sem alterar as densidades de correntes provocadas por capsaicina e baixo pH em neurônios sensitivos primários.	29
Figura 8.7 - Ação da clonidina, agonista $\alpha 2$ -adrenérgico, em neurônios sensitivos primários.	32
Figura 8.8 - Histograma de distribuição por tamanho dos neurônios controles e neurônios tratados com fenilefrina.	37
Figura 8.9 - Distribuição por tamanho dos neurônios controles e neurônios tratados com clonidina.	38

3. RESUMO

A noradrenalina e a adrenalina circulante, através da ativação dos receptores α - e β -adrenérgicos, estão envolvidas no controle intrínseco da dor. No sistema nervoso periférico, a estimulação simpática pode excitar os neurônios sensoriais em animais com tecidos inflamados ou após a lesão do nervo periférico. Além disso, modelos de dor neuropática geralmente estão associados a um aumento do tônus simpático das fibras que inervam os Gânglios da Raiz Dorsal (DRG), o que sugere a existência de interações entre a atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e neurônios aferentes primários sob condição dolorosa.

Alterações na sensibilidade a estímulos nociceptivos podem ser causadas por mudanças nas propriedades dos canais iônicos dos neurônios sensitivos aferentes primários. Por exemplo, a noradrenalina aumenta a frequência de disparos em neurônios nociceptores via ativação de adrenoreceptores α -1 (Zhang et al., 2011). No entanto, sabe-se pouco dos efeitos da ativação de receptores α -adrenérgicos sobre as moléculas que iniciam a transdução do estímulo em nociceptores primários. Para verificar isso, testamos se a ativação de receptores adrenérgicos modula os canais iônicos ativados por ligantes expressos em neurônios sensitivos. Além disso, procuramos alterações em parâmetros dos Potenciais de Ação (PA) que podem determinar a sensibilidade dos neurônios a estímulos nocivos. Desse modo, o objetivo deste estudo é identificar a existência de interações entre agonistas α -adrenérgicos e canais iônicos capazes de transformar estímulos nocivos em sinais elétricos propagáveis nos neurônios DRG, como os receptores TRPV1 (Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1), os P2X (Canais Purinérgicos Ativados por ATP) e os ASICs (Canais Iônicos Sensíveis a Ácido).

Neste trabalho, utilizamos neurônios dissociados dos DRG de ratos Wistar machos com peso de 220-280g. As células dissociadas foram tratadas com agonistas adrenérgicos, fenilefrina (α 1; 1 μ M) ou clonidina (α 2; 10 μ M), e os respectivos grupos controles receberam o veículo de diluição dos agonistas. Os registros eletrofisiológicos foram realizados entre 24-96 horas após a cultura.

Os registros eletrofisiológicos foram realizados utilizando a técnica de *patch clamp* na modalidade *whole-cell: voltage clamp* para registro de correntes iônicas e *current clamp* para o registro de potenciais de ação e dos limiares de excitabilidade dos neurônios. Para provocar as diferentes correntes iônicas, foram feitas aplicações rápidas (2 segundos) de capsaicina (3 μ M), ATP (50 μ M), pH=7 ou pH=6. Essas soluções ativam correntes iônicas via receptores TRPV1, P2X e ASICs, respectivamente.

A fenilefrina aumentou a densidade de corrente P2X_{não3} de -21 ± 6 pA/pF, (média $\pm$ EPM, n=22) no controle para -51 ± 11 pA/pF, n=24 ($p < 0,05$). Além disso, a fenilefrina aumentou em 95% ($p < 0,05$) o limiar de excitabilidade dos neurônios com correntes ASIC acionadas por solução de pH6. A clonidina reduziu a corrente disparada por capsaicina de -218 ± 24 pA/pF (n=53) para -146 ± 26 pA/pF, n=44 ($p < 0,05$). Nenhum efeito significativo da fenilefrina ou da clonidina foi observado em correntes ativadas por ácido (pH=7.0 ou pH=6.0), nem na proporção de células responsivas aos diferentes estímulos (ATP, capsaicina e baixo pH) e nem na proporção de células com características tônicas versus fásicas.

Nossos resultados sugerem que a ativação dos α -adrenoceptores modula duas importantes moléculas transdutoras nociceptivas. Esse efeito é evidenciado pelo aumento da densidade de corrente P2X_{não3}, na presença de fenilefrina (agonista adrenérgico α -1) e pela redução da densidade de corrente mediada pelos receptores TRPV1, na presença de clonidina (agonista α -2 adrenérgico).

4. ABSTRACT

Noradrenalin and the circulating adrenaline, through the activation of α - and β -adrenergic receptors are involved in the intrinsic control of pain. In the peripheral nervous system, sympathetic stimulation can excite sensory neurons in animals with inflamed tissues or after peripheral nerve injury. Furthermore, models of neuropathic pain are usually associated with an increased sympathetic tone of the fibers innervating the Dorsal Root Ganglia of (DRG), which suggests the existence of interactions between the activity of the sympathetic nervous system (SNS) and primary afferent neurons under painful condition.

Changes in sensitivity to noxious stimuli may be caused by changes in the properties of ionic channels of primary afferent sensory neurons. For example, noradrenaline increases the firing rate of nociceptors neurons via activation of α 1-adrenoceptors (Zhang et al., 2011). However, known about the effects of activation of α -adrenergic receptors on molecules that initiate the transduction of the stimulus in primary nociceptors. To verify that, we tested whether activation of adrenergic receptors modulates ion channels activated by ligands expressed in sensory neurons. In addition, we seek changes in parameters of Action Potential (PA) that can determine the sensitivity of neurons to noxious stimuli. Thus, the aim of this study is to identify the existence of interactions between α -adrenergic agonists and ion channels that transform noxious stimuli into electrical signals to be propagated in DRG neurons, channels such as TRPV1 receptors (Transient Receptor Potential Vanilloid type 1), P2X (Purinergic channels, activated by ATP) and ASICs (Acid-Sensing Ion Channels).

In this work, we used the DRG neurons dissociated from male Wistar rats weighing 220-280g. The dissociated cells were treated with adrenergic agonists, phenylephrine (α 1; 1 μ M) or clonidine (α 2; 10 μ M), and the respective control groups received the vehicle dilution of agonists. Electrophysiological recordings were performed between 24-96 hours after culture.

Electrophysiological recordings were performed using the patch clamp technique in whole-cell mode: voltage clamp to record ionic currents and current clamp to record action potentials and excitability thresholds of neurons. To elicit the ionic currents, fast application (2 seconds) of capsaicin (3 μ M), ATP (50 μ M),

pH = 7 and pH 6 were made. These solutions activate ionic currents via TRPV1, ASICs and P2X receptors, respectively.

Phenylephrine increased $P2X_{n\alpha o3}$ current density from -21 ± 6 pA/pF (mean $\pm$ SEM, n=22) in control to -51 ± 11 pA/pF, n=24 ($p < 0.05$). Furthermore, phenylephrine increased by 95% ($p < 0.05$) neuronal excitability threshold of neurons with ASIC currents triggered by pH6's solution. Clonidine reduced capsaicin-evoked current from -218 ± 224 pA/pF (n=53) to -146 ± 26 pA/pF, n=44 ($p < 0.05$). No significant effect of clonidine and phenylephrine were observed in acid activated currents (pH = 7.0 or pH = 6.0) or the proportion of cells responsive to different stimuli (ATP, capsaicin and low pH), or the proportion of cells with characteristics tonic versus phasic.

Our results suggest that activation of α -adrenoceptors modulates two important transducing nociceptive molecules. This effect was evidenced by the increased $P2X_{n\alpha o3}$ current density in the presence of phenylephrine (α -1 adrenergic agonist) and the reduction of the current density mediated by TRPV1 receptors in the presence of clonidine (α -2 adrenergic agonist).

5. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O sistema noradrenérgico modula a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto na periferia. No SNC, as vias adrenérgicas originárias do tronco cerebral inibem estímulos nociceptivos na medula espinhal (PROUDFIT, 1988; JONES, 1991; BUDAI; HARASAWA; FIELDS, 1998). Na periferia, a noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos pós-ganglionares produz hiperalgesia ou alodínia (BARON, 2000). Os efeitos periféricos da noradrenalina são geralmente associados com a lesão, que promove mudanças na expressão dos receptores noradrenérgicos, brotamento de fibras nervosas simpáticas e modificações de canais iônicos em nociceptores (PERTOVAARA, 2013). Além disto, a simpatectomia cirúrgica ou farmacológica alivia comportamentos hiperalgésicos e alodínicos em vários modelos de dor patológica em ratos (CHUNG *et al.*, 1996) e em humanos (JÄNIG; BARON, 2003).

Receptores purinérgicos (P2X), receptor vanilóide (TVPR1) e os canais iônicos ativados por ácido (ASIC) são moléculas envolvidas na transdução de estímulos nociceptivos em neurônios sensoriais primários (MCCLESKEY; GOLD, 1999). Tem sido demonstrado que a noradrenalina aumenta a expressão de receptores P2X₃ e a taxa de disparo de potenciais de ação nos neurônios dos gânglios da dorsal raiz (DRG) (TAN; SUN; ZHANG, 2011). A noradrenalina também aumentou correntes P2X e mRNAs de receptores adrenérgicos em neurônios DRG (MARUO *et al.*, 2006). Neste trabalho, nós utilizamos agonistas α -1 e α -2 para identificar os tipos de receptores envolvidos na modulação adrenérgica da atividade dos canais P2X.

A noradrenalina aumenta a liberação de substância P provocada por capsaicina mediante estimulação dos receptores α 1-adrenérgicos (WANG *et al.*, 2011). A clonidina, um agonista α -2, diminuiu a expressão de mRNA de VR1 e a liberação de SP disparada por capsaicina (GONG *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que a estimulação do receptor adrenérgico α -1 aumenta a atividade do VR1, enquanto que a estimulação dos receptores α -2 reduz esse mesmo

parâmetro. Neste estudo, nós testamos essa hipótese através do registro de correntes VR1 na presença de diferentes agonistas α -adrenérgicos.

Os receptores α -1 são acoplados à proteína Gq e os receptores α -2 são acoplados à proteína Gi. A ativação da Gq aumenta a PKC (WU *et al.*, 1992), enquanto que a ativação da Gi diminui a PKA (GILMAN, 1987). Os ASICs podem ser modulados pela PKC (XIONG *et al.*, 2013) e pela PKA (LEONARD *et al.*, 2003). Nós então, testamos a hipótese de que os ASICs possam ser modulados por receptores α -adrenérgicos.

5.1. Dor e nocicepção

A dor representa 44% das razões de busca por atendimento em serviços de emergência (KOSINSKI, 2014). É importante ressaltar que a dor não é apenas uma sensação ruim, mas também uma modalidade sensorial complexa essencial à sobrevivência. Existem casos raros de pessoas insensíveis à dor e que, por isso, têm expectativa de vida curta (GARDNER; GOLDBERG, 2007). A detecção de estímulos com potencial para causar lesões nos tecidos é muito importante para deflagrar respostas comportamentais que protegem o organismo de danos iminentes nos tecidos. Estas consistem em reações reflexas e também em ações preventivas contra estímulos que podem causar danos nos tecidos como, por exemplo, forças mecânicas fortes, temperaturas extremas, falta de oxigênio e exposição a determinados químicos.

Aristóteles (384 a.C. - 322a.C.) definiu a dor como sendo uma sensação de “desgosto”, oposta ao prazer, sentida no coração. Tempos depois, no início da idade moderna o filósofo francês René Descartes (1596-1650) propõe uma teoria científica com o conceito de “cordões em feixes” que conduzem a dor dos tecidos ao cérebro. Essa teoria abriu as portas para que a neurociência começasse a explicar os mecanismos dolorosos.

Em 1973, a IASP (Associação Internacional para o Estudo da dor) cunhou a importante definição da dor como “uma experiência sensorial e emocional

desagradável associada a lesões reais ou potenciais de tecidos ou descrita em termos de tais lesões”, que ainda hoje é utilizada pelos pesquisadores. Essa definição foi importante, pois pela primeira vez ficou implícito que dor nem sempre é uma consequência de dano tecidual, e pode ocorrer sem ele, como em casos de dor neuropática.

Enquanto a dor está relacionada à percepção de um sentimento, emoção ou sensação, o termo nocicepção (do latim nocere, “doer”) refere-se ao processo sensorial-somático desencadeado. Nas pesquisas realizadas em modelos animais de dor, por exemplo, utiliza-se a terminologia “nocicepção” para referir-se às respostas aos estímulos lesivos e/ou dolorosos, pois não se sabe exatamente qual é a sensação subjetiva real experimentada pelo animal. Nesses estudos, são estabelecidas escalas de respostas nociceptivas para avaliar o nível de nocicepção em resposta a diferentes intensidades de determinado estímulo nociceptivo. O estímulo nocivo utilizado por alguns métodos nociceptivos pode ser de origem térmica, como no método de retirada da cauda (“*tail-flick*”) (D’AMOUR; SMITH, 1941), ou química, métodos de contorção abdominal (KOSTER; ANDERSON; BEER, 1959).

A **Figura 5.1** é um esquema da via ascendente da dor, na qual os estímulos nocivos iniciam-se na periferia através de receptores nociceptivos aferentes primários, presentes nos gânglios da raiz dorsal (DRG, do inglês Dorsal Root Ganglia). Esses neurônios fazem sinapse na medula com neurônios de segunda ordem que transmitem a informação nociceptiva até o tálamo, e, em seguida, neurônios de terceira ordem levam os sinais ao córtex. Nesta estrutura essas informações são interpretadas como uma sensação dolorosa. Os nociceptores periféricos (os corpos celulares, axônios e terminações) são dotados de canais para captar os estímulos nocivos, dentre eles os ASICs, TRPV1 e receptores purinérgicos P2X.

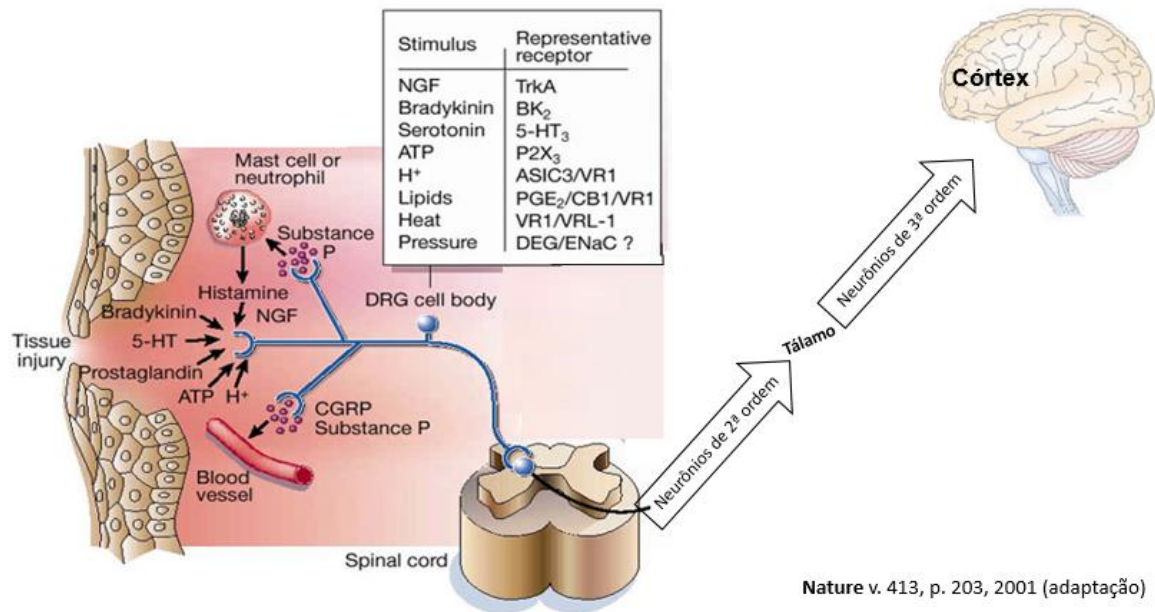


Figura 5.1 - Via ascendente da dor

5.1.1. Tipos de dor

5.1.1.1. Dor nociceptiva

Esse tipo de dor envolve estímulos ascendentes transmitidos ao longo de receptores sensoriais, e que trafegam pelas vias espinotalâmicas da medula espinhal e compreende as dores somáticas (geralmente bem localizada) e viscerais (comumente conhecida por ser um tipo de dor difusa ou referida). (LAMONT; TRANQUILLI; GRIMM, 2000)

5.1.1.2. Dor inflamatória

A dor inflamatória também é transmitida através de via neuronal nociceptiva, porém uma lesão tecidual desencadeia a ativação de mediadores inflamatórios agudos e crônicos que potencializam a dor, reduzem o limiar de

excitabilidade e sensibilizam o sistema nervoso central para o estímulo que chega até ele (SCHULTE; SOLLEVI; SEGERDAHL, 2004).

5.1.1.3. Neuropatias simpáticas

A dor crônica afeta um sexto da população. A expressão "dor neuropática" entrou em uso comum apenas a partir dos anos 2000, e desde então tem sido empregada para designar dor de origem neural. É uma fonte frequente de dor crônica, perdendo apenas para a osteoartrite como causa deste tipo de dor. A dor neuropática é portanto, uma consequência de uma patologia do sistema nervoso.

A cadeia de gânglios simpáticos paravertebrais é paralela aos gânglios da raiz dorsal (DRG) nas regiões torácica e lombar. Os neurônios DRG recebem inervações simpáticas. Após a lesão de um nervo periférico, há aumento do tônus simpático e de inervações simpáticas que chegam aos neurônios DRG (brotamento simpático), além de alterações na sensibilidade de canais iônicos e na excitabilidade neuronal (PERTOVAARA, 2013). Esse conjunto de características desencadeiam um quadro de dor neuropática.

A vulnerabilidade à dor parece variar de indivíduo para indivíduo, de nervo para nervo, entre machos e fêmeas, e mesmo com a idade. O que parece ser a mesma lesão pode não provocar dor em uma pessoa, porém gerar dor severa em outra. Além da dor sem lesão (ou seja, dor independente de estímulo), os indivíduos podem apresentar dor aumentada aos estímulos aplicados à sua pele. Esse é um caso de hiperalgesia, na qual o limiar da dor é reduzido, como por exemplo, em resposta à inflamação tecidual (HARGREAVES et al., 1988). Em alguns pacientes, o toque suave à pele pode provocar dor. Esta dor ao toque leve é conhecida como alodínia (CAMPBELL; MEYER, 2006).

Por definição, a dor neuropática é originada de uma lesão do sistema nervoso em decorrência de inúmeras doenças, como doenças autoimune (esclerose múltipla), doenças metabólicas (neuropatia diabética), infecção (herpes zoster - cobreiro), doença vascular (AVC), traumas, e câncer. Uma regra sem exceção é que a lesão, que desencadeia a dor neuropática levando a dor

deve envolver diretamente as vias nociceptivas. Essas vias são dotadas de receptores capazes de identificar os diferentes estímulos nocivos e transformá-los em impulsos elétricos propagáveis pelas células excitáveis.

5.2. Receptores Purinérgicos ativados por ATP (família P2X)

Os receptores purinérgicos P2X são canais iônicos acionados por ATP, que medeiam influxo de Na^+ , efluxo de K^+ e, em extensões variadas, influxo de Ca^{2+} , desencadeando a despolarização da membrana celular (BEAN, 1992; DUBYAK; EL-MOATASSIM, 1993; NORTH, 1996). A permeabilidade desses canais ao íon cálcio é relativamente elevado, variando de 2,7% (P2X_3) a 12,4% (P2X_1) do total da corrente induzida por ATP (EGAN; KHAKH, 2004).

Sete genes distintos codificam as sete subunidades (P2X_{1-7}) do receptor P2X clonadas em meados dos anos 90 (NORTH, 1996). Todas as subunidades P2X compartilham uma estrutura similar que consiste em dois domínios transmembrana (TM1 e TM2), uma alça extracelular relativamente grande, e as terminações N- e C- intracelulares (BRAKE; WAGENBACH; JULIUS, 1994; VALERA *et al.*, 1994; NEWBOLT *et al.*, 1998). Quando emparelhados, os aminoácidos das sete subunidades dos receptores P2X de mamíferos apresentam similaridade entre 25-48% (NORTH, 2002).

Os receptores P2X são ativados pelo ATP presente do lado de fora das células, ou seja, no líquido intersticial. Muitos tipos celulares liberam ATP, dentre eles estão os nervos simpáticos, células endoteliais, células de Merkel e células tumorais (BURNSTOCK; WOOD, 1996). Os receptores P2X realizam muitas funções importantes nos sistemas nervosos central e periférico, dentre elas a geração de sinais dolorosos (COCKAYNE *et al.*, 2000; DORN *et al.*, 2004; TSUDA *et al.*, 2003). A administração de ATP intra-plantar em animais desencadeou comportamentos tipicamente nociceptivos como lambar e levantar a pata que recebeu a substância (BLAND-WARD; HUMPHREY, 1997). Desse modo, de maneira direta ou indireta todas as subunidades P2X estão envolvidas com o processo nociceptivo.

5.3. Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1 (TRPV1)

Os receptores vanilóides do tipo 1 pertencem à superfamília de Receptores Potenciais Transientes (TRP – sigla do inglês) que compreende nove tipos de canais iônicos sensíveis à temperatura conhecidos até o momento (BIRNBAUMER; YIDIRIM; ABRAMOWITZ, 2003; VOETS *et al.*, 2005). A superfamília TRP é dividida em subfamílias com base nas similaridades de suas sequências de aminoácidos. Dentro dos nove tipos de TRP, quatro pertencem à subfamília TRPV – V de vanilóide – (TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4). Devido às suas propriedades como canal iônico, esses nove canais são ativados por diferentes limiares de temperatura, além de outras características específicas de cada um deles.

Especificamente, o receptor TRPV1 é uma molécula nociceptiva chave localizada nos neurônios nociceptivos aferentes primários dos DRG que iniciam a dor neurogênica. Os TRPV1 são canais catiônicos não-seletivos excitatórios com uma preferência pelos íons cálcio (TOMINAGA *et al.*, 1998). O TRPV1 é conhecido por mediar as ações da capsaicina, o princípio ativo das pimentas do gênero *Capsicum*, e seus análogos (VRIENS; NILIUS; VENNEKENS, 2008) e dois estímulos físicos nocivos: alterações de temperatura ($>43^{\circ}\text{C}$) (CATERINA *et al.*, 1997) e redução de pH ($\text{pH}<5.9$) (TOMINAGA *et al.*, 1998). Os TRPV1 são predominantemente expressos em neurônios sensoriais (CATERINA *et al.*, 1997) e considera-se que eles desempenhem um papel fundamental como sensor de temperatura e na nocicepção (CATERINA *et al.*, 2000), o que os qualifica como um alvo molecular para o tratamento da dor.

5.4. Canais Iônicos Sensíveis a Ácido (ASICs)

Os Canais Iônicos Sensíveis a Ácido (ASICs, sigla do inglês Acid Sensing Ion Channels) são receptores ionotrópicos acionados por próton extracelular. Estes canais apresentam poro seletivo a cátions ($\text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+$) (WALDMANN *et al.*, 1997). Os ASICs são sensíveis à amilorida, são independentes de voltagem e pertencem à superfamília de canais de Na^+ epitelial/degenerina (DEG/ENaC). Os canais funcionais dessa superfamília são formados por quatro subunidades, que podem ser idênticas (canal homomultimérico) ou diferentes (canal heteromultimérico) (ALVAREZ *et al.*, 2000).

Após a clonagem e a caracterização da primeira subunidade ASIC (ASIC1a) descoberta em 1997 (WALDMANN *et al.*, 1997), seis subunidades adicionais do ASIC (1b1, 1b2, 2a, 2b, 3 e 4) foram identificadas (WEMMIE; PRICE; WELSH, 2006). Os ASICs são expressos nos gânglios da raiz dorsal e são amplamente distribuídos por todo o cérebro (WALDMANN *et al.*, 1997). Os canais ASICs formados por essas diferentes subunidades apresentam sensibilidade ao pH extracelular, cinética de sensibilização e de dessensibilização diferentes (HESSELGER; TIMMERMANN; AHRING, 2004).

Os ASICs são ativados em uma ampla faixa de pH: o ASIC3, por exemplo, é muito mais sensível que qualquer outro ASIC: nas condições iônicas fisiológicas, pH 7.4, o ASIC3 começa a abrir quando o pH atinge 7.1, e é completamente ativado em torno de pH 6.5. (WALDMANN *et al.*, 1997; YAGI *et al.*, 2006; BIRDSOONG *et al.*, 2010; DEVAL *et al.*, 2010). Esse receptor é essencialmente quatro vezes mais sensível que um pHmetro (SUTHERLAND *et al.*, 2001). Por outro lado, os ASIC2 necessitam de pH extremamente baixo (pH 5 ou mais baixo) para serem ativados. As isoformas ASIC1 e ASIC3 são abertos por alterações de pH que são fisiologicamente mais relevantes (entre pH6 e pH7) (NAVES; MCCLESKEY, 2005).

5.5. Receptores adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos fazem parte de uma grande família de receptores acoplados à proteína G, os quais medeiam os efeitos funcionais das catecolaminas endógenas, a adrenalina e a noradrenalina. Os adrenoceptores são divididos em subtipos: três receptores β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), três $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$) e três $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$) (SORRIENTO *et al.*, 2011).

5.5.1. Receptores adrenérgicos α

5.5.1.1. Receptores adrenérgicos $\alpha 1$

Os receptores $\alpha 1$ são acoplados à proteína Gq e utilizam uma variedade de segundos mensageiros para modular suas funções celulares. Estudos com vários tipos celulares demonstraram que todos os receptores $\alpha 1$ ativam as fosfolipases C (PLC) (PEREZ; DEYOUNG; GRAHAM, 1993). Além da mobilização do cálcio intracelular, os adrenoceptores $\alpha 1$ têm mostrado ativar influxo de cálcio através da ativação de canais de cálcio dependente e independente de voltagem (MINNEMAN, 1988). A ativação da PLC promove a clivagem do fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) gerando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). O DAG e o IP3 promovem a ativação da proteína quinase C (PKC) que age fosforilando seus alvos específicos, por exemplo, determinados canais iônicos (BOUE-GRABOT; ARCHAMBAULT; SEQUELA, 2000; CHOW; WANG, 1998).

5.5.1.2. Receptores adrenérgicos α_2

Os receptores α_2 são acoplados à proteína G_i que quando ativada inibe a adenilato ciclase e, portanto, reduz a formação de AMPc e, consequentemente, diminui a quantidade de proteína quinase A (PKA) ativa disponível no citoplasma. Esta redução pode impedir a ação da PKA em receptores de membrana ionotrópicos específicos, tornando-os menos sensíveis aos seus ligantes, o que pode ser observado por um menor fluxo de íons através dos poros dos canais (BHAVE et al., 2002).

5.5.2. Receptores adrenérgicos β

A sinalização dos receptores adrenérgicos β acoplados à proteína G estimulatória, G_s , leva à ativação da adenilato ciclase (AC) e ao acúmulo do segundo mensageiro AMPc que ativa PKA (DIXON et al., 1986).

6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A dor afeta grande parte da população. É uma causa que leva muitas pessoas aos hospitais. A hiperestimulação adrenérgica é um quadro comum nas síndromes dolorosas periféricas. Por esta razão é muito importante o estudo dos mecanismos adrenérgicos envolvidos com o processamento dos estímulos nocivos.

Considerando que os neurônios sensoriais primários dos DRG expressam em suas membranas celulares receptores α -adrenérgicos, além de canais iônicos acionados por ligantes como os TRPV1, ASICs e P2X, nossa hipótese é verificar se existe interação entre os receptores α -adrenérgicos presentes nos DRG e canais iônicos supracitados. Conforme descrito na introdução, algumas interações entre estas moléculas já tem sido sugeridas na literatura, e nós especificamente objetivamos estudar:

- 1- Os subtipos de receptores envolvidos na ativação alfa-adrenérgica de canais P2X.
- 2- Se há modificação nas correntes iônicas através de receptores TPRV1 por agonistas adrenérgicos.
- 3- Se agonistas adrenérgicos modulam canais ASIC.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em neurônios dissociados dos gânglios da raiz dorsal (DRG) de nove ratos Wistar machos (220-280g), através do uso da técnica de *patch clamp*. Esses animais foram obtidos do Biotério de Criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal), cujo número do protocolo é 169/2011.

7.1. Cultura de neurônios

Os animais foram sacrificados por guilhotinamento e os DRG foram dissecados e mantidos em solução salina (sem cálcio e sem magnésio) tamponada com HEPES (HBS) contendo (em mM): NaCl 140; KCl 2,5; HEPES 10 e glicose 7,5. E o pH é ajustado para 7.4 com NaOH.

O tecido conjuntivo ao redor dos gânglios foi removido e os DRG foram seccionados antes de serem incubados a 37°C em tubos de centrifugação com HBS contendo Papaína (1mg/mL, Sigma), ativada por cisteína (0,03mg/mL, Sigma) onde permaneceram durante 20 minutos, e foram delicadamente agitados a cada 5 minutos visando uma maior eficiência do processo enzimático. Posteriormente os DRGs foram centrifugados para a remoção do sobrenadante. Em seguida, HBS contendo Colagenase (2,5 mg/mL, tipo 1A - Sigma) foi adicionada e o procedimento de incubação e centrifugação foram repetidos. E finalmente foi adicionado HBS apenas para retirar o excesso de enzimas em contato com os DRGs que foram novamente centrifugados e o sobrenadante é removido.

Após a finalização desse processo enzimático, 1,5 mL do meio de cultura F12 (Cultilab) contendo 1% de antibióticos (penicilina e streptomicona) e 10% de soro fetal bovino (Gibco) foi adicionado para interromper a ação enzimática. Em seguida os DRGs foram submetidos à trituração mecânica, realizada pelo

cisalhamento em pipetas de Pasteur de vidro, com as pontas polidas ao fogo até atingir o diâmetro interno de 2 mm. Posteriormente, foram adicionados mais 1,5 mL de HBS, então as células foram centrifugadas para que os “débris” resultantes da trituração fossem descartados juntamente com o sobrenadante. Depois disso, o pellet constituído de neurônios dissociados foi ressuspensionado em F12. Assim, essas células em suspensão foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (5 mm de diâmetro) previamente tratadas, para que as células pudessem aderir-se às lamínulas de vidro. Esse tratamento foi feito com poli-L-lisina (Sigma, 20 µg/mL, 24h a 4°C), substância que polariza negativamente o vidro da lamínula possibilitando uma interação eletrostática entre o vidro e lado externo dos neurônios que possui um pequeno excesso de carga positiva, e com laminina (Sigma, 20 µg/mL, 2h a 4°C), substância que fornece uma lâmina basal para melhor acomodamento das células ao fundo da lamínula. Desse modo, as células foram mantidas em ambiente aquecido e umidificado (37°C, 5% CO₂) por 2 horas. Após esse procedimento, o meio de cultura F12 foi substituído por L15 (Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/mL - Sigma) e estreptomicina (100 µg/mL - Sigma).

As células em cultura foram mantidas em temperatura ambiente, e foram divididas em dois grupos: O grupo experimental que recebeu agonista adrenérgico fenilefrina (1 µM), (R)-(-)-Phenylephrinehydrochloride, Sigma (P6126), ou clonidina (10 µM), Clonidinehydrochloride, Sigma (C7897) e o grupo controle que recebeu água deionizada, o veículo de diluição dos agonistas. Os agonistas foram adicionados ao meio de cultura no dia da cultura e também dois dias após a cultura quando o meio de cultura foi trocado.

7.2. Eletrofisiologia

Os registros eletrofisiológicos foram realizados de 24 a 96h (cada dia durante 4 dias) após a cultura, sendo sempre feitos de maneira intercalada, uma célula controle e em seguida uma célula tratada com um dos agonistas α-adrenérgicos. Assim, as correntes iônicas e os potenciais de ação foram

registrados utilizando a técnica de patch clamp na modalidade whole-cell (Hamill et al. 1981; Priel et al. 2007), em temperatura ambiente. As células foram visualizadas em aumento de 400x utilizando um microscópio invertido (Olympus modelo CK2). O posicionamento da micropipeta foi realizado através de um micromanipulador Narishige (Tokio, Japan). As correntes foram registradas através de um amplificador (Axopatch 200B – AxonInstruments, USA) ligado a um conversor analógico-digital (Digidata 1200 series, AxonInstruments, USA), gerenciado pelo aplicativo pClamp 8.2 (AxonInstruments, USA).

Pipetas com resistência entre 0,9 e 1,2M Ω foram fabricadas a partir de capilares de vidro (Patch Glass, PG150T-7,5, Warner Instrument) usando um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP 830 Narishige, Tokio, Japan). As pipetas foram cobertas com cera dental até aproximadamente 0,1mm da ponta, a fim de reduzir a sua capacitância elétrica (Moraes et al., 2009) e preenchidas com a seguinte solução (em mM): KCl 30; K-gluconato 110; NaCl 4; HEPES 10; EGTA 11; MgCl₂ 5; MgATP 2; NaGTP 0,3. E o pH acertado para 7.0 com KOH. A solução externa era composta de (em mM): NaCl 140; KCl 2,5; CaCl₂ 2,0; MgCl₂ 1,0; HEPES 10,0; MÊS 10,0; Glicose 7,5), pH 7,4.

Dando continuidade ao processo da técnica de *patch-clamp*, após a obtenção de um selo de alta resistência (*Giga Seal*) e da ruptura da membrana para obtenção da modalidade *whole-cell*, as células foram mantidas em -70mV. Para disparar as diferentes correntes iônicas, a perfusão do neurônio pela solução fisiológica pH7.4 foi substituída por uma aplicação rápida (2 segundos) da mesma solução, porém contendo capsaicina 3 μ M (Baumann et al., 1996; Caterina et al., 1997; Hiura et al., 2009), ATP 50 μ M (Burnstock & Wood, 1996; Shinoda et al., 2010), pH=7 ou pH=6, ajustados com NaOH, (McCleskey & Gold, 1999; Poirot et al., 2006; Yagi et al., 2006; Gründer & Chen, 2010). Essas soluções ativam correntes iônicas via receptores TRPV1 (Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1), P2X (Canais Purinérgicos Ativados por ATP) e ASICs (Canais Iônicos Sensíveis a Ácido), respectivamente.

A **Figura 7.1** esquematiza a aplicação das soluções experimentais, que foi realizada por meio de um sistema de perfusão, cujo fluxo é de 1mL/min,

constituído por capilares de vidro (comprimento: 45mm, diâmetro interno: 0,7mm) acoplados a válvulas solenóides. O programa *pClamp 8.2* controla o acionamento das válvulas de acordo com o tempo de abertura, exatamente 2 segundos, e qual solução deve ser aplicada.

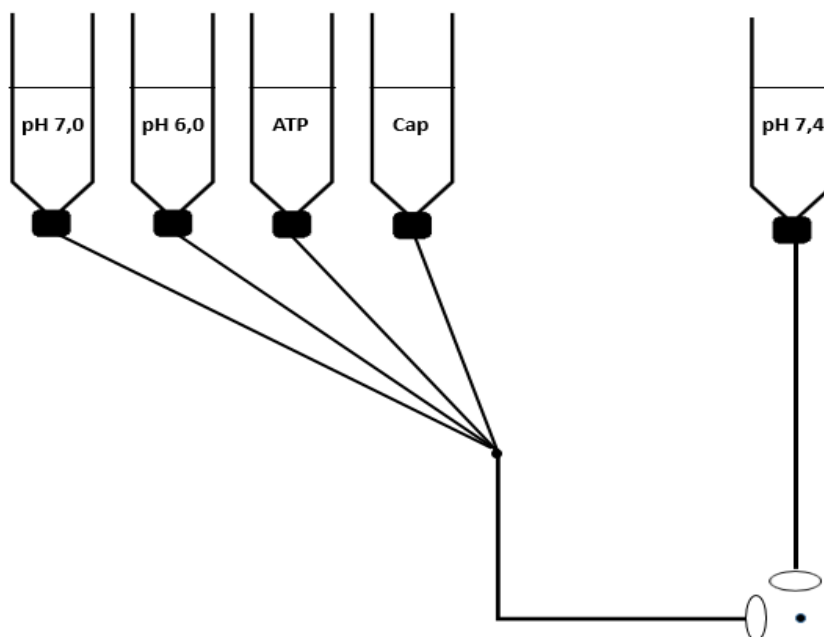


Figura 7.1 - Esquema ilustrativo do sistema de perfusão. O ponto para onde convergem os tubos contendo as soluções fisiológicas representa um corpo celular de um neurônio.

7.3. Protocolo experimental de ativação de correntes iônicas

Este protocolo apresenta a seguinte característica: o potencial de holding do neurônio é fixado à -70mV durante todo o protocolo experimental, exceto por uma hiperpolarização para -80mV durante 50ms com o objetivo de verificar alterações nas propriedades passivas da membrana. Após este pré-pulso hiperpolarizante, a célula é perfundida com a solução experimental por 2 segundos com a ajuda do sistema de perfusão descrito acima.

7.4. Protocolos de ativação de potenciais de ação

Para registro dos potenciais de ação, utilizamos a modalidade current clamp. Inicialmente injetamos pulsos de corrente de valores crescentes de X pA com incrementos de Y pA, até que o neurônio disparasse pelo menos um potencial de ação (limiar). Injetamos posteriormente correntes nos valores de 1, 2, 3 e 4 vezes o limiar, para computarmos o número de potenciais de ação nestes diferentes estímulos. Os neurônios que disparavam apenas 1 potencial de ação com estímulo de 4 vezes o limiar eram considerados fásicos. Os que apresentavam mais de 1 potencial de ação eram considerados tônicos.

7.5. Análises estatísticas

Nossos resultados baseiam-se em respostas apresentadas por cada neurônio individualmente através de suas capacidades de reagir a diferentes estímulos ao gerar correntes iônicas e potenciais de ação. O conjunto dos 184 neurônios registrados representa a população total de neurônios sensoriais, com a qual comparamos os resultados obtidos das células submetidas às soluções experimentais (contendo capsaicina 3 μ M, ATP 50 μ M, pH 7,0 e pH 6,0) e aos protocolos para geração de potenciais de ação. Desse modo, para verificar se as proporções observadas nestes eventos mostram diferenças significativas entre si ou não, utilizamos o teste não paramétrico “Qui-quadrado (X^2)”.

Para verificarmos se as diferenças entre os grupos de neurônios controles e experimentais eram significativas quanto à densidade de corrente, utilizamos o teste t de Student. Ademais, os resultados foram apresentados como o valor médio $\pm$ Erro padrão da Média para cada uma das condições experimentais.

8. RESULTADOS

Como nosso trabalho visa o estudo do efeito de agonistas adrenérgicos α sobre diversos canais ativados por ligantes, iniciamos por mostrar as características das correntes iônicas que obtivemos por estímulos acionadores destes canais.

8.1. Correntes iônicas

8.1.1. Receptores purinérgicos da família P2X

A **Figura 8.1** mostra correntes provocadas pela aplicação de solução fisiológica contendo 50 μ M de ATP. Estas correntes são mediadas pelos canais purinérgicos da família P2X e foram classificadas de acordo com suas cinéticas de ativação. Na **Figura 8.1A**, pode-se observar uma corrente de ativação e de dessensibilização rápidas, de modo que toda a corrente é abolida mesmo que o estímulo ainda permaneça. Essas características indicam que o fluxo iônico é mediado pela isoforma homomultimérica P2X₃ (Grote et al., 2008). Em **8.1B**, observa-se uma corrente rapidamente ativada (atribuída à isoforma P2X₃), enquanto que a dessensibilização é relativamente lenta. Isso indica que a corrente iônica envolve a isoforma P2X₃ e algum outro subtipo de isoforma P2X. Na **Figura 8.1C**, verifica-se uma corrente ampla, de ativação relativamente rápida e dessensibilização muito lenta, mediada por canais purinérgicos P2X_{não3}.

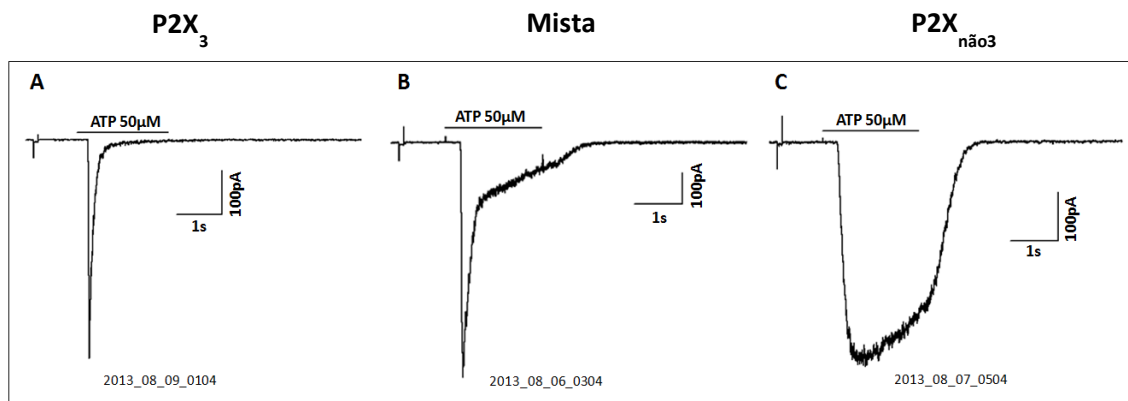


Figura 8.1 - Registros representativos de correntes iônicas ativadas por 50 μ M de ATP em diferentes células dissociadas de Gânglios da Raiz Dorsal (DRG). Em **A**, o influxo de cátions na célula é mediado por receptores P2X₃. Em **B**, observa-se uma corrente mista, com uma componente P2X₃ e outra P2X_{não3}. Enquanto que em **C**, a corrente é mediada por canais P2X_{não3}. As barras sobre os registros indicam o tempo em que as válvulas contendo solução com ATP ficam abertas. Os números abaixo das correntes são os códigos de identificação dos registros.

8.1.2. Receptor Vanilóide de Potencial Transiente tipo 1 e Canais Iônicos Sensíveis a Ácido

A **Figura 8.2A** mostra o traçado representativo de uma corrente provocada em um neurônio sensitivo em resposta à aplicação de 3 μ M de capsaicina. Esta substância é o ligante dos Receptores Vanilóides de Potenciais Transientes, os TRPV1.

Por outro lado, a **Figura 8.2B** apresenta traçados representativos de correntes mediadas por canais iônicos sensíveis ao aumento da concentração de prótons (H⁺). Nessa figura, a corrente de menor amplitude foi provocada pela solução de pH 7,0 e sua ativação e fração relativa à dessensibilização são relativamente lentas. Por outro lado, a solução de pH 6,0 foi capaz de ativar, na mesma célula, uma corrente de amplitude cerca de vinte vezes maior do que a solução de pH 7,0. Essa corrente é de ativação muito rápida e, ao final do tempo de exposição da célula à solução ácida, a corrente já se encontra quase completamente abolida. Nas correntes acionadas por soluções de pH 7,0 e pH

6,0, é possível observar uma corrente persistente que se mantém enquanto o pH extracelular apresentar um valor abaixo do fisiológico (Yagi et al., 2006; Deval et al., 2010; Deval et al., 2011).

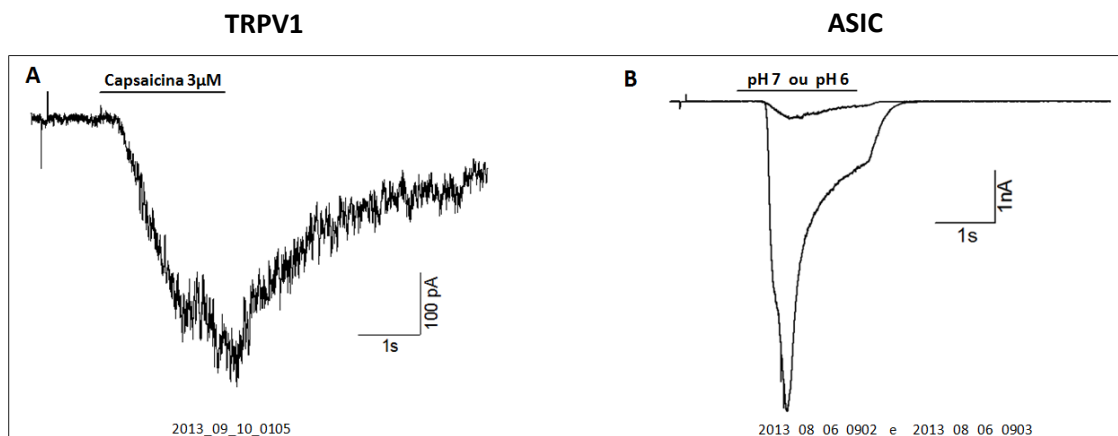


Figura 8.2 – Traçados representativos de correntes ativadas por capsaicina ou por solução de pH de valor abaixo do fisiológico, em células dissociadas de Gânglios da Raiz Dorsal. **A**, corrente iônica ativada por capsaicina (3 μ M). **B**, correntes geradas por pH abaixo do fisiológico (pH 7,0 ou pH 6,0) em um mesmo neurônio. As barras sobre os registros indicam o tempo em que as válvulas contendo as soluções ativadoras ficam abertas. Os números abaixo das correntes são os códigos de identificação dos registros.

Como objetivamos também caracterizar o tipo de resposta a estímulos de corrente apresentada pelas células potencialmente sensíveis a agonistas adrenérgicos, nós registramos potenciais de ação disparados por estímulos de 1 a 4 vezes o limiar.

8.2. Potenciais de Ação

A **Figura 8.3** mostra registros representativos de Potenciais de Ação (PA) relativos ao protocolo utilizado para separar neurônios com características tônicas (**A**), em que há vários disparos, e fásicas (**B**), em que apenas um PA é deflagrado, em resposta a um estímulo de corrente despolarizante, de 600 ms

de duração equivalente a quatro vezes o valor do limiar de excitabilidade de cada neurônio.

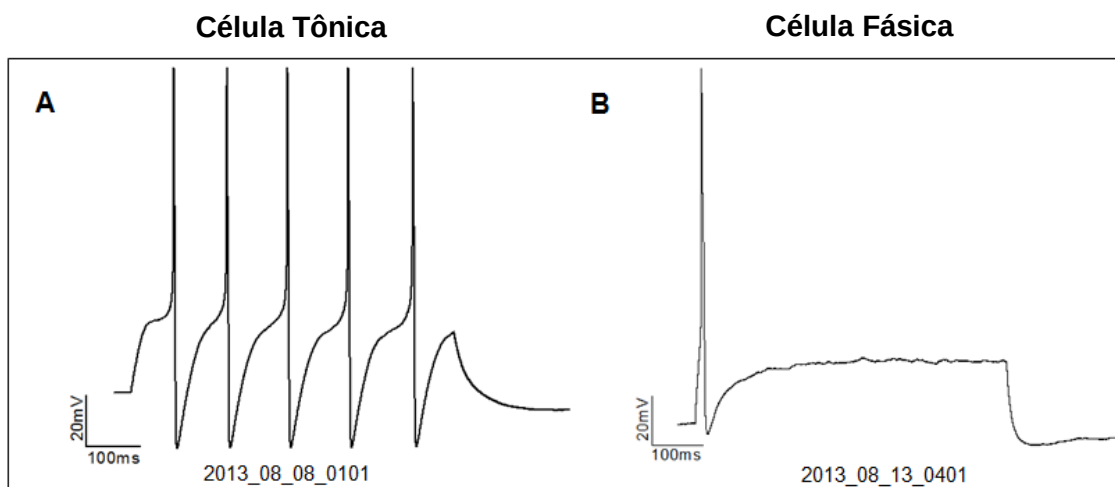


Figura 8.3 - Registros representativos de Potenciais de Ação. Os neurônios foram disparados por injeção de corrente igual a quatro vezes o valor do limiar de excitabilidade de cada célula. Este protocolo foi utilizado para separar neurônios com características tônicas (A) e fásicas (B). Os números abaixo dos potenciais de ação são os códigos de identificação dos registros.

8.3. Diversidade de tamanho dos corpos celulares dos neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal

Neste trabalho utilizamos neurônios advindos de todos os gânglios da raiz dorsal, sendo que o tamanho do corpo celular dos neurônios é uma característica importante para diferenciar as diferentes populações de neurônios dos DRG (Kawagashira *et al.*, 2012). Ademais, dados da literatura apresentam evidências de que os neurônios sensoriais de menor diâmetro são responsáveis por transmitir informações nociceptivas (Nakagawa & Hiura, 2006). Então, medimos o tamanho dos neurônios estudados.

Duas medidas, para inferência acerca do tamanho dos corpos celulares neuronais, foram coletadas: o diâmetro e a capacitância. Os valores de capacitância celular foram fornecidos pelo software Clampex 10.3, enquanto que os diâmetros das 184 células registradas foram medidos através de régua micrometrada instalada nas lentes das objetivas do microscópio.

Nossos resultados mostram que a população geral de neurônios registrados apresentou capacitância variando entre 21 e 122 pF e diâmetro variando entre 20 e 50 μm . Na **Figura 8.4**, podemos observar uma correlação não linear entre o diâmetro e a capacitância. Teoricamente, $1\mu\text{m}^2$ de área de superfície celular é igual a 0,01pF de capacitância da membrana celular (BARBOUR, 2011). A curva da **Figura 8.4** indica que $1\mu\text{m}^2 = 0,008\text{pF}$, ou seja, nossos dados são bem próximos do valor teórico.

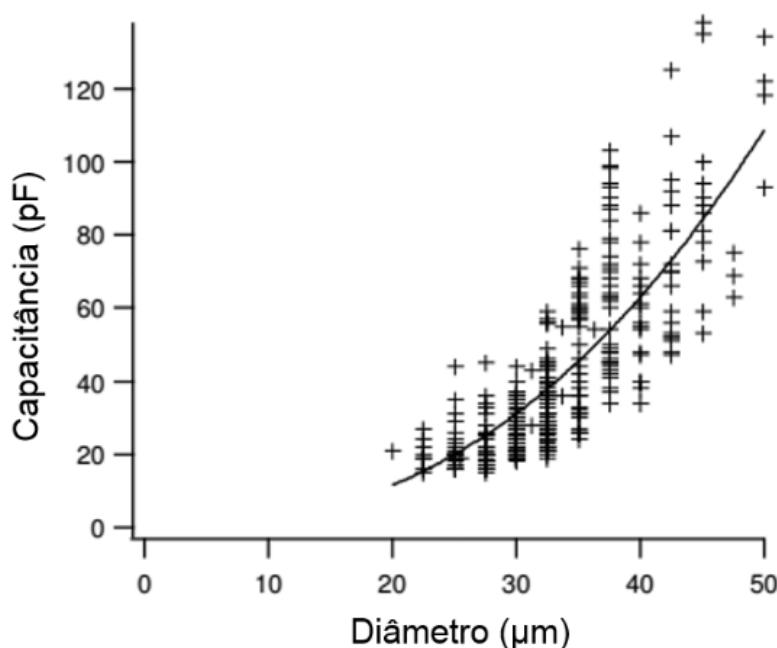


Figura 8.4 - Correlação entre capacitância e diâmetro dos 184 neurônios dos gânglios da raiz dorsal. Cada símbolo no gráfico representa um neurônio e seus respectivos valores de capacitância e diâmetro pareados. A curva é o melhor ajuste da função exponencial: $C = kd^n$, C é a capacitância celular; k é uma constante no valor de 0,038; d é o diâmetro da célula e n é fixado em $n=2$, pois assumimos que a geometria do corpo neuronal em cultura seja esférica.

8.4.Densidade de correntes registradas em diferentes dias

A **Figura 8.5** mostra que as densidades das correntes iônicas, em resposta aos diferentes estímulos (capsaicina **(A)**, pH 6 **(B)**, pH 7 **(C)** e ATP **(D, E e F)**), de cada um dos quatro dias de registro podem ser agrupadas. Isso foi possível, pois não existe diferença significativa entre os valores médios de cada dia. Estes registros foram feitos nas células controle, ou seja, que receberam apenas o veículo dos agonistas adrenérgicos.

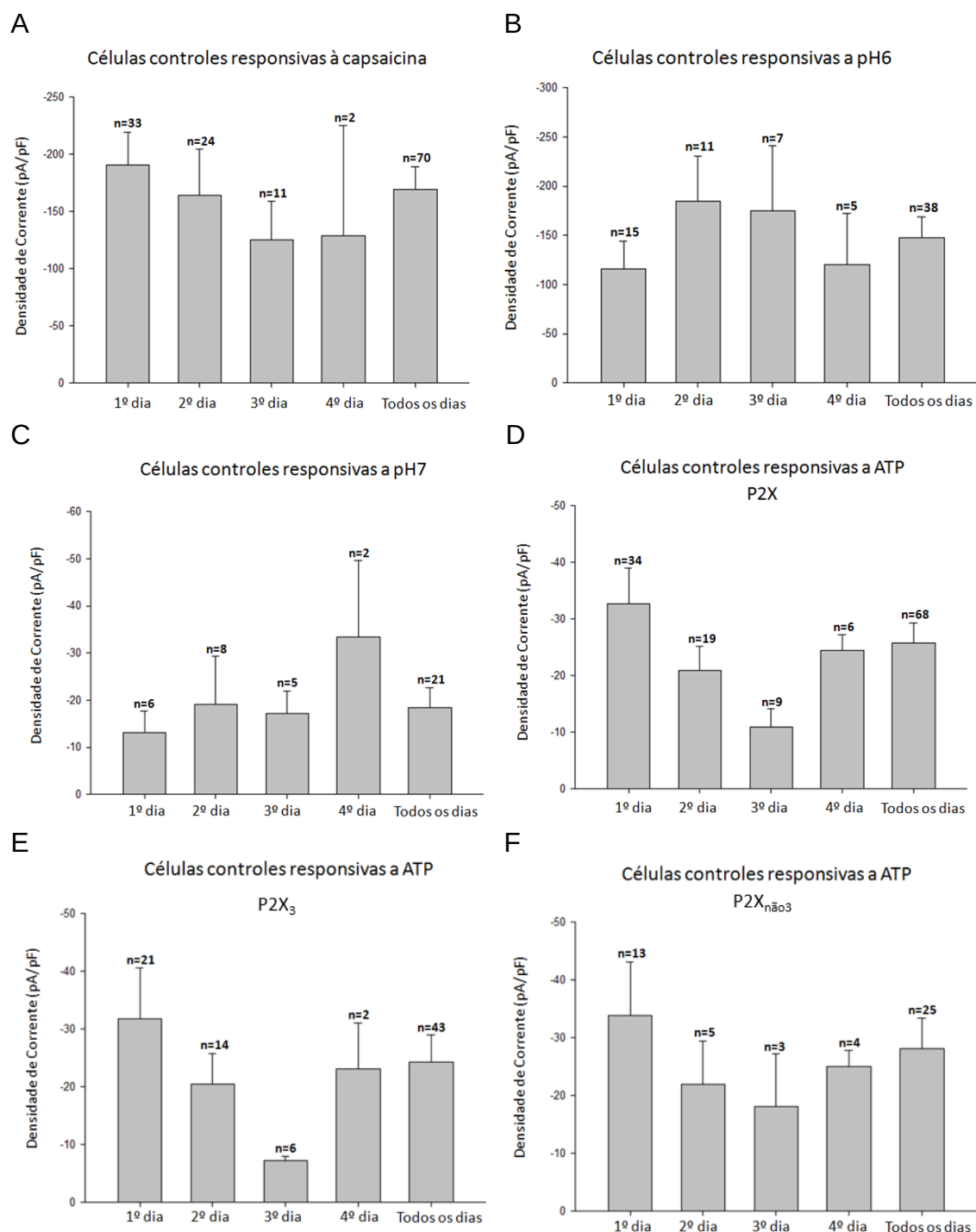


Figura 8.5 - Densidade de corrente dos neurônios DRG controles em resposta a diferentes estímulos. As figuras representam as densidades de corrente em resposta à capsaicina via TRPV1 (A), a pH 6,0 e pH 7,0 via ASIC (B e C) e a ATP via P2X (D), P2X₃ (E) e P2X_{não3} (F). Os valores são apresentados como o valor médio $\pm$ Erro Padrão da Média para cada uma das condições experimentais.

8.5. Fenilefrina

8.5.1. Efeito da fenilefrina na densidade de corrente P2X_{não3}

Para verificar se o tratamento com fenilefrina (1 μ M), um agonista adrenérgico α 1, exerce algum efeito sobre os canais iônicos dos neurônios sensitivos, examinamos correntes iônicas mediadas por diferentes moléculas transdutoras, na ausência e presença desse agonista. A **Figura 8.6** mostra que nas células controles (n=22) a densidade de corrente mediada pelos receptores P2X foi $-20,2 \pm 3,6$ pA/pF, enquanto que na presença de 1 μ M de fenilefrina (n=24) a densidade de corrente P2X foi de $-37,2 \pm 7,3$ pA/pF ($p < 0,05$).

Por outro lado, ao analisar separadamente as densidades de correntes mediadas apenas pela isoforma P2X₃, verifica-se que não há diferença entre o grupo controle ($-19,4 \pm 3,6$ pA/pF, n=11) e o grupo experimental ($-17,7 \pm 4,0$ pA/pF, n=10). Além disso, quando subtraímos a fração de contribuição dos receptores P2X₃, ou seja, quando analisamos a densidade de corrente mediada pelos receptores P2X_{não3}, a diferença entre o grupo controle ($-21,1 \pm 6,3$ pA/pF, n=11) e o grupo de neurônios tratados com fenilefrina ($-51,0 \pm 10,9$ pA/pF, n=14) foi ainda maior.

Não observamos diferença significativa, entre o grupo tratado com fenilefrina e o grupo tratado com o veículo, sobre as correntes provocadas por capsaicina ou soluções de pH 7,0 ou pH 6,0.

Esses resultados indicam que o tratamento com fenilefrina, agonista adrenérgico α 1, alterou a atividade dos canais purinérgicos P2X_{não3}.

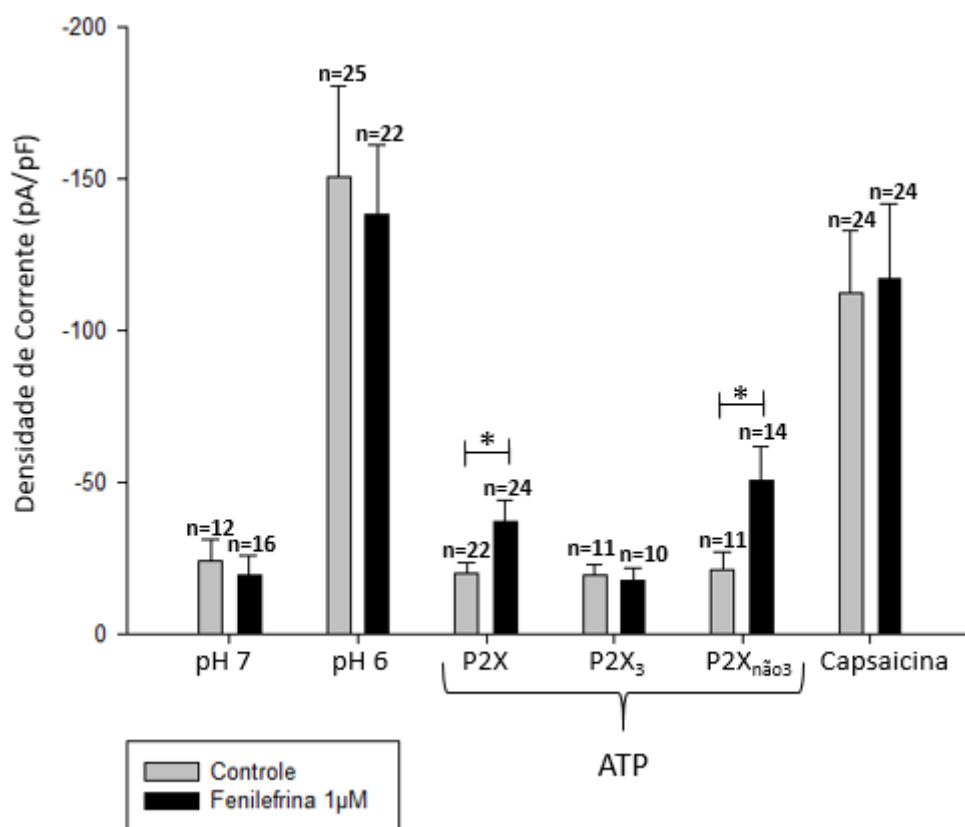


Figura 8.6 - A fenilefrina (1µM) aumenta a densidade de corrente P2X_{não3} sem alterar as densidades de correntes provocadas por capsaicina (3µM) e baixo pH em neurônios sensitivos primários. Os valores são apresentados como o valor médio ± Erro Padrão da Média para cada uma das condições experimentais. * p<0,05; Número total de células registradas: 42 (grupo controle) e 40 (grupo fenilefrina).

8.5.2. Efeito da fenilefrina sobre as proporções de células responsivas a diferentes estímulos

Para verificar se houve diferença na proporção de células responsivas à ATP, à capsaicina e a soluções de pH abaixo do valor fisiológico, entre o grupo controle e o grupo tratado com fenilefrina, de acordo com os pares de valores de “n” (controle versus experimental) da **Figura 8.6** comparados com a proporção total de células registradas (42 controles e 40 tratadas com fenilefrina), aplicamos o teste não paramétrico qui-quadrado (χ^2) e de acordo com os

resultados (X^2 pH7 = 0,58; X^2 pH6 = 0,05; X^2 P2X = 0,14; X^2 P2X₃ = 0,01; X^2 P2X_{não3} = 0,4 e X^2 capsaicina = 0,02), não observamos diferenças estatísticas entre as proporções de células responsivas a cada estímulo entre os neurônios controles e aqueles tratados com fenilefrina.

8.5.3. Proporções de células tônicas versus fásicas mediante tratamento com fenilefrina

Na **Tabela I** são apresentadas as quantidades de células com características tônicas e fásicas de cada um dos grupos controles e grupos tratados com fenilefrina (agonista adrenérgico α_1). As análises desses dados foram realizadas no conjunto de todas as células controles versus as células tratadas com fenilefrina e, também, nos subgrupos que responderam a cada um dos diferentes estímulos: pH sub-fisiológico, ATP e capsaicina. É possível constatar que não houve diferença significativa nas proporções de neurônios tônicos e fásicos entre os controles e aqueles tratados com fenilefrina, pois os valores de qui-quadrado (X^2) para cada grupo não foi maior que o valor crítico (3,841), assim como não houve valores de $p < 0,05$.

Tabela I - Efeito da fenilefrina na proporção de células com características tônicas versus fásicas. Entre parênteses encontra-se o número total de células de cada respectivo grupo. X^2 = qui-quadrado, valor crítico = 3,841; se X^2 for maior que o valor crítico o resultado é significativo com $p < 0,05$.

	Tônicas X Fásicas (Controle)	Tônicas X Fásicas (Fenilefrina)	X^2	p
Todas as células	27 X 15 (42)	22 X 18 (40)	0,7	0,39
pH 7	06 X 06 (12)	04 X 12 (16)	1,9	0,17
pH 6	14 X 11 (25)	10 X 12 (22)	0,5	0,47
Todas ATP	18 X 04 (22)	15 X 09 (24)	2,1	0,15
ATP (corrente tipo P2X ₃)	10 X 01 (11)	07 X 03 (10)	1,5	0,22
ATP (corrente tipo P2X _{não3})	08 X 03 (11)	08 X 06 (14)	0,6	0,44
Capsaicina	20 X 04 (24)	14 X 10 (24)	3,6	0,06

8.5.4. Limiares de excitabilidade dos neurônios tratados com fenilefrina

Conforme a **Tabela II**, verifica-se que a fenilefrina foi capaz de aumentar em 95% o limiar dos neurônios responsivos à solução de pH 6,0. Além disso, nas células responsivas a pH 7,0, a fenilefrina apresentou uma tendência de aumento do limiar ($p=0,0532$). Enquanto que nas células responsivas aos outros estímulos não houve alterações consideráveis, em relação a esse parâmetro.

Tabela II - Efeito da fenilefrina no limiar de excitabilidade normalizado (pA/pF) das células.

	Controle	Fenilefrina
Todas as células	$4,8 \pm 0,6$	$6,6 \pm 1,1$
pH7	$4,7 \pm 1,2$	$10,6 \pm 2,3$
pH6	$*4,4 \pm 0,9$	$*8,6 \pm 1,8$
Todas ATP	$4,8 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,6$
ATP (corrente tipo P2X ₃)	$4,8 \pm 0,7$	$5,7 \pm 1,0$
ATP (corrente tipo P2X _{não3})	$4,8 \pm 1,2$	$4,1 \pm 0,8$
Capsaicina	$4,2 \pm 0,7$	$6,7 \pm 1,6$

8.6. Clonidina

8.6.1. Ação da clonidina na densidade de corrente TRPV1

Testamos também um agonista adrenérgico α_2 , a clonidina, na concentração de 10 μ M, visando verificar se ela exerce algum efeito na densidade de corrente via moléculas transdutoras expressas nos neurônios sensitivos. Na **Figura 8.7** é possível observar que a densidade de corrente mediada pelos receptores TRPV1 nas células controles (n=53) foi - 218 $\pm$ 24 pA/PF, enquanto que na presença de 10 μ M de clonidina a densidade de corrente

TRPV1 média foi de -146 ± 26 pA/pF ($n=44$), ou seja, ocorreu uma redução de 33% da densidade de corrente em relação ao controle ($p<0,05$). Desse modo, esses resultados indicam que o tratamento com clonidina, agonista adrenérgico α_2 , alterou a atividade dos canais iônicos TRPV1.

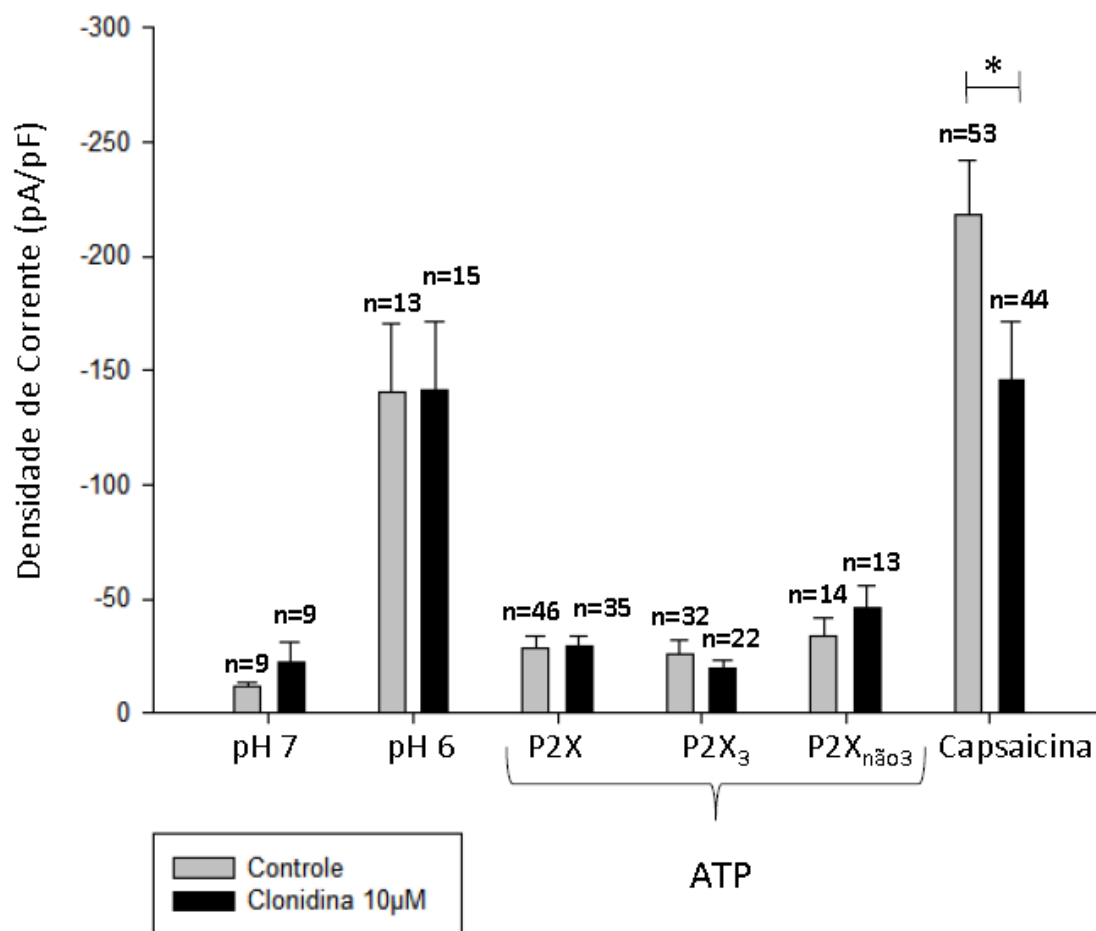


Figura 8.7 - O agonista adrenérgico α_2 , clonidina ($10\mu\text{M}$), reduz a densidade de corrente acionada por capsaicina ($3\mu\text{M}$) em neurônios sensitivos primários que respondem também a ATP ($50\mu\text{M}$) e a soluções de pH 7,0 ou pH 6,0. Os dados são apresentados como o valor médio $\pm$ Erro Padrão da Média para cada uma das condições experimentais. $*p<0,05$. Total de células registradas: 54 controles e 48 tratadas com clonidina.

8.6.2. Efeito da clonidina sobre as proporções de células responsivas a diferentes estímulos

Ao aplicar o teste não paramétrico qui-quadrado (X^2), para averiguar se houve diferença na proporção de células entre os grupos controles e os grupos tratados com clonidina para cada grupo de mediadores das correntes iônicas, cujos valores de “n” encontram-se na **Figura 8.7**, verificamos que não existem diferenças estatísticas (X^2 pH7 = 0,05; X^2 pH6 = 0,03; X^2 P2X = 0,27; X^2 P2X₃ = 0,57; X^2 P2X_{não3} = 0,01 e X^2 capsaicina = 0,06) entre a quantidade de neurônios responsivos controles e aqueles tratados com clonidina comparados com a proporção total de células registradas (54 controles e 48 tratadas com clonidina), pois nenhum valor de X^2 foi maior que o valor crítico (3,841) ao nível de significância de 0.05.

8.6.3. Proporções de células tônicas versus fásicas mediante tratamento com clonidina

Os dados das células com características tônicas e fásicas mediante tratamento com clonidina (agonista adrenérgico α_2) são apresentados na **Tabela III**. As análises foram realizadas no universo de todas as células controles versus aquelas tratadas com clonidina e, também, nos subconjuntos que responderam a cada um dos diferentes estímulos: pH7, pH6, ATP e capsaicina. Contatou-se que não houve diferença significativa nas proporções de neurônios tônicos versus fásicos em resposta ao tratamento com clonidina, pois os valores de qui-quadrado (X^2) para cada grupo não foi maior que o valor crítico (3,841), assim como não houve valores de $p < 0,05$.

Tabela III - Efeito da clonidina na proporção de células com características tônicas versus fásicas. Entre parênteses encontra-se o número total de células de cada respectivo grupo. χ^2 = qui-quadrado, valor crítico 3,841; se χ^2 for maior que o valor crítico o resultado é significativo com $p < 0,05$.

	Tônicas X Fásicas (Controle)	Tônicas X Fásicas (Clonidina)	χ^2	p
Todas as células	32 X 22 (54)	29 X 19 (48)	0,010	0,92
pH7	02 X 07 (09)	04 X 05 (09)	1,000	0,32
pH6	05 X 08 (13)	08 X 07 (15)	0,600	0,44
Todas ATP	30 X 16 (46)	23 X 12 (35)	0,002	0,96
ATP (corrente tipo P2X ₃)	25 X 07 (32)	16 X 06 (22)	0,200	0,65
ATP (corrente tipo P2X _{não3})	05 X 09 (14)	07 X 06 (13)	0,890	0,35
Capsaicina	31 X 15 (46)	25 X 13 (38)	0,020	0,89

8.6.4. Limiares de excitabilidade dos neurônios tratados com clonidina

Com o objetivo de verificar se a clonidina exerceu algum efeito sobre os valores da quantidade mínima de corrente injetada, por unidade de capacitância, necessária para o disparo dos neurônios, comparamos os limiares médios das células controles com aqueles das células tratadas com clonidina. Esses resultados mostraram que não há diferença significativa do limiar na presença de clonidina em nenhum dos grupos analisados, conforme a **Tabela IV**.

Tabela IV - Efeito da clonidina no limiar de excitabilidade normalizado (pA/pF) dos neurônios.

	Controle	Clonidina
Todas as células	5,3 ± 0,5	5,9 ± 0,9
pH7	9,0 ± 2,5	4,9 ± 0,9
pH6	7,7 ± 1,8	4,5 ± 0,6
Todas ATP	4,6 ± 0,3	4,3 ± 0,3
ATP (corrente tipo P2X ₃)	5,4 ± 0,3	5,0 ± 0,4
ATP (corrente tipo P2X _{não3})	2,8 ± 0,6	3,1 ± 0,5
Capsaicina	4,9 ± 0,3	4,3 ± 0,3

8.7. Propriedades dos neurônios dos Gânglios da Raiz Dorsal responsivos a ATP, pH sub-fisiológico e capsaicina

Com a finalidade de avaliar o tipo de neurônio que apresenta as diversas correntes iônicas, nós analisamos o tamanho e características dos potenciais de ação disparados por estas células.

Como pode ser observado na **Tabela V**, os neurônios com correntes tipo P2X_{não3}, alvos da fenilefrina, apresentaram características similares àquelas da população total de células. Enquanto que as células com correntes mediadas pelo canal TRPV1, possíveis alvos da clonidina, são de tamanho pequeno, em relação à população total com tamanho neuronal médio.

Vale ressaltar que todas as células que responderam a pH7 também responderam a pH6, porém nem todas as células sensíveis a pH6 foram ativadas por solução de pH7. Esse grupo de células responsíveis a pH sub-fisiológico apresentou valores de capacitância e de largura do potencial de ação significativamente maior comparados com os valores da população total.

Tabela V - Propriedades de neurônios responsivos a ATP, pH sub-fisiológico e capsaicina. A população de 184 neurônios estudada inclui os controles, e os tratados com fenilefrina ou clonidina. Os valores são apresentados como o valor médio $\pm$ Erro Padrão da Média. Os grupos delineados pelos retângulos pontilhados correspondem aos tipos de canais que provavelmente interagem com agonistas adrenérgicos α . * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Estímulos	Receptores	Células responsivas	Capacitância (pF)	Diâmetro (μm)	Tônicas X Fásicas	Tônicas X Fásicas	Largura PA (ms)	
ATP	P2X	127	69%	35,1 ± 18,9	32,0 ± 4,8	86 X 41	68% X 32%	2,7 ± 1,5
	P2X ₃	75	41%	**29,3 ± 16,3	*31,0 ± 3,8	**58 X 17	**77% X 23%	2,5 ± 0,9
	P2X _{não3}	52	28%	43,6 ± 19,4	33,4 ± 5,6	28 X 24	54% X 46%	3,0 ± 2,1
pH 6,0	ASIC	75	41%	**50,4 ± 27,2	34,4 ± 7,5	37 X 38	49% X 51%	*3,5 ± 2,3
pH 7,0		46	25%	**55,4 ± 27,2	**36,2 ± 6,8	**16 X 30	**35% X 65%	*3,7 ± 2,6
Capsaicina	TRPV1	132	72%	*34,4 ± 16,6	*31,5 ± 4,5	90 X 42	68% X 32%	3,2 ± 1,8
População Total		184	100%	39,1 ± 22,2	32,8 ± 5,8	110 X 74	60% X 40%	2,9 ± 1,9

Há relatos na literatura de determinados tratamentos que induzem a expressão diferencial de canais iônicos na população de neurônios DRG. Por exemplo, a axotomia induziu correntes de cloreto ativadas por cálcio em subpopulações de neurônios dos DRG de camundongo: esse tipo de corrente que antes era restrita a neurônios de diâmetro médio (30-40 μ m), após a axotomia neurônios de diâmetro grande (40-50 μ m) também passaram a expressar canais para cloreto ativados por cálcio (ANDRÉ *et al.*, 2003). Então, analisamos se os tratamentos com fenilefrina ou clonidina desencadearam mudanças na população de células responsivas à ATP e à capsaicina, respectivamente.

Ao analisar estatisticamente as proporções de células P2X_{não3} presentes no controle e no grupo tratado com fenilefrina, de acordo com a **Figura 8.8**, constatamos que não houve diferenças significativas. Os valores de qui-quadrado foram: 0,17, no grupo de células pequenas (5/24 x 5/18); 0,6, no grupo de células médias (3/11 x 8/16) e também 0,6, no grupo de células grandes (3/7 x 1/6). Isso significa que não houve mudança na população de células responsivas a ATP mediante tratamento com fenilefrina.

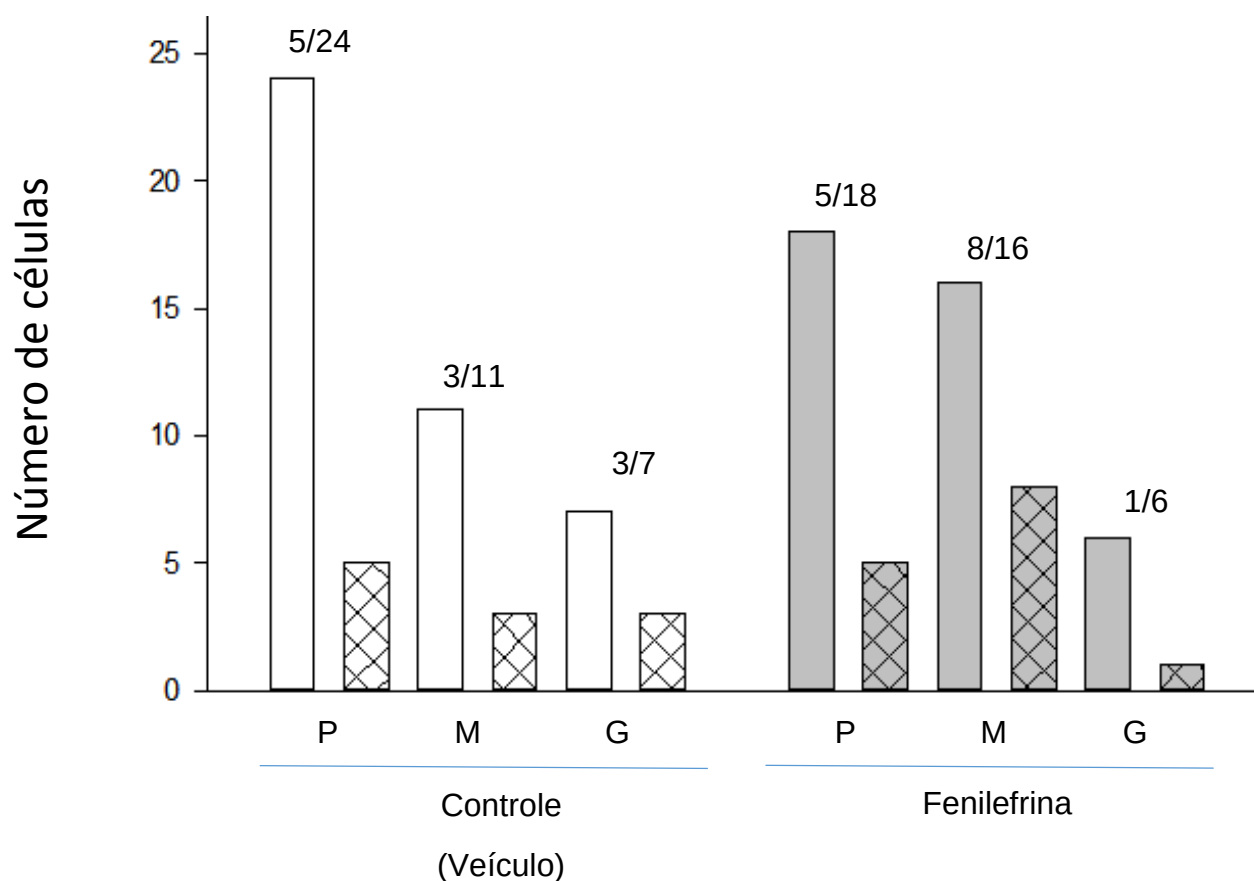


Figura 8.8 - Histograma de distribuição por tamanho dos neurônios controles e dos neurônios tratados com fenilefrina. As barras quadriculadas correspondem aos neurônios responsivos à ATP, receptores do tipo P2X_{não3}. Acima de cada par de barras encontra-se as proporções de células P2X_{não3} em relação à população celular total de determinada faixa de tamanho. P = células pequenas (<35pF); M = células médias (≥35 e ≤64pF); G = células grandes (>64pF).

Na **Figura 8.9**, a comparação entre o grupo controle e aquele tratado com clonidina não apresentou diferenças significativas estatisticamente no tocante às proporções de células responsivas à capsaicina. Essa análise foi feita através do teste qui-quadrado cujos valores são: 0,1, no grupo de células pequenas (29/30 x 24/28); 0,02, no grupo de células médias (15/21 x 10/15) e 0,03, no grupo de células grandes (2/3 x 4/5). Esses resultados demonstram que a clonidina não causou a alteração da população de células sensíveis à capsaicina.

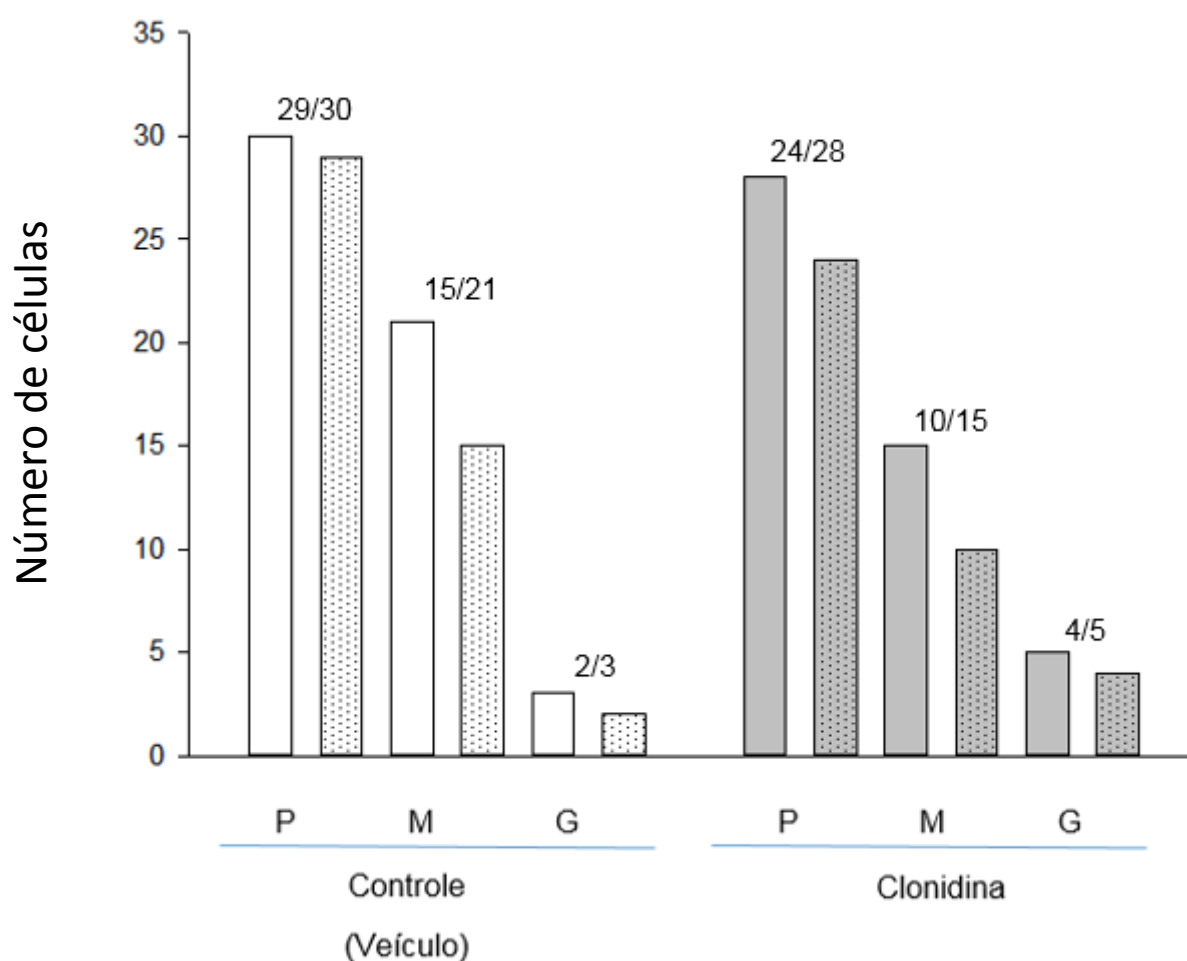


Figura 8.9 - Distribuição por tamanho dos neurônios controles e neurônios tratados com clonidina. As barras pontilhadas correspondem aos neurônios responsivos à capsaicina. Acima de cada par de barras encontra-se as proporções de células sensíveis à capsaicina, em relação à população neuronal de acordo com seu respectivo intervalo de tamanho. P = células pequenas (<35pF); M = células médias (≥ 35 e ≤ 64 pF); G = células grandes (>64pF).

9. RESUMO DOS RESULTADOS

Para uma melhor visualização dos resultados, eles foram reunidos na tabela abaixo.

Tabela VI - Síntese dos resultados. DC: densidade de corrente; ↑ indica aumento de determinado parâmetro e ↓ indica redução de outro parâmetro; nn. ASIC+: neurônios que expressam canais iônicos acionados por ácido (ASIC). *p<0,05

	Fenilefrina	Clonidina
DC - P2X _{não3}	↑ *	--
DC - P2X ₃	--	--
DC - P2X	↑ *	--
DC - TRPV1	--	↓ *
DC - ASIC	--	--
Limiar	↑ nn. ASIC ⁺ *	--
Tônicas X Fásicas	--	--
Presença diferencial de correntes (tamanhos)	--	--

10. DISCUSSÃO

10.1. Efeito de agonistas adrenérgicos em gânglios da raiz dorsal

Apesar das muitas demonstrações da interação do sistema nervoso simpático com os neurônios sensoriais (revisto por PERTOVAARA *et al.*, 2013), os mecanismos envolvidos neste processo não são completamente entendidos. Foi mostrado que a adrenalina aumenta a excitabilidade em 46% dos neurônios DRG e diminui em 18% (PLUTEANU *et al.*, 2002). Este efeito diferencial foi atribuído às diferentes proporções de expressão dos diferentes subtipos de receptores. Neste trabalho, optamos por usar agonistas específicos para os diferentes subtipos de receptores α -adrenérgicos.

Nós procuramos identificar interações entre agonistas adrenérgicos e canais iônicos capazes de transformar estímulos nocivos em sinais elétricos propagáveis nos neurônios DRG. Foi mostrado que a noradrenalina aumenta a liberação de substância P provocada por capsaicina (WANG *et al.*, 2011), um efeito antagonizado pela prazosina, antagonista α_1 . Este dado sugere que um agonista α_1 , como a fenilefrina, aumentaria as correntes provocadas por capsaicina. Nós não observamos alteração nesta corrente com o uso de fenilefrina. Uma possível explicação para estes resultados seria se o efeito da fenilefrina observado por WANG *et al.* (2011) fosse devido a um aumento na proporção de células com corrente TRPV1, o que nós também não observamos. Outra possibilidade seria que as alterações ocorressem em etapas posteriores à geração de corrente pela capsaicina, como um possível aumento produzido pela noradrenalina na quantidade de substância P produzida pelos neurônios.

GONG (2010) mostrou que a clonidina diminui a liberação de substância P provocada por capsaicina e também a expressão de RNA mensageiro para TRPV1. Estes dados sugerem que possa haver maior expressão de TRPV1 e consequentemente maior corrente através deste canal. Nossos dados corroboram com esta hipótese.

Quanto aos receptores para ATP (P2X), TAN *et al.* (2011) mostraram que a adrenalina aumenta a taxa de disparos induzida por agonista purinérgico e

também a expressão de P2X₃, sem alterar a expressão de P2X₂. Corroborando com estes dados, MARUO *et al.* (2006) observaram aumento da corrente rápida de ATP (P2X₃) por adrenalina. Contrariamente a estes resultados, nós não observamos alteração em correntes P2X₃ com clonidina ou com fenilefrina. Uma possível explicação para esta diferença seria se os efeitos observados por estes autores fosse mediado por receptores β . Nós observamos aumento de corrente P2X_{não3} por agonista α -1. MARUO *et al.* (2006) observaram aumento da corrente lenta de ATP (P2X_{não3}) produzida pela adrenalina apenas em animais submetidos à ligadura do nervo ciático, um efeito mediado pela PKC. Eles também observaram aumento de RNA mensageiro para receptores α e β . Pelo fato do efeito ter sido bloqueado por antagonistas de PKC, uma proteína envolvida na via de sinalização dos receptores α 1, estes autores sugeriram que o efeito da noradrenalina foi mediado por estes receptores. Nossos dados corroboram com o efeito estimulatório da adrenalina sobre os receptores P2X₂ por receptores α 1. Entretanto nós observamos aumento de corrente lenta de ATP por agonista α 1 em animais normais.

Com relação aos canais acionados por ácido, apesar dos relatos da sua modulação pela PKC (XIONG *et al.*, 2013), envolvida na via de sinalização dos receptores α 1 e pela PKA (LEONARD *et al.*, 2003), envolvida na via de sinalização dos receptores α 2, nós não observamos alteração na sua atividade por exposição a agonistas adrenérgicos α .

10.2. Possíveis mecanismos das interações entre os receptores α 1-adrenérgicos e P2X_{não3} e entre α 2-adrenérgicos e TRPV1

Quando ativados pela fenilefrina, os receptores α 1 que são acoplados à proteína Gq geram uma amplificação da quinase efetora: a proteína quinase C (PKC). A porção N-terminal intracelular dos canais P2X contém um sítio de fosforilação para a PKC, que tem mostrado estar envolvido na modulação da

atividade do receptor P2X₂ (BOUE-GRABOT *et al.*, 2000; CHOW; WANG, 1998). Uma quantidade de PKC aumentada desencadeia uma maior ativação dos P2X. BOUE-GRABOT e colaboradores mostraram que em todos os receptores P2X mutantes que não apresentavam o resíduo de treonina (The¹⁸) para a fosforilação funcional pela PKC, a corrente era bem mais rápida e a dessensibilização era completa. Ou seja, para que a resposta do receptor P2X₂ à ligação do ATP seja prolongada, através de correntes iônicas de maiores amplitudes e taxa de dessensibilização lenta, é necessário que o sítio de interação com a PKC esteja ativo.

Visto que na porção N-terminal, de todas as subunidades P2X₁₋₇ conhecidas, há uma sequência conservada de interação com a PKC (BOUE-GRABOT *et al.*, 2000), podemos considerar que o alvo de interação dos receptores $\alpha 1$ também possa ser a subunidade P2X₄, que é uma molécula chave na dor neuropática, particularmente na alodinia após a lesão do nervo periférico (IGAWA *et al.*, 2013).

Um outro possível alvo da PKC seria a subunidade P2X₅, um canal eletricamente silencioso, que potencializa a atividade nociceptiva dos receptores ASIC (BIRDSONG *et al.*, 2010).

Por outro lado, os receptores $\alpha 2$, acoplados à proteína Gi, quando ativados reduzem o AMPc e por consequência a atividade da proteína quinase A (PKA) disponível no citoplasma. Visto que, a fosforilação mediada por AMPc/PKA pode impedir a dessensibilização ou sensibilizar o canal TRPV1 (BHAVE *et al.*, 2002; MOHAPATRA *et al.*, 2003; RATHEE *et al.*, 2002; VETTER *et al.*, 2008), essa redução da PKA desencadeada pela ativação dos receptores $\alpha 2$ pode ser responsável pela redução da densidade de corrente TRPV1 nas células tratadas com clonidina. Alguns importantes sítios de fosforilação pela PKA presentes nos TRPV1 são: serina 6, serina 116, treonina 144, treonina 370, serina 502, serina 774 e serina 820 (BHAVE *et al.*, 2002; MOHAPATRA *et al.*, 2003).

10.3. Características das células responsivas à fenilefrina e à clonidina

Ambos os receptores adrenérgicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ têm sido identificados em neurônios DRG (GOLD *et al.*, 1997; SHI *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2001; NICHOLSON *et al.*, 2005; TREVISANI *et al.*, 2007). Partindo desse pressuposto, os grupos experimentais foram tratados com fenilefrina, agonista adrenérgico $\alpha 1$, ou clonidina, agonista adrenérgico $\alpha 2$. Assim, as células responsivas à fenilefrina apresentaram uma densidade de corrente mediada pelos receptores $P2X_{n\grave{a}o3}$, quase duas vezes maior em relação às células controles.

Além disso, os neurônios responsivos à solução de pH6, ou seja, aqueles que expressam ASICs, tiveram os seus limiares aumentados significativamente em 95% (**Tabela II**). O menor estímulo capaz de disparar um potencial de ação (limiar), nos neurônios dos DRG, é determinado principalmente por canais para sódio e potássio (ZHANG *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram que a fenilefrina foi capaz de aumentar o limiar nos neurônios sensíveis a ácido, levando à uma hipoexcitabilidade celular. Têm sido relatadas controvérsias quanto ao efeito inibitório ou excitatório de alguns agonistas adrenérgicos (PLUTEANU *et al.*, 2002). Os neurônios sensíveis a ácido têm a particularidade de serem neurônios de grande diâmetro e com potenciais de ação largos (**Tabela V**). O efeito diferencial da fenilefrina nestas células sugere que este agonista seja capaz de alterar canais iônicos importantes para a geração de potenciais de ação especificamente presentes nesta subpopulação. Neste sentido, seria interessante pesquisar os subtipos de canais para sódio e potássio presentes em neurônios que expressam ASIC.

Ademais, as células sensíveis à fenilefrina não apresentaram modificação na distribuição da população de células sensíveis à ATP, nem tiveram a proporção de células tônicas versus fásicas diferente estatisticamente do grupo total de neurônios.

Por outro lado, as células responsivas à clonidina demonstraram uma redução de 33% da densidade de corrente média, mediada pelos receptores

TRPV1, em relação ao controle ($p < 0,05$). Assim, esse resultado sugere uma diferença, que com o aumento no número de células registradas poderia mostrar uma interação entre canais iônicos TRPV1 e receptores adrenérgicos α_2 . Os neurônios que expressaram TRPV1 em suas membranas são aqueles de tamanho (capacitância e diâmetro) pequeno de acordo com a **Tabela IV** e que, também, estão de acordo com testes de hibridização *in situ*, em que os TRPV1 são expressos predominantemente em neurônios sensoriais primários de pequeno a médio diâmetros, que correspondem aos corpos celulares das fibras C e A δ amielinizadas dos gânglios da raiz dorsal e trigemiais (CATERINA *et al.*, 1997)

Uma maneira de avaliar o tamanho da célula é através da medida de sua capacitância, pois a célula é delimitada por sua membrana lipídica, um excelente isolante. Além disso, do lado de dentro quanto do lado de fora da célula existe uma solução salina que age como um condutor. Assim, como a célula apresenta a sequência condutor-isolante-condutor ela funciona como um capacitor, capaz de acumular cargas em sua superfície. Visto que, a capacitância é proporcional à área da membrana e inversamente proporcional ao diâmetro da célula e que a capacitância específica de membranas biológicas é de $\frac{1\mu F}{cm^2}$ (BARBOUR, 2011) chegamos ao ajuste da curva da **Figura 8.4**, cujos resultados se aproximaram bastante desse valor teórico.

Neste trabalho utilizamos neurônios advindos de todos os DRG, cujas raízes inervam diferentes segmentos da medula espinhal (cervical, torácica, lombar e sacral). Visto que, cada gânglio da raiz dorsal contém mais de 20 (vinte) tipos de neurônios funcionalmente distintos, de modo que alguns inervam um tecido e outros inervam outras regiões, generalizações sobre o conjunto dos DRG são informações suspeitas. Os neurônios DRG nos diferentes segmentos representam proporções diferentes de cada tipo funcional com proporção de tecidos específicos inervados (músculos, vísceras e outras estruturas especiais) que diferem ao longo do eixo medular (SCOTT, 1992). Desse modo, ao utilizarmos todos os gânglios foi uma maneira de homogeneizar as nossas amostras de modo a torná-las mais próximas qualitativamente da população total.

10.4. Significado fisiológico da modulação por agonistas adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos $\alpha 1$ são pró-nociceptivos e os receptores $\alpha 2$ são anti-nociceptivos. Quando os receptores $\alpha 1$ são ativados e desencadeiam a cascata de reações intracelulares que aumenta a atividade dos canais $P2X_{n\alpha 03}$ presentes nos neurônios sensitivos, estes últimos apresentam maior influxo de cátions, o que facilita a transmissão dos impulsos nervosos ao sistema nervoso central. Por outro lado, quando os receptores $\alpha 2$ são ativados, eles reduzem a ação despolarizante causada pelas correntes catiônicas TRPV1 acionadas por capsaicina.

10.5. Conclusões

Deste trabalho podemos concluir que os agonistas adrenérgicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ alteram a atividade de moléculas transdutoras nociceptivas (canais purinérgicos) e a excitabilidade de neurônios dos gânglios da raiz dorsal que expressam canais ASIC. Além disso, o sistema adrenérgico pode afetar a dor neuropática através de mudanças em canais nociceptivos.

Os neurônios ASIC⁺ expressam canais iônicos acionados por voltagem específicos que podem ser modulados pelo agonista $\alpha 1$.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, R.; CANESSA, C. M.; FYFE, G. K.; ZHANG, P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 573-594, 2000.

ANDRÉ, S.; BOUKHADDAOUI, H.; CAMPO, B.; AL-JUMAILY, M.; MAYEUX, V.; GREUET, D.; VALMIER, J.; SCAMPS, F. Axotomy-induced expression of calcium-activated chloride current in subpopulations of mouse dorsal root ganglion neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 3764-3773, 2003.

BARBOUR, (2011) Electronics for electrophysiologists. Disponível em: <<http://www.biologie.ens.fr/~barbour/>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

BARON R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. **The Clinical Journal of Pain**, v. 16, p. 12-20, 2000.

BAUMANN, T. K.; BURCHIEL, K. J.; INGRAM, S. L.; MARTENSON, M. E. Responses of adult human dorsal root ganglion neurons in culture to capsaicin and low pH. **Pain**, v. 65, p. 31-38, 1996.

BEAN B.P. Pharmacology and electrophysiology of ATP activated ion channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 87-90, 1992.

BHAVE, G.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D. J.; OXFORD, G. S.; GEREAU, R. W. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. **Neuron**, v. 35, p. 721-731, 2002.

BIRDSOONG, W. T.; FIERRO, L.; WILLIAMS, F. G.; SPELTA, V.; NAVES, L. A.; KNOWLES, M.; MARSH-HAFFNER, J.; ADELMAN, J. P.; ALMERS, W.; ELDE, R. P.; MCCLESKEY, E. W. Sensing muscle ischemia: coincident detection of acid and ATP via interplay of two ion channels. **Neuron**, v. 18, p. 739-749, 2010.

BIRNBAUMER, L.; YIDIRIM, E.; ABRAMOWITZ J. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. **Cell Calcium**, v. 33, p. 419-432, 2003.

BLAND-WARD, P. A.; HUMPHREY, P. P. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 365-371, 1997.

BOUE-GRABOT, E.; ARCHAMBAULT, V.; SEGUELA, P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10190-10195, 2000.

BRAKE, A. J.; WAGENBACH, M. J.; JULIUS, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. **Nature**, v. 371, p. 519-523, 1994.

BUDAI, D.; HARASAWA, I.; FIELDS, H. L. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha2-adrenergic receptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 80, p. 2244-2254, 1998.

BURNSTOCK, G.; WOOD, J. N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 526-532, 1996.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, p. 77-92, 2006.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 23, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p. 306-313, 2000.

CHOW, Y. W.; WANG, H. L. Functional modulation of P2X₂ receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 2606-2612, 1998.

CHUNG, K.; LEE, B. H.; YOON, Y. W.; CHUNG, J. M. Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. **Journal of Comparative Neurology**, v. 376, p. 241-252, 1996.

COCKAYNE, D. A.; HAMILTON, S. G.; ZHU, Q. M.; DUNN, P. M.; ZHONG, Y.; NOVAKOVIC, S.; MALMBERG, A. B.; CAIN, G.; BERSON, A.; KASSOTAKIS, L.; HEDLEY, L.; LACHNIT, W. G.; BURNSTOCK, G.; MCMAHON, S. B.; FORD, A. P. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. **Nature**, v. 407, p. 1011-1015, 2000.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determination loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DEVAL, E.; GASULL, X.; NOËL, J.; SALINAS, M.; BARON, A.; DIOCHOT, S.; LINGUEGLIA, E. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. **Pharmacology Therapeutics**, v. 128, p. 549-558, 2010.

DEVOR, M.; JÄNIG, W.; MICHAELIS, M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 71, p. 38-47, 1994.

DIXON, R. A.; KOBILKA, B. K.; STRADER, D. J.; BENOVIĆ, J. L.; DOHLMAN, H. G.; FRIELLE, T.; BOLANOWSKI, M. A.; BENNETT, C. D.; RANDS, E.; DIEHL, R. E.; MUMFORD, R. A.; SLATER, E. E.; SIGAL, I. S.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J.; STRADER, C. D. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. **Nature**, v. 321, p. 75-79, 1986.

DORN, G.; PATEL, S.; WOTHERSPOON, G.; HEMMINGS-MIESZCZAK, M.; BARCLAY, J.; NATT, F. J.; MARTIN, P.; BEVAN, S.; FOX, A.; GANJU, P.; Wishart, W.; Hall, J. siRNA relieves chronic neuropathic pain. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 49, 2004.

DUBYAK, G. R.; EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. 577-606, 1993.

EGAN, T. M.; KHAKH, B. S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. **The Journal of Neuroscience**, 24: 3413-3420, 2004.

GARDNER, R. M.; GOLDBERG, A. M., Pain-free animals: An acceptable refinement? **Alternatives to Animal Testing and Experimentation**, v. 14, p. 145-149, 2007.

GILMAN A.G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annual Review Biochemistry**, v. 56, p. 615-49, 1987.

GOLD, M. S.; DASTMALCHI, S.; LEVINE, J. D. Alpha 2-adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. **Pain**, v. 69, p. 179-190, 1997.

GONG, H.; LIU, Q.; YANG, X.; LIU, Z.; LIU, G.; LI, Z. Effects of selective alpha 2-adrenoreceptor stimulation on capsaicin-evoked substance P release from primary cultured dorsal root ganglion neurons. **Pharmazie**, v. 65, p. 202-205, 2010.

GROTE, A.; HANS, M.; BOLDOGKOI, Z.; ZIMMER, A.; STEINHÄUSER, C.; JABS, R. Nanomolar ambient ATP decelerates P2X3 receptor kinetics. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 1212-1218, 2008.

GRÜNDER, S.; Chen, X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1A. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 2, p. 73-94, 2010.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMAN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 391, p. 85-100, 1981.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HESSELAGER, M.; TIMMERMAN, D. B.; AHRING, P. K. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 11006-11015, 2004.

HIURA A. Is thermal nociception only sensed by the capsaicin receptor, TRPV1? **Anatomical Science International**, v. 84, p. 122-128, 2009.

IGAWA, T.; HIGASHI, S.; ABE, Y.; OHKURI, T.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S.; YAMASHITA, T.; TSUDA, M.; INOUE, K.; UEDA, T.) Preparation and characterization of a monoclonal antibody against the refolded and functional extracellular domain of rat P2X4 receptor. **The Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 275-282, 2013.

JÄNIG, W.; BARON, R. Complex regional pain syndrome: mystery explained? **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 687-690, 2003.

JONES, S. L. Descending noradrenergic influences on pain. **Progress in Brain Research**, v. 88, p. 381-394, 1991.

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

KAWAGASHIRA, Y.; KOIKE, H.; FUJIOKA, Y.; HASHIMOTO, R.; TOMITA, M.; MOROZUMI, S.; IJIMA, M.; KATSUNO, M.; TANAKA, F.; SOBUE, G. Differential, size-dependent sensory neuron involvement in the painful and ataxic forms of primary Sjögren's syndrome-associated neuropathy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 319, p. 139-146, 2012.

KHOMULA, E. V.; VIATCHENKO-KARPINSKI, V. Y.; BORISYUK, A. L.; DUZHYY, D. E.; BELAN, P. V.; VOITENKO, N. V. Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 636-649, 2013.

KOSINSKI, S.; BRYJA, M.; WOJTASZOWICZ, R.; GÓRKA, A. Incidence, characteristics and management of pain in one operational area of medical emergency teams. **Anaesthesiology Intensive Therapy**, v. 46, p. 83-87, 2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. ; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, p. 703-728, 2000.

LEONARD, A. S.; YERMOLAIEVA, O.; HRUSKA-HAGEMAN, A.; ASKWITH, C. C.; PRICE, M. P.; WEMMIE, J. A.; WELSH, M. J. cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of the acid-sensing ion channel-1 regulates its binding to the protein interacting with C-kinase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 2029-2034, 2003.

MA, W.; ZHANG, Y.; BANTEL, C.; EISENACH, J. C. Medium and large injured dorsal root ganglion cells increase TRPV-1, accompanied by increased α_2 C-adrenoceptor co-expression and functional inhibition by clonidine. **Pain**, v. 113, p. 386-94, 2005.

MARUO, K.; YAMAMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; NAGATA, T.; FUJIKAWA, H.; KANNO, T.; YAGUCHI, T.; MARUO, S.; YOSHIYA, S.; NISHIZAKI, T. Modulation of P2X receptors via adrenergic pathways in rat dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. **Pain**, v. 120, p. 106-112, 2006.

MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 835-856, 1999.

MINNEMAN, K. P. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . **Pharmacological Reviews**, v. 40, p. 87-119, 1988.

MORAES, E. R.; KALAPOTHAKIS, E.; NAVES, L. A.; KUSHMERICK, C. Differential effects of *Tityus bahiensis* scorpion venom on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium currents. **Neurotoxicity Research**, v. 19, p.102-114, 2011.

NAKAGAWA, H.; HIURA, A. Capsaicin, transient receptor potential (TRP) protein subfamilies and the particular relationship between capsaicin receptors and small primary sensory neurons. **Anatomical Science International**, v. 81, p. 135-155, 2006.

NAVES, L. A.; MCCLESKEY, E. W. An acid-sensing ion channel that detects ischemic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p.1561-1569, 2005.

NEWBOLT, A.; STOOP, R.; VIRGINIO, C.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A.; BUELL, G.; RASSENDREN, F. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 15177-15182, 1998.

NICHOLSON, R.; DIXON, A. K.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience Letters**, v. 380, p. 316-321, 2005.

NORTH, R. A. P2X receptors: a third major class of ligand gated ion channels. **Ciba Foundation symposium**, v. 198, p. 91-105, 1996.

NORTH R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 1013-1067, 2002.

PEREZ, D. M.; DEYOUNG, M. B.; GRAHAM, R. M. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 784-795, 1993.

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 2-7, 2013.

PLUTEANU, F.; RISTOIU, V.; FLONTA, M. L.; REID, G. Alpha(1)-adrenoceptor-mediated depolarization and beta-mediated hyperpolarization in cultured rat dorsal root ganglion neurones. **Neuroscience Letters**, v. 329, p. 277-280, 2002.

POIROT, O.; BERTA, T.; DECOSTERD, I.; KELLENBERGER, S. Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. **The Journal of Physiology**, v. 576, p. 215-234, 2006.

PRIEL, A.; GIL, Z.; MOY, V. T.; MAGLEBY, K. L.; SILBERBERG, S. D. Ionic requirements for membrane-glass adhesion and giga seal formation in patch-clamp recording. **Biophysical Journal - Cell**, v. 92, p. 3893-3900, 2007.

PROUDFIT, H.K. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. **Progress in Brain Research**, v. 77, p. 357-370, 1988.

SCHULTE, H. ; SOLLEVI, A. ; SEGERDAHL, M. **The synergistic effect of combined treatment with systemic ketamine and morphine on experimentally induced windup-like pain in humans**, v. 98, p. 1574-1580, 2004.

SCOTT, S. A. Sensory Neurons: Diversity, Development, and Plasticity. Editora Oxford, 1992.

SHI, T. S.; WINZER-SERHAN, U.; LESLIE, F.; HOKFELT, T. Distribution and regulation of $\alpha 2$ -adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. **Pain**, 84: 319–330, 2000.

SHINODA, M.; LA, J. H.; BIELEFELDT, K.; GEBHART, G. F. Altered purinergic signaling in colorectal dorsal root ganglion neurons contributes to colorectal hypersensitivity. **Journal of Neurophysiology**, v. 104, p. 3113-3123, 2010.

SORRIENTO, D.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. Adrenergic mechanism in the control of endothelial function. **Translational Medicine**, v. 01, p. 213-228, 2011.

SUTHERLAND, S. P.; BENSON, C. J.; ADELMAN, J. P.; MCCLESKEY, E. W. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 711-716, 2001.

TAN, Y.; SUN, L.; ZHANG, Q. Noradrenaline enhances ATP P2X3 receptor expression in dorsal root ganglion neurons of rats. **Neuroscience**, v. 176, p. 32-38, 2011.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, p. 531-543, 1998.

TREVISANI, M.; CAMPI, B.; GATTI, R.; ANDRÉ, E.; MATERAZZI, S.; NICOLETTI, P.; GAZZIERI, D.; GEPPETTI, P. The influence of $\alpha 1$ -adrenoreceptors on neuropeptide release from primary sensory neurons of the lower urinary tract. **European Urology**, v. 52, p. 901-908, 2007.

TSUDA, M.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; MIZOKOSHI, A.; KOHSAKA, S.; SALTER, M. W.; INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, 424(6950):778-83, 2003.

VALERA, S.; HUSSY, N.; EVANS, R. J.; ADAMI, N.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A.; BUELL, G. A new class of ligand gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. **Nature**, v. 371, p. 516-519, 1994.

VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Sensing with TRP channels. **Nature Chemical Biology**, v. 01, p. 85-92, 2005.

VRIENS, J.; NILIUS, B.; VENNEKENS, R. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. **Current Neuropharmacology**, v. 06, p. 79-96, 2008.

XIE, J.; LEE, Y. H.; WANG, C.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. Differential expression of α 1-adrenoceptor subtype mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. **Molecular Brain Research**, v. 93, p. 164-172, 2001.

XIONG, Z.; LIU, Y.; HU, L.; MA, B.; AI, Y.; XIONG, C. A rapid facilitation of acid-sensing ion channels current by corticosterone in cultured hippocampal neurons. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1446-1453, 2013.

XU, X.; WANG, P.; ZOU, X.; LI, D.; FANG, L.; GONG, K.; LIN, Q. The effects of sympathetic outflow on upregulation of vanilloid receptors TRPV(1) in primary afferent neurons evoked by intradermal capsaicin. **Experimental Neurology**, v. 222, p. 93-107, 2010.

YAGI, J.; WENK, H.N.; NAVES, L. A.; MCCLESKEY, E. W. Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. **Circulation Research**, v. 99, p. 501-509, 2006.

ZHANG, Q.; TAN, Y. Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats. **Neuroscience**, v. 193, p. 72-79, 2011.

ZHANG, X.; PIETRA, C.; LOVATI, E.; DE GROAT, W. C. Activation of neurokinin-1 receptors increases the excitability of guinea pig dorsal root ganglion cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, p. 44-52, 2012.

WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; BASSILANA, F.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature**, 386:173-177, 1997.

WANG, Y. J.; LI, X. F.; DING, F.; SHU, Q.; SONG, L. J.; YU, X.; LIU, H. X. Noradrenaline regulates substance P release from rat dorsal root ganglion neurons in vitro. **Neuroscience Bulletin**, v. 27, p. 300-306, 2011.

WEMMIE, J. A.; PRICE, M. P.; WELSH, M. J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 578-586, 2006.

WU, D.; KATZ, A.; LEE, C. H.; SIMON, M. I. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 25798-25802, 1992.

12. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado com recursos da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).