

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Helia Tenza Ferrer

**ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA
TOXINA Ph α 1 β E DA ω -CONOTOXINA MVIIA NA DOR INFLAMATÓRIA
PERIFÉRICA**

BELO HORIZONTE

2019

Helia Tenza Ferrer

**ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS DA GLIA NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA
TOXINA Ph α 1 β E DA ω -CONOTOXINA MVIIA NA DOR INFLAMATÓRIA
PERIFÉRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Medicina Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcus V. Gomez
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Alexandre V. Magno
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana F. da Silva

**BELO HORIZONTE
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Ferrer, Helia Tenza

Envolvimento das células da glia na ação antinociceptiva da
toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ e da ω -conotoxina MVIIA na dor inflamatória
periférica [manuscrito] / Helia Tenza Ferrer. - 2019.

99 p. : il.

Orientador: Marcus Vinicius Gomez.

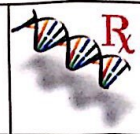
Coorientador: Luiz Alexandre Viana Magno.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1.Inflamação. 2.Glia. 3.Toxinas terapêuticas. 4.Dor. I.Gomez,
Marcus Vinicius . II.Magno, Luiz Alexandre Viana.
III.Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.
IV.Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR




FOLHA DE APROVAÇÃO

ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NA AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA TOXINA PHA1B E DA Ω -CONOTOXINA MVIIA NA DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA.

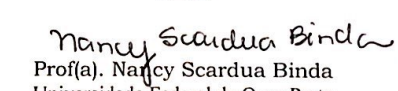
HELIA TENZA FERRER

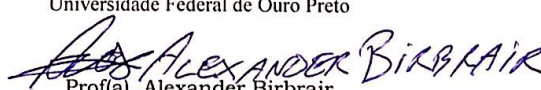
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 08 de março de 2019, pela banca constituída pelos membros:

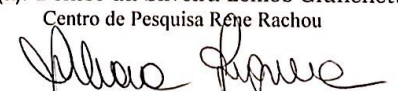

Prof(a). Marcus Vinicius Gomez - Orientador
UFMG


Prof(a). Marco Aurelio Romano Silva
UFMG


Prof(a). Nancy Scardua Binda
Universidade Federal de Ouro Preto


Prof(a). Alexander Birbrair
Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de


Prof(a). Denise da Silveira Lemos Giunchetti
Centro de Pesquisa René Rachou


Prof(a). Juliana Figueira da Silva
Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH

Belo Horizonte, 8 de março de 2019.

***Ao meu amigo, amor e coorientador,
Alexandre Magno***

AGRADECIMENTOS

Eu tenho muito a agradecer pela realização desta Tese. O caminho até aqui não foi fácil. Vir para um país novo, com cultura e língua diferentes, sem amigos de sempre, uma gestação, e sem a família por perto. Tive um grande desafio: conseguir desenvolver um projeto que fosse interessante com as ferramentas que tínhamos na mão. Mas aqui estamos, com um estudo bonito e interessante. Por isso, eu gostaria de agradecer as pessoas que ficaram comigo durante estes anos ou que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Primeiro eu quero agradecer à minha família: pai, mãe e irmã. Eles sempre confiaram em mim, na minha capacidade de conseguir aquilo que eu me propusesse. Os meus pais, Miquel e Mercè, sempre me concederam tudo o que eu precisei, mesmo que fosse um grande esforço para eles. Aprendi com eles o amor incondicional que eu tenho pelas pessoas que eu amo. À minha irmã e amiga Alba, agradeço a preocupação e o amor que sempre teve por mim, como uma filha. Agradeço que sempre me escutaram atentos a tudo que eu expunha sobre ciência, mesmo que não compreendessem muitas coisas. Eu gosto muito das conversas que eu tenho com vocês três, mesmo de longe, que sempre me encham o vazio da distância. Aqui, expressarei em minha língua materna: *“Estar lluny és difícil, però ho fa més fàcil el saber que sempre puc comptar amb vosaltres. Us estimo, us trobo a faltar, però sé que sempre esteu al meu costat”*.

Ao meu professor e orientador Marcus Vinicius Gomez. Você confiou às cegas em mim para este projeto, sem me conhecer tão bem. Sou grata a esta grande oportunidade que tive e espero ter alcançado às suas expectativas. Agradeço a liberdade que você me ofereceu dentro do mundo da ciência. Para mim, foi uma honra trabalhar com um cientista do seu calibre. Compreendi o porquê de você ser uma eminência nacional. Você fez grandes descobertas, formou e inspirou grandes cientistas. Ver o quanto você gosta da pesquisa e do seu trabalho é uma inspiração para muitas pessoas.

Eu tive a grande sorte de ter dois laboratórios durante todo esse tempo. Não vou negar que no início isso me deixava maluca, tendo que ir de um lado para outro,

mas, ao mesmo tempo isso me proporcionou conhecer mais pessoas interessantes. É por isso que eu quero agradecer as pessoas do IEP (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH), sobretudo aos colegas do laboratório da época, em especial, Juliana e Nancy que me ajudaram muito, sobretudo no início. À Juliana, minha coordenadora, você souou ao meu lado durante experimentos bem pesados que acabaram resumidos em apenas um gráfico. Sempre serei grata. Desejo o seu sucesso de todo coração.

Eu quero agradecer também as pessoas da Faculdade de Medicina da UFMG. Aos funcionários da Pós-graduação e da portaria, em especial ao João que sempre me perguntava sobre as minhas idas e vindas de um laboratório a outro, e a Kelliene pelo seu carinho durante a minha gestação e as suas conversas de mãe. Também aos funcionários do biotério, Marcelo e a Flávia, que sempre foram muito prestativos com a minha pesquisa, ajudando em tudo o que é possível para que os experimentos fossem corretos. Em especial eu quero agradecer ao Laboratório de Medicina Molecular. Aos professores Luiz Armando pela atenção oferecida sempre que precisei, Débora pelo carinho que sempre me deu, ao Marco Aurélio pelas dicas de experimentos e por facilitar o meu uso do laboratório como um de seus alunos (obrigada pelo iMac!). Também agradeço a todos os alunos do laboratório. Eu vi muitos de vocês crescerem cientificamente. Foi um prazer ensinar algumas técnicas para vocês e ver que agora vocês aplicam elas com grande habilidade. Não só vocês aprenderam, eu também aprendi muito com vocês. Por isso gostaria muito de agradecer ao Eduardo (foi um prazer colaborar no seu projeto de mestrado), Fernanda, Nycolle, Matheus, Ana Paula, Joice, e Rodrigo... muitos de vocês começaram como ICs e agora já estão bem adaptados na pós-graduação. É um prazer trabalhar e conviver com pessoas dedicadas e delicadas. Débora Moraes, você não poderia faltar nos meus agradecimentos, pelo seu carinho e amizade, a maternidade da mãe de primeira viagem foi melhor compartilhada com você. Mércar, você foi quem mais aprendeu as minhas técnicas, e você me ofereceu uma amizade bonita e virou uma babá incrível que adoramos. Um agradecimento bem especial a Dani, mais que amiga e colega do laboratório, pelo seu ensino, companhia, amizade e por ser a tia Naná. Ter pessoas queridas como você por perto é reconfortante - você torna amena a falta da minha família e antigos amigos de Barcelona.

Agora é a vez das amizades de Barcelona: vocês são mais do que amigas, estando presentes mesmo na distância, se preocupando por mim e por tudo o que eu faço. Porque as amizades de verdade continuam iguais mesmo com a distância e com o passo do tempo. Laia, Mercè, Montse, Núria e Aina: *Sou úniques i especials, sóc afortunada de tenir-vos al costat. Us estimo, us trobo a faltar.* Às minhas amigas e irmãs Sara e Marta: vocês acharão que estou exagerando, mas sinto falta de sair e conversar com vocês. Marta, *gracias por estar siempre a mi lado, admiro toda la energía que dedicas para crecer y conseguir lo que quieres; eres muy especial. Sara, echo de menos nuestra rutina en Barcelona, tu amistad todavía me acompaña.*

Eu gostaria de agradecer também as minhas amizades de Québec, Canadá. Sem eles por perto durante a minha experiência no mestrado, teria sido bem diferente a minha passagem pelo Brasil. Vocês são pessoas muito especiais que sempre levarei comigo aonde eu for. Lusiné, Jivan, Archana, Delphine, Linda, Karen, Caro, Terry, Yanina, Aditi and Ghazal: *all I learned with you in Québec, and all the love and friendship you gave me, I brought here in Brazil and will always be a part of me. Vous êtes très especiales pour moi. Bonnie et Tim, j'ai jamais trouvé une famille autant tranquille, amoureuse, et belle comment vous. On vous aime beaucoup.*

Não posso esquecer das amizades que fiz no Brasil. Alexander e Veranika, vocês me ofereceram amizade sem fronteiras e muitas dicas tanto profissionais quanto pessoais. Isso sem contar as inúmeras vezes que nos divertimos com as pequenas. Fernanda e Pablo, vocês já não estão no Brasil, mas coloco o meu agradecimento aqui porque foi onde os conheci. Sempre achei vocês especiais, me fazendo sentir confortável e me divertindo ao seu lado. Nos vemos muito pouco agora, mas sempre penso em vocês. *¡Mucho éxito para vosotros!*

À minha família do Brasil. Vocês me acolheram desde o primeiro dia como mais um de vocês. Eu sou afortunada de ter vocês ao meu lado, mesmo que seja na distância. Joana, minha sogra, você muda o conceito ruim que muitas pessoas têm de "sogra", você me ajuda e me cuida como a uma filha, por isso sempre levo você no meu coração. Lívio, o único da família que temos por perto, é muito bom ter você conosco, a sua companhia é especial; eu não poderia ter um cunhado melhor. A

Alline, Silvio, Silvinho e Maria, pelos momentos tão bons que passamos sempre que nos encontramos. Amo a minha família brasileira.

Para finalizar, eu deixei por último as pessoas mais importantes para mim: Alexandre e Olívia. Alex, você transformou a minha vida. É um prazer ter você de coorientador deste trabalho. Eu aprendi a ser melhor em tudo. Minha admiração por você como profissional sempre incrementa. Eu gostaria que o mundo inteiro soubesse o quanto bom você é como pesquisador e professor. As suas aulas são incríveis, teria gostado ter professores como você na minha vida. Você não só me ensinou no lado profissional, também na parte pessoal. Eu cresci ao seu lado, sempre me mostrando que devo confiar mais em mim, nas minhas capacidades. Você me ensinou o significado de amar a outra pessoa. Eu tenho a sorte de estar *enamorado* do meu melhor amigo. Eu te amo. Foi por isso que, com muito medo (não vou negar) decidi seguir você até o Brasil, e graças a essa decisão agora temos uma linda “*miniatura de nosaltres*”: Olívia! também quero te agradecer. Você é muito pequena ainda para saber o que eu escrevo neste trabalho, mas, quem sabe algum dia você o lerá. Você mudou a minha percepção da maternidade e da vida em geral. Acordar cada dia e ver você crescendo mais linda e esperta me dá a energia que preciso para continuar lutando para um futuro melhor para você. Você me ensinou o meu lado mais dedicado, amável e amoroso. Só sendo mãe, soube de verdade o tanto que os pais se sacrificam pelos filhos, mas também o tanto que os pais aprendem. *T'estimo molt preciosa!*

Antes de acabar, gostaria de fazer uma menção especial a todos os animais usados neste estudo. Poderá parecer algo engraçado ou maluco, mas, para ser sincera, o uso e sacrifício de animais era a parte ruim da pesquisa. Por isso, eu quero dar valor a todos esses seres que fizeram possível executar este estudo. Espero que o futuro nos depare com métodos de pesquisa que não precisem o uso de animais e preserve o mesmo valor e fidelidade científica.

"Somewhere, something incredible is waiting to be known"

**Em algum lugar, algo incrível está esperando para
ser descoberto**

Carl Sagan

RESUMO

A lesão inflamatória de origem periférica aumenta a sensibilidade sensorial a um estímulo mecânico de leve intensidade, provocando dor, um processo conhecido como alodinia. A recente descoberta de que astrócitos e micróglia da medula espinal tornam-se reativos devido à inflamação periférica, sugere que a glia deve estar envolvida na manifestação patológica da dor. Nesta tese, observou-se que a inflamação periférica, induzida pela injeção intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA), causa alodinia mecânica assim como mudanças na glia. Dentre essas mudanças destacamos o aumento de marcadores específicos da glia, aumento da proliferação de astrócitos assim como alterações morfológicas na micróglia, todas elas características do fenótipo reativo da glia. Além disso, este estudo descobriu que a injeção intratecal da toxina de aranha Ph α 1 β , um peptídeo com ação analgésica que bloqueia canais de cálcio dependente de voltagem (VGCC), reverte todas as alterações da glia da medula espinal causadas pela inflamação periférica. Essas observações, em resumo, sugerem que a toxina Ph α 1 β , além de sua já reconhecida ação analgésica, também possui efeitos anti-inflamatórios sobre a plasticidade glial.

Palavras-chave: glia, morfologia, dor inflamatória, canais de cálcio dependente de voltagem, Ph α 1 β .

ABSTRACT

A peripheral inflammatory injury increases the mechanical sensitivity in response to light-touch, also named as allodynia. The discovery that spinal astrocytes and microglia become reactive to the peripheral inflammation suggests that the glia presumably engage with the pain pathophysiology. Here, we found that the peripheral inflammation induced by intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA) produce mechanical allodynia and robust changes in the spinal glial. Among these changes we found an increase of specific glial markers, increment of astrocytes proliferation, elevation of microglia density and morphologic changes, all of them compatible with the glia reactive phenotype. Moreover, we found that intrathecal injection with the analgesic Ph α 1 β spider toxin, a voltage-gated calcium channel (VGCC) blocker, reverses all the glial pathological features of the peripheral inflammation. We therefore suggest that the Ph α 1 β toxin, apart from its notable analgesic effects, is also a potent anti-inflammatory compound acting on glial plasticity.

Keywords: glia, morphology, inflammatory pain, voltage-gated calcium channels, Ph α 1 β .

LISTA DE FIGURAS

Figuras da introdução

FIGURA 1 -	VIA DE TRANSMISSÃO DA DOR.....	23
FIGURA 2 -	RECEPTORES SENSORIOS.	24
FIGURA 3 -	MEDULA ESPINAL LOMBAR	26
FIGURA 4 -	TIPOS DE GLIA	28
FIGURA 5 -	FUNÇÕES E RECEPTORES DOS ASTRÓCITOS	30
FIGURA 6 -	SINAPSE TRIPARTITA.....	32
FIGURA 7 -	CANAIIS IÔNICOS NA MICRÓGLIA.....	33
FIGURA 8 -	RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES NA MICRÓGLIA	34
FIGURA 9 -	MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS	40
FIGURA 10 -	MORFOLOGIA DA MICRÓGLIA	42
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO DA SINAPSE COM OS CANAIIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS A VOLTAGEM.....	44
FIGURA 12 -	FRAÇÕES DO VENENO DA <i>PHONEUTRIA NIGRIVENTER</i>	46

Figuras do artigo

FIGURE 1. PERIPHERAL INFLAMMATION INDUCES ASTROCYTE REACTIVITY IN THE SPINAL CORD.	61
FIGURE 2. PERIPHERAL INFLAMMATION INDUCES MICROGLIA REACTIVITY IN THE SPINAL CORD	64
FIGURE 3. PERIPHERAL INFLAMMATION DID NOT ALTER THE CONCENTRATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS AND GLUTAMATE IN DRG NOR SPINAL CORD.	66
FIGURE 4. THE CALCIUM-CHANNEL BLOCKER TOXIN $Ph\alpha 1\beta$ REVERSES ALLODYNIA AND GLIAL REACTIVITY. ..	71
FIGURE 5. THE $Ph\alpha 1\beta$, BUT NOT THE <i>MVIIA</i> TOXIN, REVERSES ASTROCYTE PROLIFERATION INDUCED BY PERIPHERAL INFLAMMATION	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPA:** Receptor ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)
- ASICs:** Canais iônicos sensíveis a ácido (Acid-sensing ion channels)
- ATP:** Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
- BBB:** Barreira hematoencefálica (Blood–brain barrier)
- BDNF:** Fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain-derived neurotrophic factor)
- BrdU:** Bromodeoxyuridina
- BSA:** Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
- CatS:** Cathepsina S
- CCI:** Constrição crônica do nervo ciático.
- CCL2:** Proteína quimioatraente de monócitos
- CD11:** Grupamento de diferenciação 11 (Cluster of differentiation 11)
- CFA:** Adjuvante completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant)
- CNS:** Sistema nervoso central (Central nervous system)
- DRG:** Raiz do gânglio dorsal (Dorsal root ganglia)
- GABA:** Ácido gama aminobutírico (Gamma aminobutyric acid)
- GDH:** Glutamato desidrogenase (Glutamate dehydrogenase)
- GFAP:** Proteína glial fibrilar ácida (Glial fibrillary acidic protein)
- GM-CSF:** Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- GVCCs:** Canais de cálcio sensíveis a voltagem (Voltage-gated Ca^{2+} channels)
- Iba1:** Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)
- IFN:** Interferon
- IL-...:** Interleucina ...
- KRH:** Solução de Krebs-Ringer-Henseleit (Krebs-Ringer-Henseleit solution)
- MAPK:** Proteína quinase ativada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase)
- mGluR:** Receptor metabotrópico de glutamato (Metabotropic glutamate receptor)
- MHCII:** Complexo principal de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex II)

mRNA: RNA (ácido ribonucleico) mensageiro

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NG2: Antígeno 2 neural/glião (Neural/Glial Antigen 2)

NK1: Neuroquinina tipo 1 (Neurokinin 1)

NMDA: N-metil D-Aspartato

P2X: Receptor purinérgico

PB: Tampão fosfato (Phosphate buffer)

PBS: Tampão fosfato-salino (Phosphate buffer saline)

PFA: Paraformaldeído

PNS: Sistema nervoso periférico (Peripheral nerve system)

RI: Índice de regularidade (Regularity index)

ROI: Região de interesse (Region of interest)

SEM: Erro padrão da média (Standard error of the mean)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

TNF: Fator de necrose tumoral (Tumor necrosis factor)

TrKA: Receptor quinase tropomiosina A (Tropomyosin receptor kinase A)

TrKB: Receptor quinase tropomiosina B (Tropomyosin receptor kinase B)

TRP: Receptor de potencial transiente (Transient receptor potential channel)

TRPA1: Receptor de potencial transiente anquirina 1 (Transient receptor potential ankyrin 1)

TRPM8: Receptor de potencial transiente subfamília M membro 8 (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8)

TRPV1: Receptor de potencial transiente vanilóide 1 (The vanilloid transient receptor potential cation channel)

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular (Vascular endothelial growth factor)

LISTA DE SÍMBOLOS

μl: microlitro

μm: micrómetro

%: porcentagem

°C: graus centígrados

®: registrado

g: grama

h: hora

Hz: Hertz

kg: quilograma

M: molar

mg: miligrama

ml: mililitro

mm: milímetro

pH: escala numérica adimensional utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução aquosa.

pmol: picomol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	A DOR	21
1.2	A DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA	22
1.3	CÉLULAS DA GLIA DO SNC	28
1.3.1	Astrócitos	29
1.3.2	Micróglia	32
1.4	CELULAS DA GLIA E A DOR	37
1.5	MORFOLOGIA GLIAL	39
1.6	TOXINAS TERAPEUTICAS	43
2	OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	RESULTADOS: ARTIGO PARA SUBMISSÃO	51
3.1	ABSTRACT	52
3.2	INTRODUCTION	53
3.3	METHODS	54
3.3.1	Animals	54
3.3.2	Drugs and treatments	54
3.3.3	Induction of inflammatory pain	55
3.3.4	Intrathecal injection	55
3.3.5	von Frey testing	55
3.3.6	Tissue sections and immunofluorescence	56
3.3.7	Microglia morphology	57
3.3.8	Luminex assay	58
3.3.9	Glutamate determination	58
3.3.10	Statistics	59
3.4	RESULTS	59
3.4.1	Peripheral inflammation induces astrocyte reactivity in the spinal cord	59
3.4.2	Peripheral inflammation induces microglia reactivity in the spinal cord	62
3.4.3	Peripheral inflammation did not alter the concentration of inflammatory mediators and glutamate in DRG nor spinal cord	65
3.4.4	The calcium-channel blocker toxin Ph α 1 β reverses allodynia and glial reactivity.	66

3.4.5	The $\text{Ph}\alpha 1\beta$, but not the MVIIA toxin, reverses astrocyte proliferation induced by peripheral inflammation.	72
3.5	DISCUSSION	74
4	CONCLUSÃOError! Bookmark not defined.	
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

Por que meio uma lesão no tecido periférico é capaz de penetrar e causar danos no sistema nervoso central (SNC)? Por muito tempo acreditou-se que os neurônios sensoriais fossem os impulsores sinápticos que, de modo solitário, estabeleciam a conexão entre os mediadores inflamatórios produzidos na periferia e o SNC. Esse processo é justificado pelo fato de que essas células expressam vários tipos de receptores que detectam diferentes moléculas patogênicas e inflamatórias (PAVLOV *et al.*, 2018). Entretanto, evidências mais recentes revelaram que o processamento da informação neuroinflamatória de origem periférica é complexo e também envolve a participação de outras vias fisiológicas, por exemplo, por meio da ação de citocinas circulantes e o recrutamento das células da glia do SNC (PAN *et al.*, 2011; JHA *et al.*, 2012).

As células da glia do SNC, como astrócitos e micróglia, tem importantes funções homeostáticas, bem descritas, sobre o tecido nervoso saudável. Por exemplo, a regulação da homeostase, modulação da atividade sináptica, eliminação de sinapses (via fagocitose), imunidade, fluxo sanguíneo, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB), entre outras, são funções gliais bem elucidadas (NIMMERJAHN *et al.*, 2005; PEKONY, M. e NILSSON, 2005; HANISCH e KETTENMANN, 2007; GRAEBER e STREIT, 2010; TREMBLAY *et al.*, 2011). A glia também é um componente ativo com relevância clínica em situações patológicas. Na medula espinal, por exemplo, astrócitos e micróglia alteram o padrão de expressão molecular, proliferam-se e modificam sua morfologia em resposta a um evento inflamatório no tecido nervoso, sendo essas características estudadas com frequência na nocicepção (WATKINS *et al.*, 2001; TSUDA *et al.*, 2003; MCMAHON *et al.*, 2005; BRADESI, 2010).

Todavia, há muito a se conhecer sobre a influência da glia na neuroinflamação e nocicepção. Por exemplo, o conhecimento da distribuição espacial e temporal de como as alterações morfológicas da glia se desenvolvem em resposta a um insulto periférico, bem como seus determinantes moleculares adjacentes, é de fundamental importância para a racionalização terapêutica da dor e inflamação do SNC. Desse modo, essa tese teve como alvo principal acrescentar conhecimento sobre essas questões específicas, utilizando como modelo experimental ratos apresentando hiperalgisia induzida por um modelo de inflamação na pata. As consequências do evento inflamatório periférico e o tratamento com toxinas bloqueadoras de canais de

cálcio sobre a proliferação e morfologia glial foram estudadas na medula espinal e os resultados obtidos são apresentados na forma de um manuscrito.

1.1 A DOR

A dor é uma sensação que quase ninguém gosta de sentir, mas é uma das ferramentas de comunicação mais importante do nosso organismo. A habilidade de detectar um estímulo nocivo é essencial para a sobrevivência de qualquer organismo. De fato, qualquer indivíduo que seja incapaz de detectar um estímulo doloroso não consegue se proteger em um momento de perigo (COX *et al.*, 2006). Porém, a dor, seja da origem que seja, também é uma experiência sensorial e emocional não prazerosa.

Embora que a experiência de dor possa variar de uma pessoa a outra (por exemplo, algumas pessoas são mais sensíveis a um estímulo de mesma intensidade), é possível classificar os diferentes tipos de dor, como em dor aguda e dor crônica. A dor aguda é súbita, normalmente causada por um estímulo de duração limitada, desaparecendo quando o estímulo é removido. Pisar em uma peça de Lego® é um exemplo de dor aguda (SMITHSONIAN.COM, 2018). A dor aguda é uma das principais razões dos pacientes procurar serviço médico. A maior parte dos pacientes conseguem seguir com a sua vida normal, mas a depender da evolução clínica, alguns pacientes acabam sofrendo de dor crônica. Esse tipo de dor é causado por uma exposição prolongada a um estímulo nocivo e, paradoxalmente, em algumas situações clínicas a sensação de dor é continuada mesmo com a eliminação do estímulo desencadeador da dor. Por exemplo, durante uma estimulação nociceptiva duradoura, acontecem processos inflamatórios e mudanças na expressão gênica no DRG (gânglio da raiz dorsal) e nos neurônios da medula espinal que provocam a continuidade da sensação dolorosa mesmo sem o estímulo nocivo (FEIZERFAN e SHEH, 2014). Isso normalmente decorre de uma perturbação persistente da homeostase tecidual, a qual custa a voltar à “normalidade”, por exemplo, através do bloqueio da resposta inflamatória. A dor crônica é um problema complexo e multifatorial (LAVAND'HOMME, 2011). Outra forma de classificar a dor seria segundo o tipo de insulto, por exemplo, em dor do tipo neuropática por lesão do nervo ou inflamatória por lesão do tecido, sendo o último abordado por este estudo.

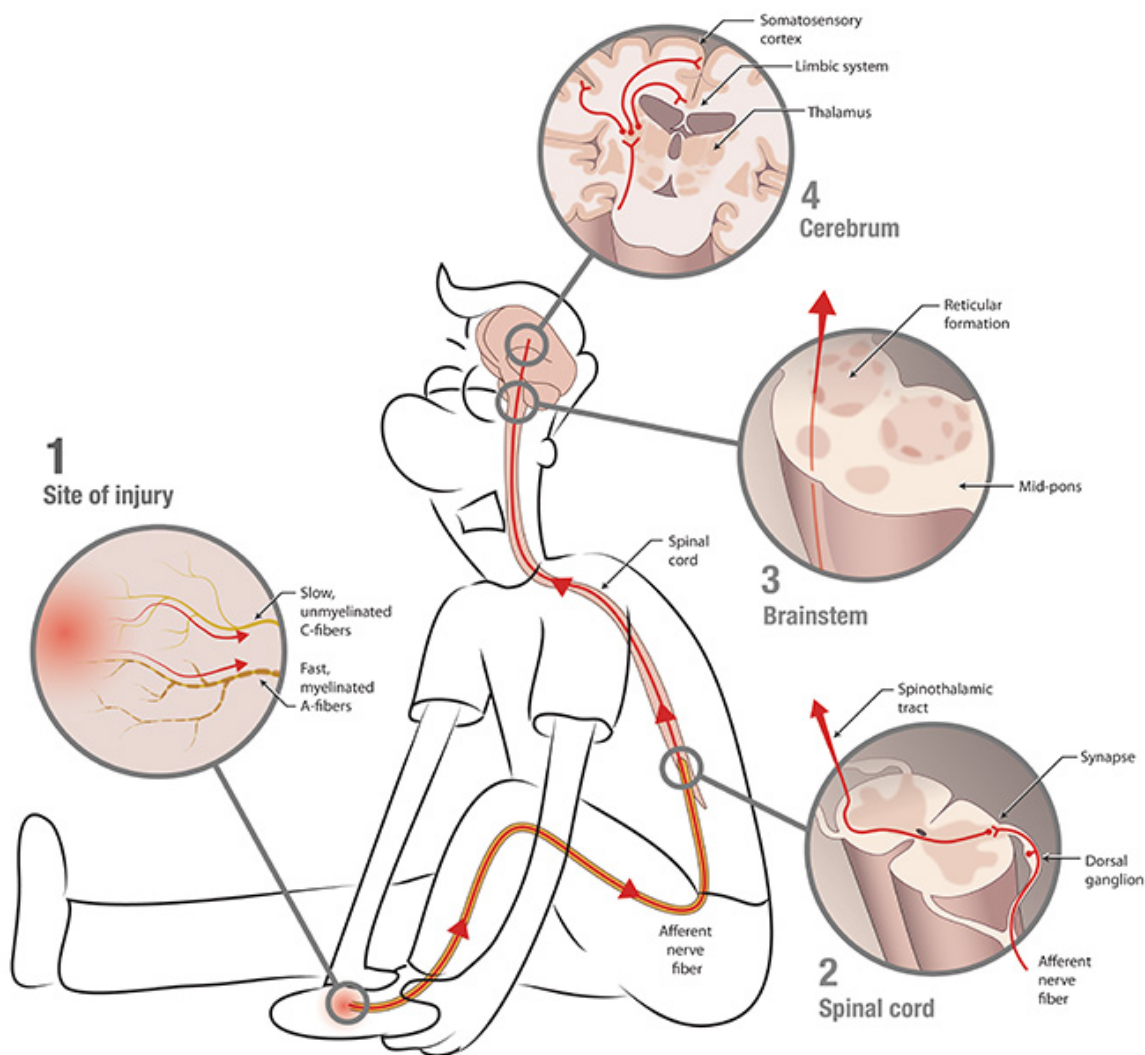
1.2 A DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA

A relação entre os sistemas sensorial e imunológico é bem conhecida (PAVLOV *et al.*, 2018). A proximidade física entre os nociceptores (localizados no terminal periférico de neurônios sensoriais) e as células apresentadoras de antígenos sobretudo nos tecidos da periferia torna atraente o estudo do acoplamento desses sistemas na manifestação dos estados de dor aguda e crônica (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

A inflamação periférica provocada por um trauma ou por uma infecção na periferia do corpo (aqui considerada como a parte do corpo situada fora do SNC) pode induzir alterações marcantes no SNC (THOMSON *et al.*, 2014). O fluxo de comunicação entre a lesão periférica, o sistema imunológico e o SNC, mesmo sendo bem estudado, ainda está longe de ser completamente elucidado. O insulto causado pela inflamação periférica provoca a hiperativação de células imunes, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios que sensibilizam os terminais periféricos de neurônios sensoriais localizados no sítio lesionado (TALBOT *et al.*, 2016). Através de sinapses com neurônios medulares, neurônios sensoriais conduzem a informação da lesão ao SNC, onde será processada e reconhecida como dor (Figura 1). Esse processo, se persistir, contribui para que a sensação dolorosa se converta em uma forma debilitante de dor crônica. Como resultado, um estímulo inócuo (pisar no chão, por exemplo) pode se tornar doloroso (alodinia) ou com alta intensidade (hiperalgesia) (MCMAHON *et al.*, 2015).

Os nervos sensoriais, que transmitem a sensação dolorosa da periferia, são capazes de detectar estímulos térmicos, mecânicos ou químicos, por vezes nocivos, por meio de receptores específicos chamados de nociceptores. A transmissão dessa modalidade sensorial é chamada de nocicepção (BASBAUM *et al.*, 2009). Assim como outros receptores sensoriais cutâneos e subcutâneos, os nociceptores transduzem essa variedade de estímulos em forma de potenciais de receptor, os quais desencadeiam potenciais de ação aferentes.

Figura 1 - Via de transmissão da dor



Fonte:

Figura ilustrativa e resumida da transmissão da dor desde a periferia até o SNC.

Fonte: Disponível em <<https://4.bp.blogspot.com>> Acesso em 15/02/2019

O corpo celular dos neurônios sensoriais está localizado em um gânglio da raiz dorsal (DRG), o qual situa-se lateralmente à medula espinhal e, portanto, fora do SNC. Os neurônios sensoriais têm uma morfologia única, chamada de pseudounipolar, onde ambos os terminais (central e periférico) emanam de um mesmo talo axonal comum. O terminal axonal periférico situa-se no órgão alvo, por tanto, na periferia, enquanto o braço central se dirige à medula espinhal, no SNC. Os neurônios sensoriais também se diferenciam em mielinizados e não mielinizados. Os mielinizados têm fibras chamadas A δ , consideradas fibras de diâmetro médio que respondem a uma

primeira sensação dolorosa ou aguda bem localizada. Já os não mielinizados são constituídos por fibras C de diâmetro pequeno que transmitem as sensações dolorosas de forma mais lenta e não bem localizadas (BASBAUM *et al.*, 2009). Outro tipo de fibra nervosa, as fibras A β , consideradas de grande diâmetro e de rápida condutância, contém receptores sensoriais não nociceptores, portanto, respondem a estímulos mecânicos inócuos.

Os neurônios sensoriais também podem se diferenciar pela expressão de receptores periféricos, os quais conferem diversas sensibilidades a diferentes estímulos. Por exemplo, TRPV1 para sensações de calor, TRPM8 para frio, ASICs para substâncias ácidas e TRPA1 para substâncias químicas irritantes. Diferente de outros receptores sensórios, a maioria dos nociceptores são polimodais, portanto, respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (JULIUS e BASBAUM, 2001). No entanto, alguns nociceptores são seletivos nas respostas a estímulos, mostrando seletividade para estímulos mecânicos (mecanociceptores), a estímulos térmicos (termonociceptores) e a estímulos químicos (nociceptores químicos). (Figura 2)

Figura 2 - Receptores sensórios.

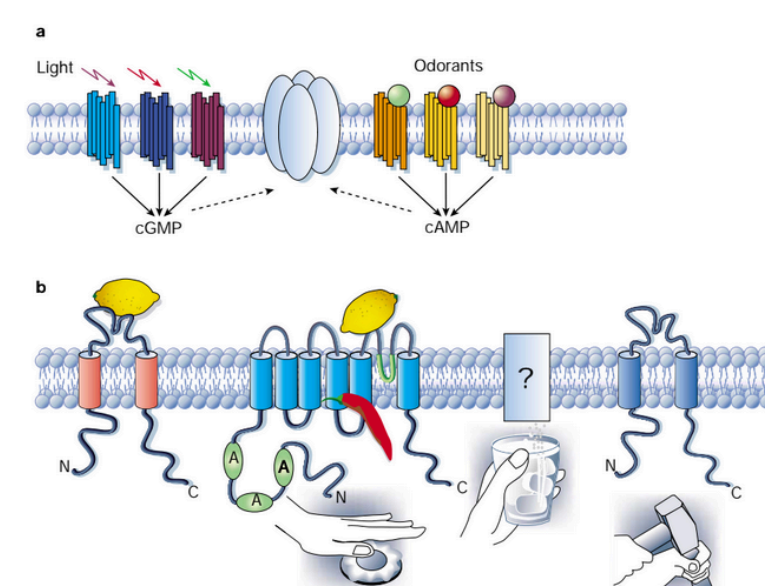


Figura ilustrativa de receptores sensórios. Em (a) uma representação de receptores sensórios que respondem a um tipo de estímulo. Em (b) nociceptores, onde alguns receptores conseguem detectar diferentes tipos de estímulos.

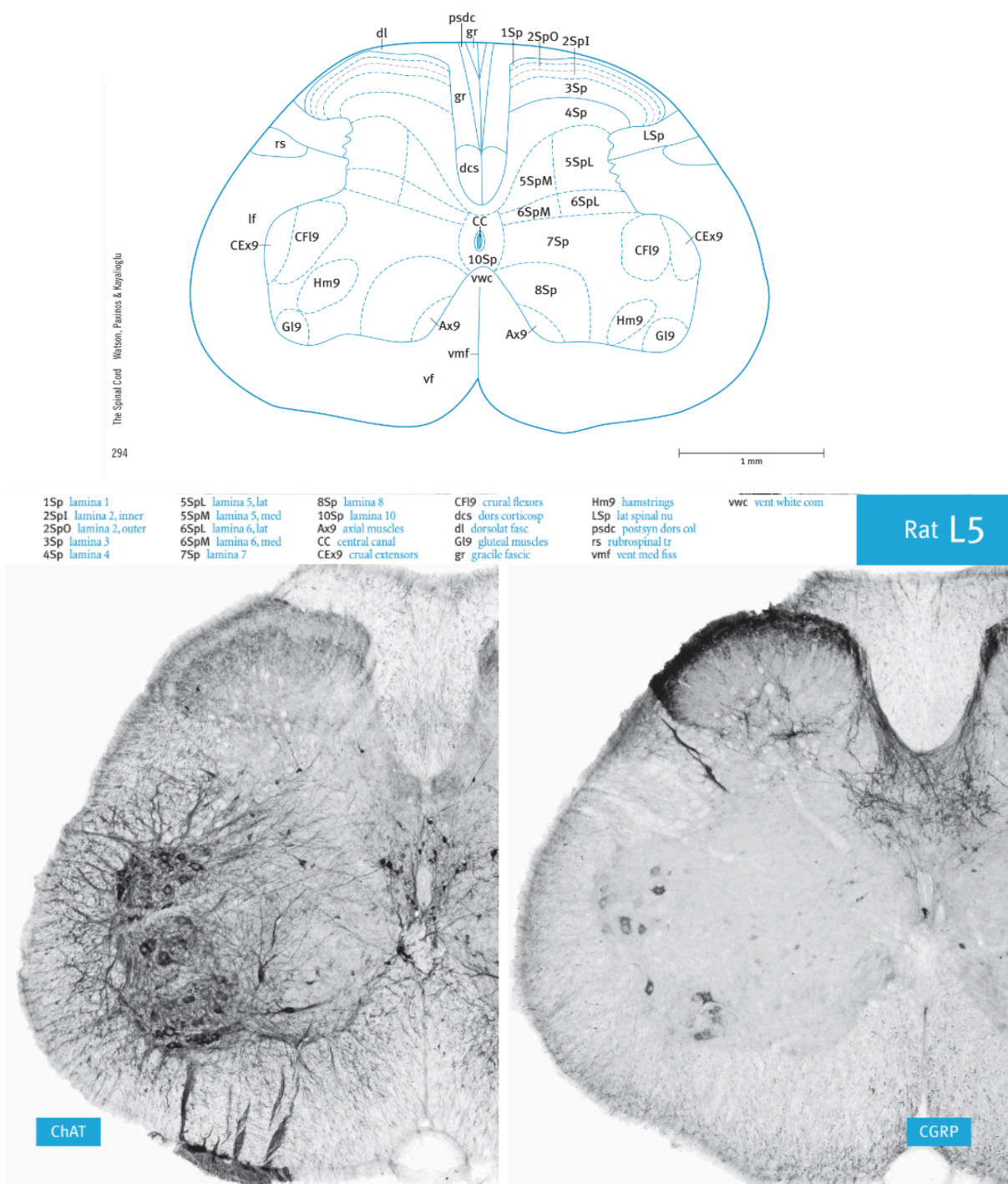
Fonte: (JULIUS e BASBAUM, 2001)

O braço axonal central dos nociceptores, que sai do DRG para o SNC, faz entrada no corno dorsal da medula espinal. Além das posições neuroanatômicas tradicionais (dorso-ventral e médio-lateral), as diferentes subpopulações celulares da medula espinal podem ser localizadas com maior precisão segundo a classificação de Rexed, organizadas em dez camadas distribuídas entre a periferia e o canal central medular (lâminas de Rexed I-X) (WATSON *et al.*, 2009) (Figura 3). As fibras aferentes penetram na medula espinal através de diferentes lâminas. Por exemplo, a maior parte das fibras A δ (diâmetro médio) penetram através das lâminas I e V, enquanto as fibras C (diâmetro pequeno) têm entrada pelas lâminas I e II. O corno dorsal da medula espinal é formado pelas lâminas I a VI e é a zona sensória da medula espinal. As lâminas VII a X formam o corno ventral, a zona motora da medula espinal (WATSON *et al.*, 2009).

As fibras aferentes nociceptivas que entram na medula espinal são glutamatérgicas e formam sinapse com neurônios de projeção para áreas encefálicas (também chamados de segunda ordem) ou com interneurônios locais excitatórios (glutamatérgicos) ou inibitórios (glicinérgico ou GABAérgicos) que costumam ascender e descender através de diferentes segmentações medulares do corno dorsal (TODD, 2010).

Diante de um evento inflamatório, a atividade do neurônio sensorio é modulada pelos mediadores inflamatórios (incluindo citocinas, quimiocinas, ATP, prostanóides e fatores de crescimento) liberados no sítio da lesão (BASBAUM *et al.*, 2009). A membrana do terminal periférico do neurônio sensorial tem muitos receptores para essas moléculas (incluindo TrkA, ASIC, TRPV1, TRPA1) (WATKINS *et al.*, 2001; PAVLOV *et al.*, 2018). Dessa forma, o neurônio sensorial pode ser ativado e sensibilizado diante de um evento inflamatório através de múltiplas vias de sinalização celular, o que caracteriza a complexidade do evento neuroinflamatório.

Figura 3 - Medula espinhal lombar



A imagem acima mostra as lâminas de Rexed. As imagens abaixo representam um imunohistoquímica de secções transversais da medula espinhal, região lombar próxima à vértebra L5 de ratos. Essas imagens demonstram a presença de neurônios motores situados no corno ventral (à esquerda, marcação para colina acetiltransferase (ChAT)) e neurônios sensoriais no corno dorsal (à direita, marcação para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, CGRP).

Fonte: (WATSON *et al.*, 2009)

O neurônio sensorial sensibilizado por meio da exposição prolongada aos mediadores inflamatórios apresenta limiar de despolarização diminuído, tornando-se ativo mesmo diante de um estímulo outrora inócuo (WATKINS *et al.*, 2001). Esse processo, causado pela plasticidade funcional do nociceptor, é denominado de **sensibilização periférica** (WOOLF e MA, 2007). Dessa forma, o braço axonal central do neurônio sensorial, situado no corno dorsal da medula espinal, possui maior atividade pré-sináptica dependente de canais de cálcio sensíveis a voltagem (CATTERALL e FEW, 2008). A liberação exagerada de neurotransmissores e neuropeptídeos (incluindo aminoácidos excitatórios e substância P) pelo terminal pré-sináptico dos neurônios sensoriais hiperestimula neurônios de projeção e a glia (WATKINS *et al.*, 2001). Em condições normais, a ativação dos neurônios de projeção depende da sinalização mediada pelos receptores NK1, AMPA e NMDA. A ativação persistente dos neurônios de projeção desencadeia a produção de óxido nítrico, liberação de transmissores de dor (prostaglandinas e fractalquinas), além de maior recrutamento de receptores NMDA (WOOLF e SALTER, 2000). Dessa forma, a hiperestimulação do neurônio de projeção converte-se em uma retroalimentação positiva na sinalização da dor, um processo continuado também chamado de **sensibilização central**. Os neurônios de segunda ordem na transmissão da dor projetam até estruturas superiores no cérebro, que, através de sinapses múltiplas, tornam o processo doloroso consciente a nível cortical (KANDEL *et al.*, 2000).

Importante notar que a medula não só transmite impulsos nervosos para as áreas encefálicas, mas também produz impulsos antidrômicos que culminam na liberação de substâncias pró-inflamatórias e vasodilatadoras no extremo periférico das fibras sensoriais. Esse mecanismo pode ser responsável pela alteração funcional do acoplamento neurovascular na zona da lesão que sustenta a hiperalgesia através do recrutamento de células pró-inflamatórias da resposta imunológica tardia (WALDBURGER e FIRESTEIN, 2010). Nota-se também que esse processo retroalimenta a sensibilização periférica.

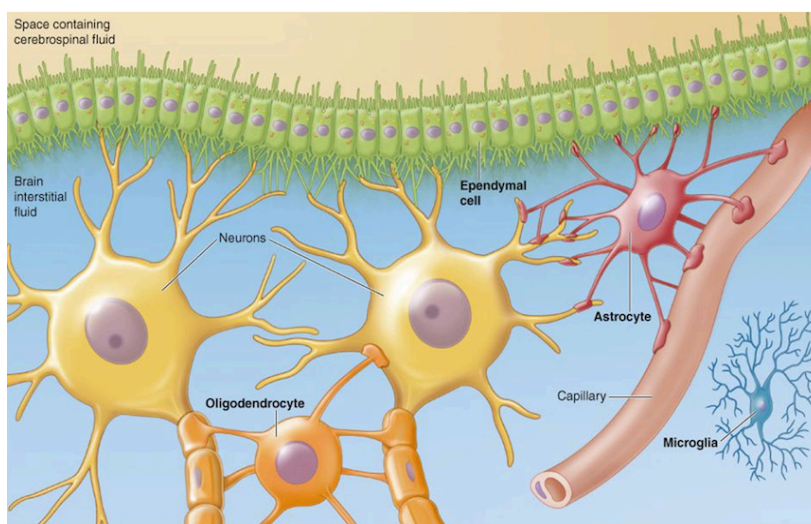
Essas informações exemplificam o quanto pode ser complexa a neurotransmissão da dor de origem inflamatória na periferia.

1.3 CÉLULAS DA GLIA DO SNC

No SNC e SNP (sistema nervoso periférico), além de neurônios, encontram-se outros tipos de células chamadas células da glia. A glia difere dos neurônios principalmente pela incapacidade de disparar potenciais de ação (STEVENS, 2003; FIELDS, 2008). Existem diferentes tipos de células da glia que são classificadas de acordo com sua morfologia, função e localização no SNC e SNP. Até perfis moleculares podem ser distintos entre subpopulações gliais, dependendo da região do cérebro onde elas estão (GRABERT *et al.*, 2016). No SNC, fazem parte da glia os astrócitos, micróglia, oligodendrócitos e células ependimais (Figura 4). Alguns autores acrescentam precursores gliais como as células NG2 e glia radial na lista de células da glia (ALLEN e BARRES, 2009).

A glia e os neurônios tem uma origem embriológica comum. São originados por precursores derivados do saco germinal embrionário conhecido como neuroectodermo. A micróglia é o único tipo de célula glial que se difere das demais quanto sua origem embriológica, já que se originam no mesoderma e entram no SNC a partir da circulação nas etapas iniciais do desenvolvimento fetal (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011; SAIJO e GLASS, 2011).

Figura 4 - Tipos de glia



As células ependimais recobrem as paredes ventriculares (onde circula o líquido), astrócitos estabelecem contato entre neurônios e vasculatura, micróglia vigia o microambiente e reage às infecções, oligodendrócitos formam a bainha de mielina nos axônios.

Fonte: Disponível em <<http://debuglies.com/wp-content/uploads/2018/01/Glial-Cells-Play-Key-Role-in-Regulating-Motivation-for-Drug-in-Heroin-Addiction-696x522.jpg>> Acesso em 15/02/2019.

Embora tenha se pensado por muito tempo que a função glial era restrita ao suporte fisiológico básico de neurônios, atualmente, um grande número de evidências tem demonstrado que essas células participam ativamente em uma série de funções especializadas tanto em condições saudáveis como em condições patológicas (PERRY e TEELING, 2013). Possivelmente, essa heterogeneidade funcional deve ser produto da diversidade molecular entre os diferentes tipos de células gliais.

Embora pareça que quase todos os tipos de células gliais estejam envolvidas na dor e/ou inflamação (CUNHA e DIAS, 2009; JI, R. R. *et al.*, 2013; JI, X. T. *et al.*, 2013; OLD *et al.*, 2015; JI *et al.*, 2016), este trabalho focou apenas no estudo de astrócitos e micróglia, cuja revisão bibliográfica será apresentada a seguir.

1.3.1 Astrócitos

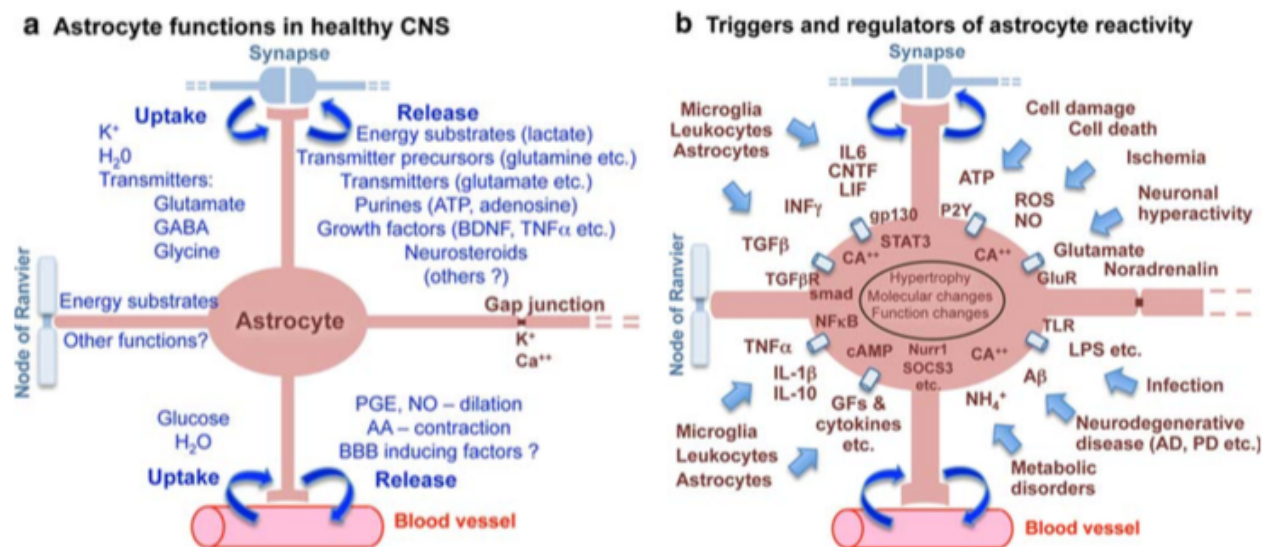
Os astrócitos são células extremamente ramificadas que estão espalhadas por todo o SNC. Nos últimos 25 anos, os estudos sobre a fisiologia astrocitária ganharam mais protagonismo, ressaltando-se o fato que essas células são importantes para uma grande variedade de funções essenciais do SNC, incluindo um papel ativo na transmissão sináptica. Por exemplo, os astrócitos liberam seus próprios transmissores (gliotransmissores), como glutamato, GABA e ATP (PARPURA e VERKHRATSKY, 2012).

A presença de receptores para neurotransmissores e canais iônicos dependentes de voltagem nos astrócitos, tornam essas células capazes de estabelecerem conexões fisiológicas com neurônios dentro de neurocircuitos determinados. Os astrócitos expressam vários tipos de receptores de glutamato (AMPA, cainato e metabotrópicos), GABA, glicina, acetilcolina, serotonina, entre outros (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Dentre os canais iônicos, destacam-se os canais de sódio e cálcio sensíveis a voltagem, canais de potássio, canais aniônicos, aquaporinas e até canais de potencial de receptor transiente (TRP), entre outros (VERKHRATSKY *et al.*, 2014). Existe ainda muita contradição a respeito dos tipos de canais iônicos presentes em astrócitos. Por exemplo, essas células em cultivo (*ex vivo*) expressam canais de cálcio sensíveis a voltagem (LATOURET *et al.*, 2003; D'ASCENZO *et al.*, 2004; TOKUHARA *et al.*, 2010), mas sempre esteve em debate

se realmente expressam esses canais *in vivo* (VERKHRATSKY e STEINHAUSER, 2000). Pelo menos, no hipocampo parece que astrócitos expressam canais de cálcio tipo L (TIPPENS *et al.*, 2008), e na substância branca da medula espinal expressam tipo L e N (AGRAWAL *et al.*, 2000). Os canais da família TRP (TRPC, TRPV e TRPA) parecem ser expressos *in vivo* nos astrócitos (TOTH *et al.*, 2005; BENFENATI *et al.*, 2011; VERKHRATSKY *et al.*, 2014; TAKIZAWA *et al.*, 2018). É altamente provável que este perfil de expressão de canais iônicos varie consideravelmente de acordo com o desenvolvimento, região do SNC e condições patológicas. Sendo assim, não existe um perfil molecular fixo que seja aplicável a todo e qualquer astrócito.

Dentre as principais funções, os astrócitos já foram descritos como células capazes de regular o metabolismo, a plasticidade, a transmissão sináptica, e a homeostase (Figura 5).

Figura 5 - Funções e receptores dos astrócitos



Representação esquemática que resume as funções dos astrócitos no SNC saudável e fatores que desencadeiam a sua reatividade (imagem da esquerda). À direita, alguns receptores expressos por astrócitos também são mostrados.

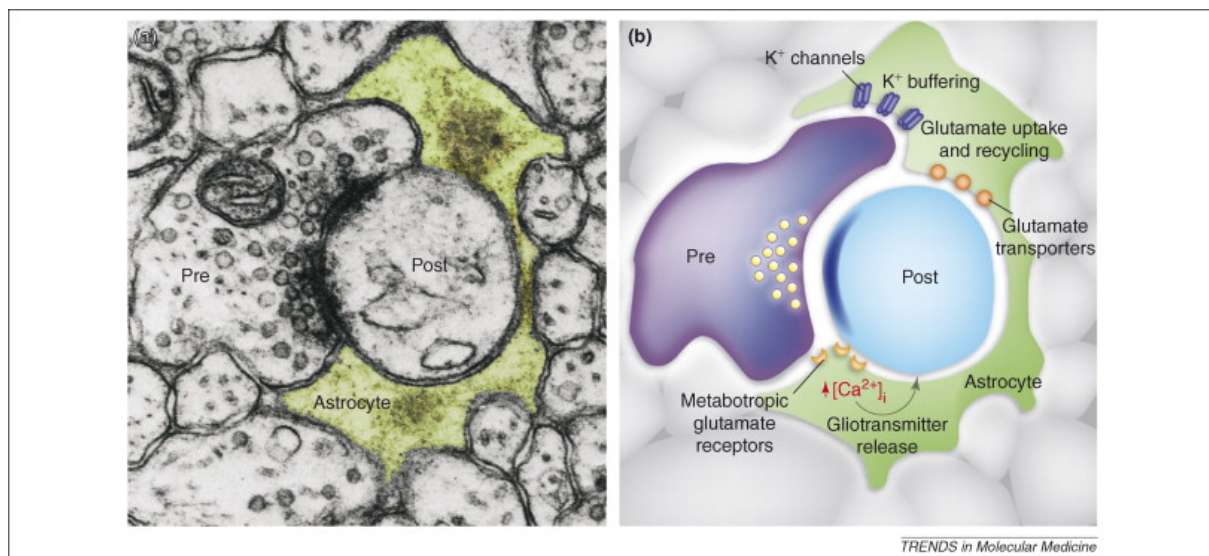
Fonte: (SOFRONIEW e VINTERS, 2010)

Durante o neurodesenvolvimento, os astrócitos servem de guia para a migração e desenvolvimento de axônios (POWELL e GELLER, 1999). Já no SNC

adulto, os astrócitos continuam contribuindo na neurogênese, por exemplo, encobrendo precursores neuronais que migram em direção ao bulbo olfatório ao longo dos vasos sanguíneos. Esses vasos sanguíneos precisam de VEGF astrocitário para a sua formação e crescimento corretos (BOZOYAN *et al.*, 2012). Paradoxalmente, essas células também participam no processo de eliminação de sinapses (ou poda sináptica, do termo em inglês “*synaptic pruning*”) por meio da “etiquetagem” de sinapses para a eliminação posterior via micróglia (STEVENS *et al.*, 2007). Os astrócitos também apresentam um importante papel na barreira hematoencefálica e no controle do fluxo sanguíneo, envolvendo os vasos sanguíneos com as ramificações e estabelecendo contatos e interações capazes de regular o fluxo sanguíneo local no SNC (MACVICAR e NEWMAN, 2015). Esse processo parece emergir da liberação astrocitária de mediadores químicos como prostaglandinas, óxido nítrico e ácido araquidônico que agem sobre o endotélio para modular o diâmetro dos vasos (IADECOLA e NEDERGAARD, 2007). De outro modo, os astrócitos podem transferir nutrientes dos vasos sanguíneos para o soma de neurônios, sendo um componente vital do metabolismo energético do tecido neuronal (NORTLEY e ATTWELL, 2017). Por exemplo, é importante ressaltar que os astrócitos detêm a maior fonte de armazenamento de glicogênio dentro do SNC, sendo esse fato uma das hipóteses que explica o grande acúmulo de astrócitos em áreas com uma densidade sináptica elevada (BROWN e RANSOM, 2007).

As ramificações dos astrócitos também sustentam terminais sinápticos por meio da regulação homeostática dos fluidos, íons, pH e liberação/captação de neurotransmissores na fenda (SIMARD e NEDERGAARD, 2004). Por exemplo, astrócitos liberam gliotransmissores e, dessa forma, podem gerar mudanças na excitabilidade neuronal (HALASSA *et al.*, 2007; PEREA *et al.*, 2009). Esse tipo de interação do astrócito com os botões pré e pós-sinápticos é denominada de “sinapse tripartita” (Figura 6).

Figura 6 - Sinapse tripartita.



Micrografia eletrônica (esquerda) mostra a sinapse entre o botão pré e pós-sináptico e a estreita relação que astrócito possui com a fenda sináptica. À direita, representação ilustrativa da micrografia eletrônica mostra diferentes canais e receptores dos astrócitos importantes na regulação da atividade sináptica.

Fonte: (HALASSA *et al.*, 2007)

1.3.2 Micróglia

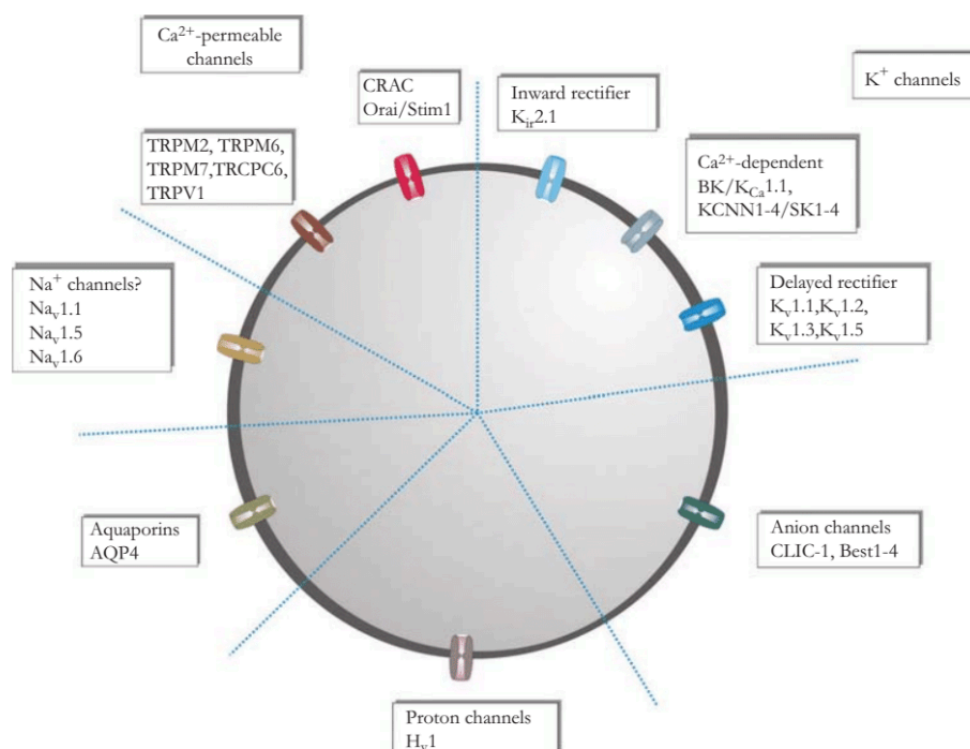
As micróglia são ramificadas e bem numerosas (estima-se que constituem entre 2,5% e 10% de todas as células do cérebro). Esse valor é surpreendente se levarmos em consideração que a própria existência da micróglia foi questionada por alguns cientistas até os anos 1980 (GRAEBER e STREIT, 2010). A micróglia está distribuída de forma onipresente em todo o SNC com algumas diferenças regionais reportadas no cérebro de camundongo (LAWSON *et al.*, 1990). As regiões mais povoadas são o hipocampo, o bulbo olfatório, algumas zonas do gânglio basal e a substância negra.

A micróglia exerce um papel de vigilância contra insultos do SNC, sendo verdadeiros “sensores de patologias”. Deve ser por isso que a micróglia apresenta tantos receptores de membrana. Para citar alguns, receptores de reconhecimento de moléculas de microrganismos, de dano celular, da resposta imune e, surpreendentemente, de neurotransmissores (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). Muitos

desses receptores citados não são expressos de forma constitutiva, portanto, as propriedades fisiológicas da membrana microglial oscilam de acordo com o microambiente existente no SNC (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011).

A micróglia expressa diferentes canais iônicos como canais de cálcio, sódio, potássio, cloro, prótons, aquaporinas e TRP (Figura 7). Especula-se que esses canais mediem processos de motilidade e migração microglial. Assim como macrófagos, a presença dos canais de sódio e de cálcio sensíveis a voltagem na micróglia é controversa. Por exemplo, pequenas correntes de sódio são descritas em micróglia em cultura, mas em apenas no 20% das culturas (KOROTZER e COTMAN, 1992). Para canais de cálcio, existem evidências indicando uma suprarregulação do canal de cálcio do tipo L em culturas de micróglia expostas ao peptídeo β -amiloide (SILEI *et al.*, 1999) e de canais de cálcio tipo N em cultura de hipocampo (TOKUHARA *et al.*, 2010), entretanto, a expressão *in vivo* é debatida. No caso de canais TRP, foi encontrada expressão de RNAm em cultura microglial de TRPM e TRPC (OHANA *et al.*, 2009).

Figura 7 - Canais iônicos na micróglia

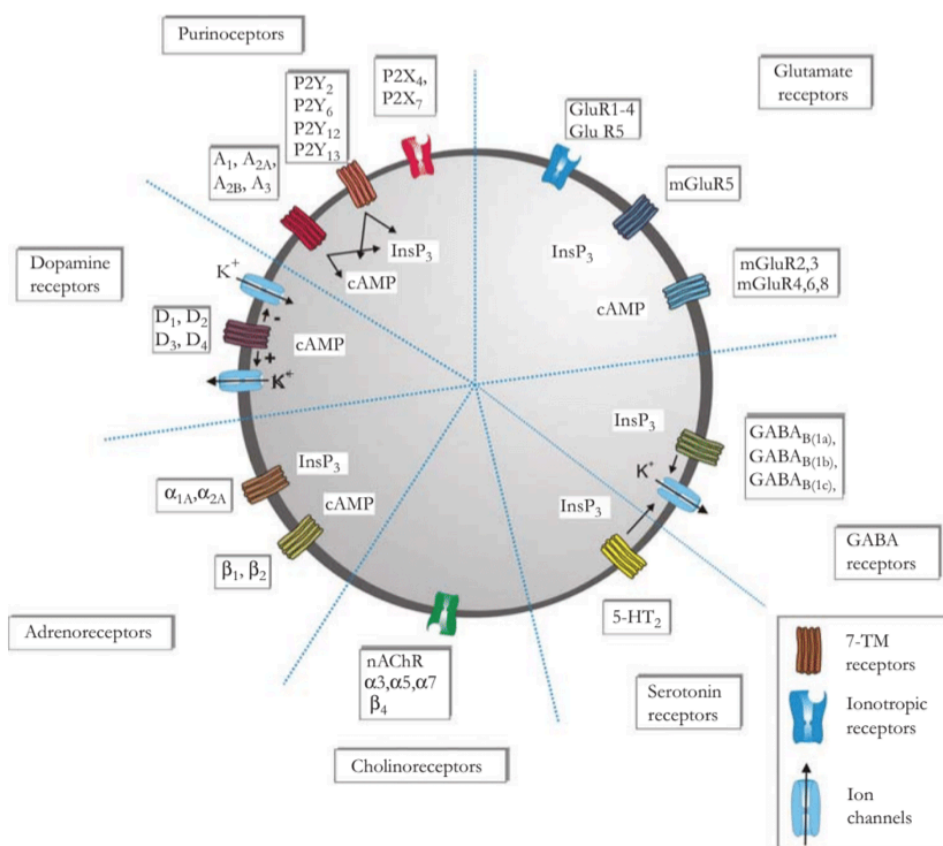


Resumo dos canais iônicos presentes na micróglia

Fonte: (KETTENMANN, H e RANSOM, 2013)

A micróglia e os astrócitos apresentam alguns receptores distintos de neurotransmissores. Os receptores mais destacados na micróglia são os purinérgicos (ativados por ATP, adenosina e outros nucleotídeos). Por exemplo, o ATP já foi demonstrado produzir respostas rápidas na micróglia através do receptor P2X, movimentando as ramificações em direção ao foco da lesão e liberando citocinas e proteínas inflamatórias (NIMMERJAHN *et al.*, 2005; KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). A micróglia também expressa receptores glutamatérgicos como AMPA, cainato e mGluR5 (NODA *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2006; KETTENMANN, H. *et al.*, 2011), assim como receptores para GABA, acetilcolina, colina, dopamina e serotonina (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011) (Figura 8).

Figura 8 - Receptores de neurotransmissores na micróglia



Resumo dos diferentes receptores para neurotransmissores expressados pela micróglia.

Fonte: (KETTENMANN, H e RANSOM, 2013)

As células da micróglia possuem funções variadas no SNC saudável e patológico, entre as quais tem, por exemplo, a regulação da transmissão e plasticidade sináptica, manutenção da homeostase, e o seu papel de vigilante imunológico. Particularmente, o papel imunológico da micróglia como sentinelas continua sendo considerado uma das funções mais importantes da micróglia no SNC. A micróglia tira proveito da morfologia ramificada para procurar constantemente mudanças bioquímicas e bioelétricas no microambiente que possam sinalizar perturbações na homeostase do SNC, o que costuma requerer a sua ação (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Esse papel de sentinelas é bem parecido ao papel das células do sistema imunológico, sendo esta a razão para a micróglia ser considerada as células do sistema imunológico do SNC (GRAEBER e STREIT, 1990). A entrada das células da imunidade adaptativa no SNC é fortemente controlada pela barreira hematoencefálica e restrita a um subgrupo específico de células T e B, tendo a sua disseminação restrita ao líquido cefalorraquidiano (ENGELHARDT e RANSOHOFF, 2012). O parênquima do SNC tem, por tanto, carência de células do sistema imunológico, por isso, a micróglia oferece ao SNC a capacidade de se defender das infecções, lesões e enfermidades. Como Ransom e Kettenman explicam de forma bem acertada, “a micróglia deve ser vista, funcionalmente falando, como uma célula híbrida que combina características neuroprotetoras das células gliais com alguns dos atributos dos macrófagos e linfócitos” (KETTENMANN, H e RANSOM, 2013). Por exemplo, a micróglia tem a capacidade apresentadora de antígenos (via complexo de histocompatibilidade maior tipo II ou MHC II) (HANISCH e KETTENMANN, 2007).

O diálogo entre a micróglia e as células imunológicas é mediado em parte via citocinas. A micróglia ativada tem a capacidade de produzir e secretar uma grande variedade de citocinas e quimiocinas (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). A produção desses fatores vai depender da severidade e natureza da lesão. A função principal da secreção de citocinas e quimiocinas é a de restaurar a homeostase depois da lesão e por isso é localizada e restrita.

O remodelamento dos circuitos cerebrais, como a formação, modificação e eliminação de estruturas sinápticas acontece durante toda a vida como um sistema de adaptação ao meio ambiente. Sempre se tinha pensado que eram só os astrócitos que tinham esse papel na plasticidade sináptica. Mas hoje em dia se sabe que outra função muito importante da micróglia, bem relacionada com a vigilância do microambiente, é estabelecer contatos com os espinhos dendríticos e os axônios dos

neurônios (NIMMERJAHN *et al.*, 2005; WAKE *et al.*, 2009). Vários estudos já demonstraram que as ramificações da micróglia fazem contatos muito seletivos com os terminais sinápticos (WAKE *et al.*, 2009; TREMBLAY *et al.*, 2010; PAOLICELLI *et al.*, 2011), fornecendo suporte funcional na sinaptogênese e na neurotransmissão (TREMBLAY e MAJEWSKA, 2011). A micróglia também tem um papel crítico na remoção de neurônios senis (MARIN-TEVA *et al.*, 2004; SIERRA *et al.*, 2010). A eliminação de estruturas e de células acontece graças a capacidade fagocítica que a micróglia possui, o que ajuda no controle da tão importante homeostase e no bom funcionamento sináptico. Também tem lugar a micróglia fagocítica no SNC patológico, a qual tem a função principal de limpar neurônios apoptóticos, tecido necrosado ou microrganismos. Entretanto, o papel fagocítico da micróglia pode ter um efeito negativo em patologias, pois também induz a morte exagerada de neurônios (NEHER *et al.*, 2011).

Embora a micróglia possa se proliferar no SNC saudável, esse fenômeno acontece pouco e parece refletir o *turnover* celular normal (TONCHEV *et al.*, 2003). Apesar dos numerosos contextos em que a ativação da micróglia tem sido observada, a mitose parece ser um componente consistente da resposta celular a lesão.

Além da proliferação, a micróglia tem a habilidade também de migrar para áreas lesionadas. Elas costumam ser encontradas ao redor da lesão, onde fagocitam restos celulares e patógenos. Dessa forma, a micróglia apresenta antígenos para as células clássicas do sistema imune e secreta moléculas que servem de alerta para outras micróglia e astrócitos e, assim, recrutam mais células no lugar da lesão (CARBONELL *et al.*, 2005). Existem muitos estímulos que induzem a migração da micróglia, e esses estímulos precisam ser quimioatrativos. As proteínas do complemento (como da resposta imunológica) ou a presença de ATP no meio extracelular, por exemplo, podem induzir a migração microglial (DAVALOS *et al.*, 2005; CUDABACK *et al.*, 2011). Também existem fatores que inibem a migração microglial como citocinas imunorreguladoras (IL-10) ou agentes exógenos anti-inflamatórios. Por exemplo, o tratamento com a tetraciclina, um antibiótico com efeitos anti-inflamatórios, inibe vários aspectos da reatividade microglial, assim como a migração (KARLSTETTER *et al.*, 2011).

1.4 CELULAS DA GLIA E A DOR

As células gliais na sinapse tripartita também contribuem para a sensibilização central (MCMAHON e MALCANGIO, 2009; JI *et al.*, 2016). Na medula espinal, a glia pode ser ativada pelos mediadores químicos liberados tanto pelo neurônio sensorio quanto pelo de projeção. A glia ativada, então, mudará a sua morfologia (explicado com mais detalhe adiante) para se adaptar a mudanças na homeostase do microambiente. Uma vez ativada, a glia pode secretar substâncias que podem amplificar a sensação dolorosa através de diferentes mecanismos (MARRIOTT e WILKIN, 1993; TAKUMA *et al.*, 1996; BEZZI *et al.*, 1998; MOLLACE *et al.*, 1998; HIDE *et al.*, 2000; CUNHA e DIAS, 2009). Por exemplo, a glia libera substâncias como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, prostaglandinas, aminoácidos excitatórios, e fatores de crescimento, como o BDNF, que potencializam a atividade sináptica local, particularmente no terminal pós-sináptico do neurônio de projeção na via medular da dor (WATKINS *et al.*, 2001; COULL *et al.*, 2005). A glia, como outras células do sistema imunológico, também liberam citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF) e quimiocinas (CatS e CCL2). Esses mediadores inflamatórios podem modular tanto a própria glia quanto os neurônios, os quais também possuem receptores para essas moléculas.

As substâncias secretadas pela glia exacerbam a sensação dolorosa e podem aumentar ainda mais o sistema de retroalimentação positiva que promove a liberação contínua de mediadores da dor (SUTER *et al.*, 2007). Além disso, a ação do BDNF sobre o receptor TrKB no neurônio de projeção é descrita para alterar a resposta desses neurônios ao GABA (COULL *et al.*, 2005). Dessa forma, esses neurônios ficam menos responsivos à sua inibição.

Por meio dessas ações, a glia é reconhecida como um importante modulador da dor. Uma importante evidência que sustenta essa teoria é que a inativação tanto da micróglia (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; LEDEBOER *et al.*, 2005) quanto dos astrócitos (GAO e JI, 2010; MEI *et al.*, 2010) na medula espinal previnem ou retardam o desenvolvimento da alodinia e da hiperalgesia.

Todas essas evidências sugerem que as células gliais reativas induzem uma série de eventos sinalizatórios que resultam em estados de dor (DE LEO *et al.*, 2006; ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008). Diferentes modelos de dor têm sido usados para estudar o papel da glia em condições patológicas. Um dos modelos mais usados é o

da dor neuropática, geralmente por lesão do nervo ciático. Depois de uma lesão no nervo, a micróglia passa por mudanças na morfologia, proliferam, expressam novas moléculas de superfície (por exemplo, CD11, Iba1 e MHCII), migram ao sítio da lesão onde fagocitam e liberam fatores pro-inflamatórios (TANGA *et al.*, 2004; CLARK *et al.*, 2007; ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008; LIU e YUAN, 2014; GUAN *et al.*, 2016).

A dor inflamatória periférica tem algumas características parecidas com a dor neuropática, porém com respostas gliais mais tênues (XU, Q. e YAKSH, 2011). Em modelos animais experimentais, a dor inflamatória pode ser produzida por meio de injeção, na pata ou na articulação, de CFA (*Complete Freund's Adjuvant*), que são restos de *Mycobacterium* inativados capazes de induzir uma resposta imunológica. Estudos que utilizaram esse modelo sugerem que a glia aumenta a sua reatividade na medula espinal, o que pode ser notado por meio do aumento da expressão de alguns biomarcadores como GFAP (proteína ácida fibrilar glial, para astrócitos) e Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*, para micróglia), além da secreção aumentada de algumas citocinas (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; CLARK *et al.*, 2007; IKEDA *et al.*, 2012; XU, F. *et al.*, 2014).

O início da resposta glial frente a um insulto costuma ser rápido (poucas horas) e a sua duração pode persistir por vários dias. Geralmente a micróglia se ativa antes que os astrócitos (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004). A inibição da glia durante a inflamação reduz a sensação dolorosa, sugerindo que a atividade da glia na medula espinal pode ser vital para o desenvolvimento da dor inflamatória (CLARK *et al.*, 2007). Por exemplo, durante a inflamação, a inibição da fosforilação da JNK nos astrócitos da medula espinal atenua a dor (GAO e JI, 2010). Outro exemplo é a fosforilação da MAPK p38, que se encontra aumentada na micróglia em resposta à inflamação periférica. Sua inibição resulta em uma diminuição da dor (SVENSSON *et al.*, 2005).

A inibição da glia para tratar a dor foi pensado para ser um tratamento alternativo, e mesmo que se tenha conseguido muitas vezes diminuir a sensação dolorosa, a dor nunca foi completamente eliminada. Possivelmente, isso é devido à natureza complexa do processo da dor, que envolve diferentes estruturas e tipos celulares.

1.5 MORFOLOGIA GLIAL

A morfologia glial pode variar dependendo do estado de ativação da glia, da região do SNC e da homeostase no microambiente.

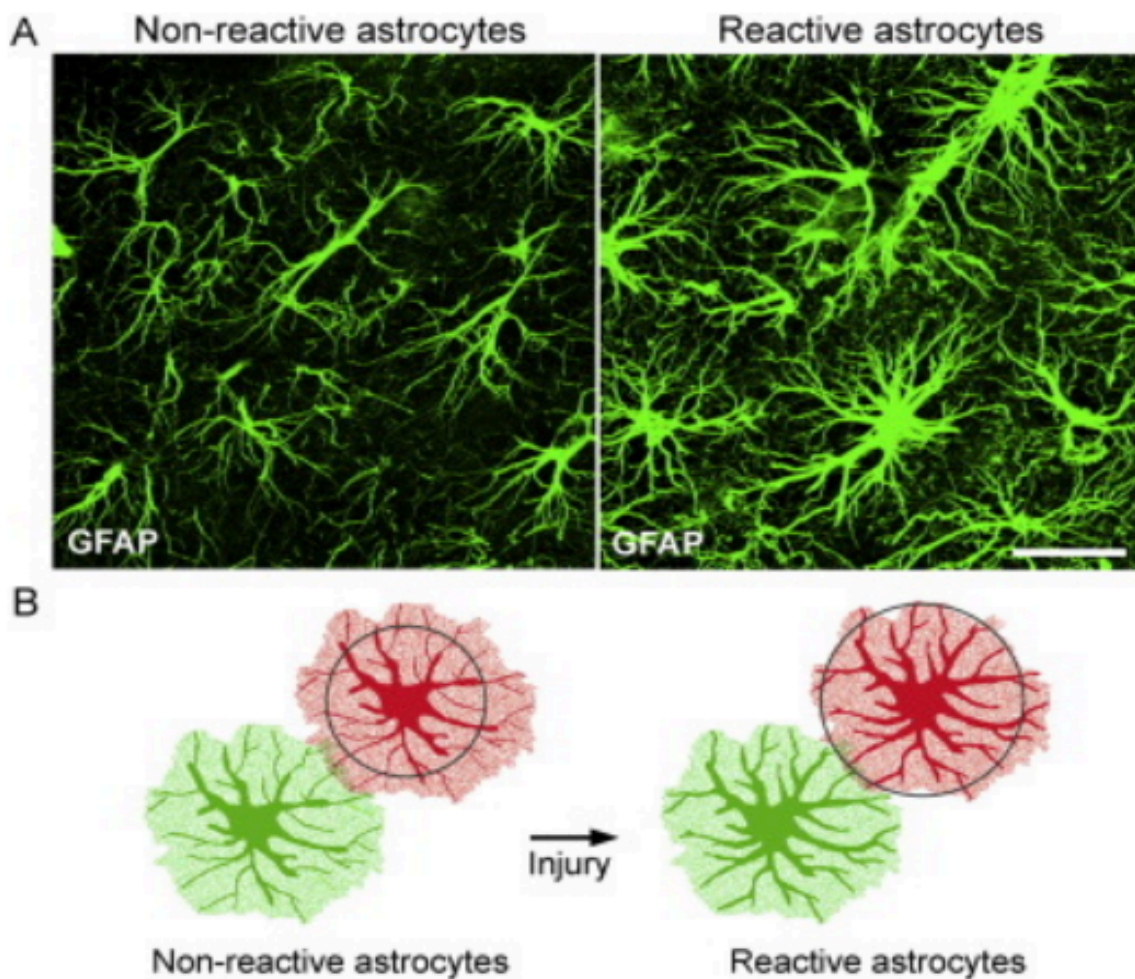
Existem vários tipos de astrócitos dentro do SNC, mas neste trabalho vamos focar nos astrócitos protoplásmicos e os fibrosos, os quais estão situados nas substâncias branca e cinzenta do SNC. Os astrócitos protoplásmicos, encontrados na matéria cinzenta, possuem numerosas ramificações principais, geralmente entre 5 a 10, que se estendem desde o soma e das quais saem outras ramificações mais finas geralmente ocupando um volume esférico (Figura 9). Os astrócitos fibrosos são encontrados na matéria branca com uma estrutura ramificada mais parecida a fibras longas.

Os dois tipos de astrócitos tem, portanto, morfologia estrelada, ou seja, com muitas ramificações. Graças a essa morfologia, os astrócitos conseguem estar em contato com diversas estruturas do SNC. Por exemplo, fazem contato com vasos sanguíneos no SNC com, pelo menos, uma ramificação onde contêm um processo final que envolverá o vaso sanguíneo (MATHIISEN *et al.*, 2010). Também formam junções *gap* entre ramificações distais de astrócitos vizinhos. Os astrócitos protoplásmicos podem envolver as sinapses enquanto os fibrosos fazem contato com os nodos de Ranvier.

Os astrócitos se organizam no SNC de maneira ordenada sem se sobrepor, revelando que cada célula tem o seu próprio microdomínio. Especula-se que só as ramificações mais distais possam estabelecer contato entre astrócitos vizinhos (HALASSA *et al.*, 2007).

A astrogliose ou ativação dos astrócitos pode agravar um processo patológico do SNC. A astrogliose não é um evento absoluto, nem simples de ser descrito. Estudos recentes têm sugerido que, ao contrário do imaginado previamente, uma série de eventos fisiológicos se desenrolam gradativamente até a apresentação do fenótipo reativo. Uma notável alteração morfológica em uma astrogliose é a expressão aumentada de GFAP, resultado da hipertrofia tanto do corpo celular quanto das ramificações. Geralmente, em agravos de baixa intensidade, essa alteração não altera os microdomínios individuais dos astrócitos (SOFRONIEW e VINTERS, 2010) nem causa proliferação.

Figura 9 - Morfologia dos astrócitos



A morfologia dos astrócitos é dinâmica. Após lesão, pode passar de muito ramificada a hipertrófica (imagem da direita, acima). Os astrócitos ativados mantêm o seu próprio domínio, mas com as ramificações principais mais espessas (imagem da direita, abaixo).

Fonte: (PEKNY, M. e PEKNA, 2016)

A astrogliose leve costuma ser extinta quando o insulto é prontamente removido, ganhando aparência do SNC saudável (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Entretanto, em uma astrogliose severa e difusa, existe uma expressão ainda maior de GFAP e hipertrofia no soma e nas ramificações. Também ocorre proliferação e perda dos microdomínios individuais. Esse aspecto morfológico geralmente acontece em áreas próximas às lesões severas, infecções ou enfermidades neurodegenerativas. Nessas condições, observa-se um fenômeno chamado de cicatriz glial decorrente da barreira astrocítica ao redor da lesão. Algumas evidências

sugerem que a cicatriz glial serve de barreira protetora das células do sistema imunológico e agentes infecciosos (FAULKNER *et al.*, 2004).

A micróglia é capaz de responder bem rápido aos desajustes homeostáticos do SNC. Historicamente, os diferentes fenótipos da micróglia foram descritos segundo as suas características morfológicas: de células muito ramificadas a células com morfologia ameboide. Em geral, células altamente ramificadas eram designadas como “micróglia em repouso” e as células ameboides eram classificadas como “micróglia ativada”. Porém, atualmente já se sabe que existe um amplo espectro de estados intermediários de ativação da micróglia, o que pode ser estabelecido a partir de estudos de natureza quantitativa sobre aspectos morfológicos.

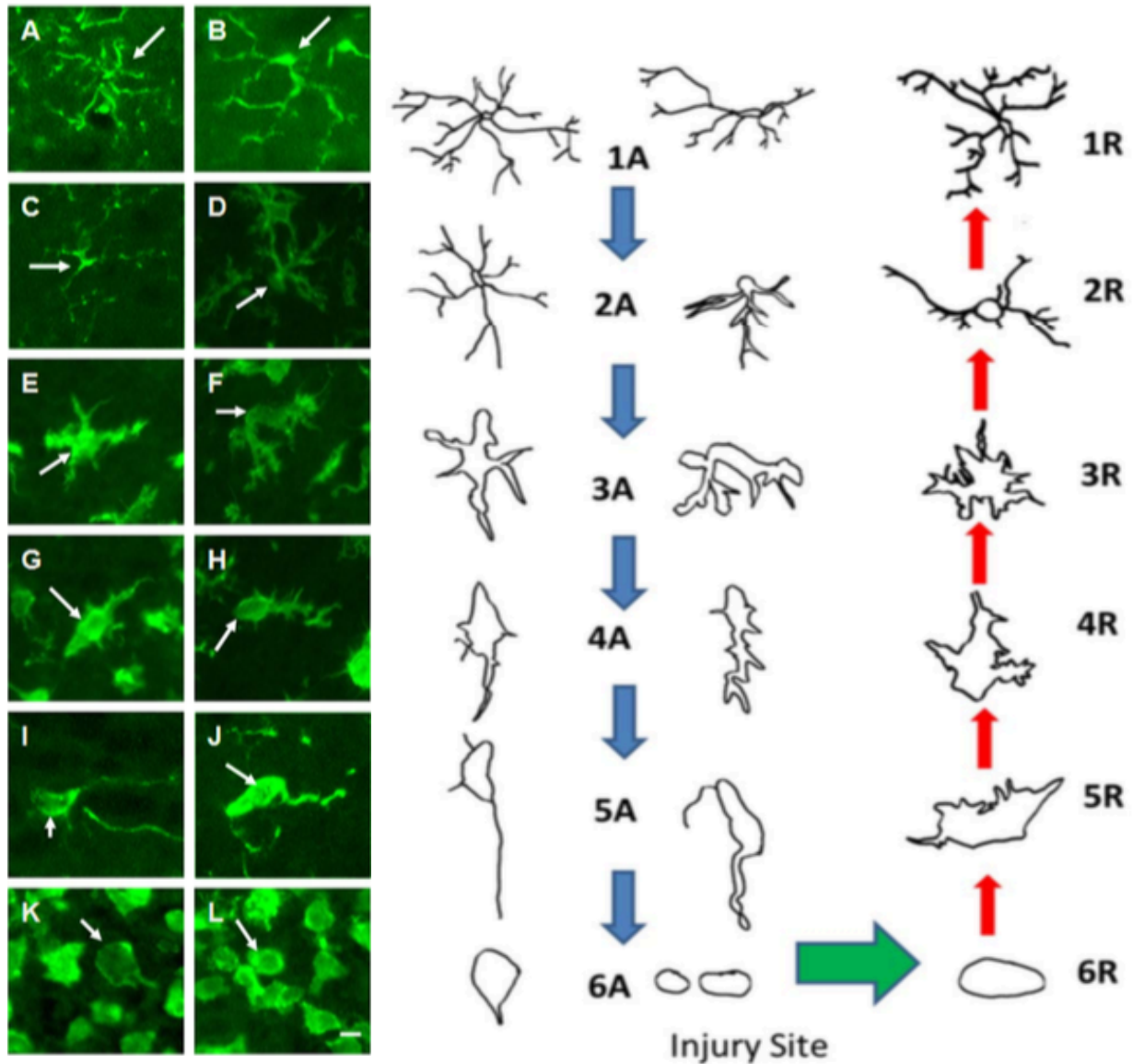
De qualquer forma, é consensual que a morfologia e a função celular da micróglia estão bem interligadas. Não obstante, ainda não existe um consenso que classifique com precisão as funções microgliais a partir de fenótipos intermediários. Essa questão é particularmente difícil de ser elucidada já que a plasticidade microglial é um processo altamente dinâmico. Sem dúvidas, a falta de uma classificação morfológica ou molecular de forma padrão tem complicado a comparação de dados dos diferentes estudos científicos (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011; JONAS *et al.*, 2012; DAVIS *et al.*, 2017; FERNANDEZ-ARJONA *et al.*, 2017; HEINDL *et al.*, 2018) (Figura 10).

No SNC adulto e saudável, a maior parte da micróglia apresenta uma morfologia de “micróglia em repouso”, ou seja, muito ramificadas com um soma pequeno e bastante circular. Essas ramificações costumam ser compridas e de diâmetro pequeno. Cada micróglia aparenta ocupar um território próprio, sem que as diferentes células microgliais (tanto os corpos quanto as ramificações) contatem fisicamente umas com as outras (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). A morfologia e os padrões de ramificação são bem heterogêneos dependendo da região do SNC, mesmo dentro da classificação de “micróglia em repouso”. Essa heterogeneidade demonstra que a micróglia adapta sua forma celular segundo a composição do microambiente (KETTENMANN, H e RANSOM, 2013).

A micróglia está sempre vigiando seu microambiente por meio da movimentação de suas ramificações (NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Protrusões de membrana parecidas à filopodia também aparecem nas ramificações microgliais, algumas vezes apenas de forma temporária. Essa mobilidade das ramificações acontece de forma rápida, numa escala de tempo de poucos minutos (NIMMERJAHN

et al., 2005). Nessas condições, a micróglia faz contato direto com neurônios (incluindo sinapses), astrócitos e o endotélio (TREMBLAY *et al.*, 2010).

Figura 10 - Morfologia da micróglia



Dependendo do estado de ativação, a micróglia apresenta diferentes morfologias nas ramificações e no soma. No exemplo desta imagem, a ativação da micróglia foi desencadeada por uma lesão no bulbo olfatório (em camundongos).

Fonte: Adaptado de (JONAS *et al.*, 2012).

Quando ativada, a micróglia encurta as ramificações e perde a complexidade das mesmas. As células apresentam quantidade diminuída de ramificações e ficam mais espessas. O soma das células também aumenta em volume e assume uma conformação mais irregular e menos circular. Importante notar que essas alterações são graduais, fazendo com que vários estágios morfológicos intermediários surjam, por exemplo, desde mudança leve nas ramificações e no soma até uma morfologia ameboide desprovida de ramificações. O que vai determinar que nível de alteração morfológica a micróglia assumirá ainda é uma questão a ser resolvida. Neste estudo, evitou-se tentar classificar as respostas morfológicas da micróglia dentro de um esquema bimodal de estado M1 ou M2 (pro-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente), pois perfis transcriptômicos da micróglia tem mostrado que as respostas fenotípicas são inconsistentes com padrões do tipo M1/M2 (SALTER e STEVENS, 2017).

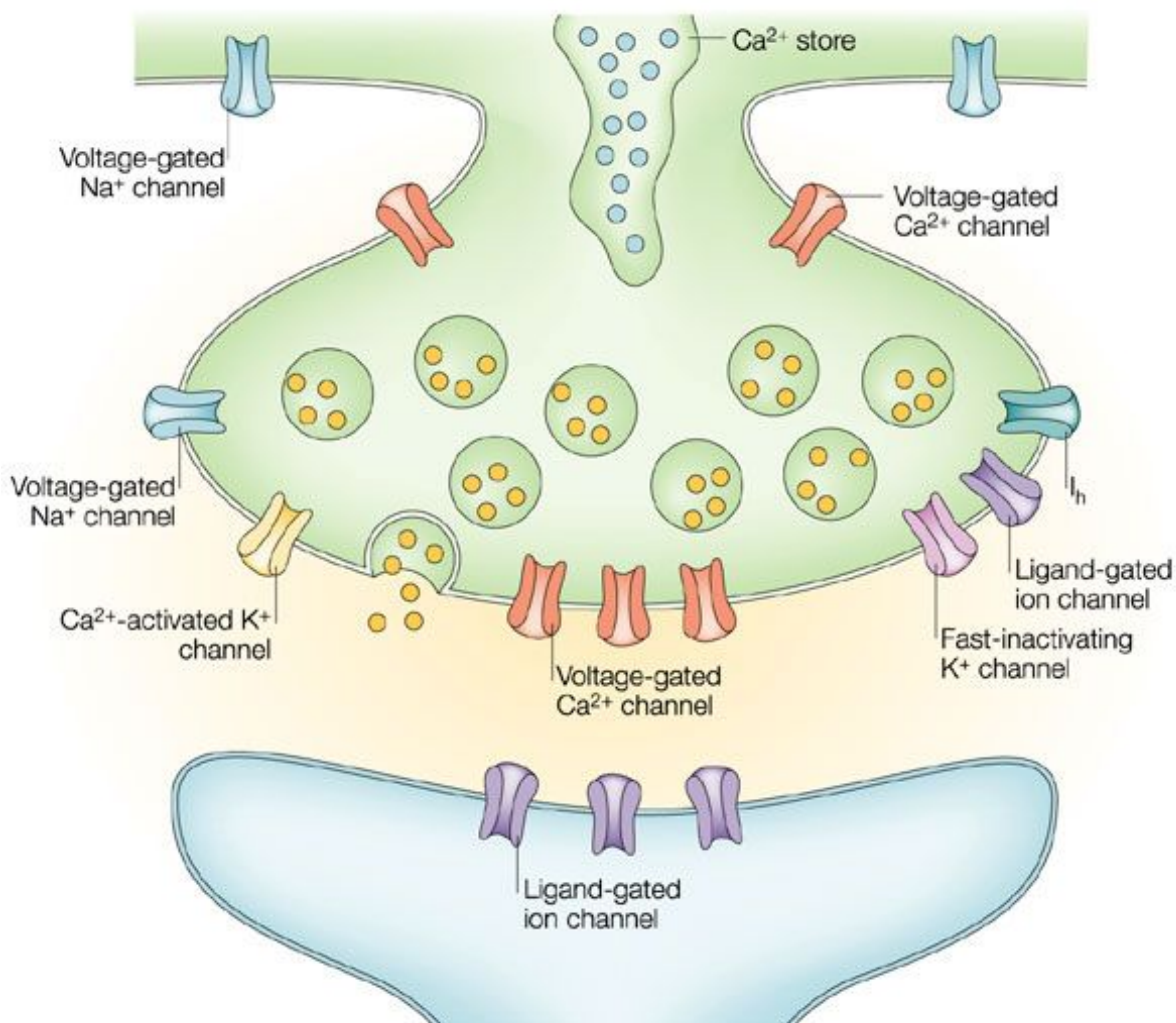
1.6 TOXINAS TERAPEUTICAS

A transmissão aferente de sensações dolorosas do SNC é mediada por neurônios expressando canais de cálcio de alta voltagem (GVCCs). A atividade desses canais estimula a liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores pró-nociceptivos, tal como o glutamato (CATTERALL e FEW, 2008) (Figura 11). Nesse contexto, inibidores de canais de cálcio têm surgido como compostos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos analgésicos (ALTIER e ZAMPONI, 2004).

Muitas toxinas animais têm sido descritas nos últimos anos como grandes inibidores de canais iônicos. As toxinas animais contêm diferentes estruturas bioquímicas que podem ter uma vasta variedade de efeitos nos humanos (FRY *et al.*, 2009). Embora algumas ações farmacológicas de toxinas possam causar efeitos prejudiciais em mamíferos, incluindo hemorragias e neurotoxicidade, nota-se que algumas frações têm grande potencial de gerar benefício clínico, por exemplo, por meio de efeitos analgésicos.

Neste trabalho foram usadas duas toxinas de origem animal, as quais são amplamente reconhecidas por inibir canais de cálcio sensíveis a voltagem: a ω -conotoxina MVIIA e a Ph α 1 β .

Figura 11 - Representação da sinapse com os canais de cálcio sensíveis a voltagem.



Nature Reviews | Neuroscience

O terminal pré-sináptico (nervo sensorio) contém canais de cálcio sensíveis a voltagem por onde acontece o influxo de Ca^{2+} que desencadeia a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Fonte: (ENGELMAN e MACDERMOTT, 2004).

A **ω -conotoxina MVIIA** é derivada originariamente do veneno do caramujo marinho predador *Conus magus*. Os caramujos do gênero *Conus* são membros da família *Conidae*, ordem *Neogastropoda* e classe *Gastropoda*. Na época que foi purificada, coincidentemente, começaram-se a intensificar a pesquisa científica sobre os GVCCs (OLIVERA *et al.*, 1985). Importante salientar que o descobrimento da ω -conotoxina MVIIA, assim como outras conotoxinas, ajudou a caracterizar as propriedades funcionais dos diferentes canais de cálcio (MCCLESKEY *et al.*, 1987; OLIVERA *et al.*, 1987). Por exemplo, descobriu-se que a MVIIA inibe de forma específica e reversível o GVCC de tipo N. Esse tipo de GVCC é amplamente descrito por estar relacionado com a sensibilidade a dor (algesia) (ZAMPONI *et al.*, 2009). A associação entre canais de cálcio tipo N e a dor foi o primeiro passo para a descoberta do potencial analgésico da MVIIA. Atualmente já se sabe que a MVIIA atua nas lâminas I e II da medula espinal, onde existe grande expressão de canais de cálcio tipo N, e a MVIIA provavelmente antagoniza diretamente esses canais nos terminais pré-sinápticos e, conseqüentemente, inibindo a transmissão nervosa (MCGIVERN, 2007).

Um peptídeo sintético foi produzido a partir da ω -conotoxina MVIIA e denominado de ziconotida. Hoje em dia, a ziconotida é comercializada como o analgésico Prialt® (PROMMER, 2006). Existem vários estudos que mostram a eficácia da ziconotida para tratar vários estados de dor, inclusive em humanos (STAATS *et al.*, 2004; RAUCK *et al.*, 2006; ELLIS *et al.*, 2008). Os efeitos analgésicos da ziconotida são mais potentes que a morfina e, por esta razão, parecem ter melhor utilidade clínica na dor neuropática não responsiva à morfina. São consideráveis as limitações do emprego clínico da ziconotida: sua reduzida janela terapêutica e a incapacidade de penetrar no SNC através da barreira hematoencefálica, de modo que sua administração deve ser feita via intratecal (POPE e DEER, 2013).

Diferente da MVIIA, a toxina Ph α 1 β é uma fração do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. As aranhas do gênero *Phoneutria* são membros da família *Ctenidae*, ordem *Araneae* e classe *Arachnida*. Elas habitam as florestas tropicais. São conhecidas como aranhas armadeiras pela postura característica de levantar as patas frontais quando se sentem ameaçadas. A administração do veneno da *P. nigriventer* pode provocar convulsões, agitação, sonolência, náusea, hipertensão, tremores, entre outras manifestações clínicas (DA CRUZ-HÖFLING *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2016).

A fração **PhTx1** está constituída por um peptídeo chamado de Tx1. Essa toxina tem a capacidade de inibir diferentes canais de sódio de tipo Nav em mamíferos, provavelmente obstruindo o próprio canal. A fração **PhTx2** tem 9 peptídeos: PnTx2-1 a PnTx2-9 (CORDEIRO MDO *et al.*, 1992) e, embora alguns peptídeos sejam mais estudados que outros, em geral também modulam a cinética dos canais de sódio (MATAVEL *et al.*, 2002). Um desses peptídeos tem um efeito espontâneo de ereção de pênis sendo muito estudado pelas suas aplicações clínicas (TORRES *et al.*, 2010). A fração **PhTx4** tem três peptídeos: PnTx4(6-1), PnTx4(5-5) e PnTx4(4-3) (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Essa fração tem um efeito muito potente como inseticida devido a elevada toxicidade em insetos (baixa toxicidade em camundongos) (FIGUEIREDO *et al.*, 1995; DE LIMA *et al.*, 2016). As frações PnTx4(6-1) e PnTx4(5-5) inibem a recaptção de glutamato no SNC de mamíferos (OLIVEIRA *et al.*, 2003; SILVA, F. R. *et al.*, 2016). A fração **PhM** (também chamada de PhTx5) está formada por um grupo de pequenos peptídeos que provocam a contração do musculo liso (PIMENTA *et al.*, 2005).

A fração **PhTx3** é uma das mais estudadas. Ela tem 6 peptídeos: PnTx3-1 a PnTx3-6. Os peptídeos desta fração têm sido descritos agir sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem (GVCCs) e canais de potássio (BORGKVIST *et al.*). A fração PnTx3-6 é conhecida como Ph α 1 β . Ela inibe reversivelmente os GVCCs não só de tipo N, mas também de tipo R, P/Q e L com diferentes afinidades (sendo este efeito classificado nas diferentes magnitudes: N > R > P/Q > L) (VIEIRA *et al.*, 2005). Essa fração também antagoniza o canal TRPA1, um canal iônico presente em neurônios sensoriais (TONELLO *et al.*, 2017). Atualmente existe um peptídeo desta fração produzido por DNA recombinante chamado de CTK 01512-2, o qual também foi demonstrado ter ação analgésica semelhante ao peptídeo nativo da Ph α 1 β (TONELLO *et al.*, 2017).

A Ph α 1 β tem sido estudada pelas suas propriedades analgésicas em diferentes modelos de dor (SOUZA *et al.*, 2008; DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2011; CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2013; DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013; RIGO *et al.*, 2013; DINIZ, D. M. *et al.*, 2014). Ela é capaz de reduzir a dor neuropática induzida pela lesão do nervo ciático (DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013), dor inflamatória persistente induzida por capsaicina (CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2013), dor inflamatória periférica induzida por CFA (DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013), dor derivada do tratamento do câncer por paclitaxel (RIGO *et al.*, 2013), entre outras. A Ph α 1 β também potencializa

o efeito da morfina em camundongos, reduzindo a hiperalgesia, tolerância, constipação e síndrome de dependência induzidos por repetidas doses de morfina (TONELLO *et al.*, 2014).

Alguns estudos compararam os efeitos analgésicos da ω -conotoxina MVIIA e a Ph α 1 β . Por exemplo, em modelos animais de dor inflamatória e neuropática (induzida por o Adjuvante de Freund completo (CFA) e por lesão constritiva crônica do nervo ciático (CCI), respectivamente), a Ph α 1 β foi capaz de prolongar em maior intensidade a ação antinociceptiva quando comparada a ω -conotoxina MVIIA (DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013). A explicação para essa diferença não parece estar relacionada diretamente ao potencial de inibição do transiente de cálcio no gânglio dorsal (DRG), já que o comparativo dos efeitos inibitórios na corrente de cálcio em resposta ao tratamento dessas toxinas são discordantes: para Ph α 1 β , é maior nos modelos com dor inflamatória e menor nos modelos de dor neuropática (DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013). A ação antinociceptiva da Ph α 1 β tem uma janela terapêutica 4 vezes superior a da ziconotida em modelos de dor aguda e crônica (SOUZA *et al.*, 2008). Além da janela terapêutica baixa, a ziconotida apresenta ainda vários efeitos adversos em doses analgésicas como náuseas, vômitos, confusão mental, hipotensão postural, retenção urinária, dentre outros (SMITH e DEER, 2009). Ao contrário, uma administração continuada da toxina não mostrou efeitos adversos (ROSA *et al.*, 2014). Isso já mostra as vantagens de um futuro tratamento analgésico da Ph α 1 β em humanos, comparado com o já existente da ziconotida.

2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento de astrócitos e micróglia com a inflamação periférica e os efeitos antinociceptivos das toxinas Ph α 1 β e ω -conotoxina MVIIA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a nocicepção mecânica de ratos no modelo de dor inflamatória induzida pela injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (CFA).
- Investigar se a inflamação periférica induz reatividade de astrócitos e micróglia no corno dorsal do segmento lombar da medula espinhal.
- Investigar se a inflamação periférica afeta a plasticidade morfológica glial no corno dorsal do segmento lombar da medula espinhal.
- Investigar a dinâmica temporal da reatividade e plasticidade morfológica da glia em resposta à lesão inflamatória de origem periférica.
- Investigar se a terapia antinociceptiva das toxinas Ph α 1 β e ω -conotoxina MVIIA altera o curso da reatividade, proliferação e plasticidade morfológica de astrócitos e micróglia induzidas pela dor inflamatória periférica.

3 RESULTADOS: ARTIGO PARA SUBMISSÃO

Ph α 1 β spider toxin reverses glial activation and pain upon peripheral inflammation

Abbreviated title: Ph α 1 β reverses glial activation and pain

Category: Research article

Number of pages: 29

Number of: Figures: 5 /Tables: 0 /Movies: 0

Number of words for: abstract = 122 /Introduction = 525 /Discussion = 1,352

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments: This work was supported by a grant to Prof. Marcus Vinícius Gomez from REDE Fapemig, CNPq and CAPES Toxinology. Hèlia Tenza Ferrer was supported by a CAPES PhD fellowship.

3.1 ABSTRACT

A peripheral inflammatory injury increases the mechanical sensitivity in response to light-touch, also named as allodynia. The discovery that spinal astrocytes and microglia become reactive to the peripheral inflammation suggests that the glia presumably engage with the pain pathophysiology. Here, we found that mechanical allodynia induced by peripheral inflammation with complete Freund's adjuvant (CFA) produce robust changes in the spinal glial morphology and proliferation that are compatible with the reactive phenotype. Moreover, we found that intrathecal injection with the analgesic Ph α 1 β spider toxin, a voltage-gated calcium channel (VGCC) blocker, reverses all the glial pathological features of the peripheral inflammation. We therefore suggest that the Ph α 1 β toxin, apart from its notable analgesic effects, is also a potent anti-inflammatory compound acting on glial plasticity.

Keywords: glia, morphology, inflammatory pain, voltage-gated calcium channels, Ph α 1 β

3.2 INTRODUCTION

Sensory neurons from the dorsal root transduce nociceptive impulses from the periphery of the body to the spinal cord, which then relay the sensory information with local neurons and glial cells (astrocytes and microglia). In the event of a peripheral inflammatory injury, the mechanical sensitivity in response to light-touch is significantly increased (allodynia). The discovery that peripheral inflammation can induce spinal glial cells to enter a 'reactive' state suggests that glial cells presumably engage with the pain pathophysiology (SORGE *et al.*, 2015). Although the function of reactive glia is debated, different studies indicate that these cells regulate remodeling of physiological and structural synaptic events facilitating the nociceptive neurotransmission in the dorsal horn of the spinal cord (COULL *et al.*, 2005). For example, dysregulation of glutamate homeostasis via astrocytic uptake leads to central sensitization and persistent heat hypersensitivity (FALNIKAR *et al.*, 2016). Likewise, activated microglia mediate the mechanical hypersensitivity induced by injured sensory neurons-derived colony-stimulating factor 1 (CSF1) (GUAN *et al.*, 2016) and ATP (COULL *et al.*, 2005).

Remarkably structural and gene expression changes in reactive glia stimulate the calcium dependent release of diverse glial-derived proalgesic mediators including peptides, prostaglandins and proinflammatory cytokines, which in turn contribute to the pain sensation (MCMAHON *et al.*, 2005; TOKUHARA *et al.*, 2010; PARKHURST *et al.*, 2013; LALO *et al.*, 2014). Notably, the voltage-gated calcium channels (VGCC) are expressed in glial cells and seem to be critical to initiate the reactive phenotype in response to injury (WESTENBROEK *et al.*, 1998; DU *et al.*, 1999). Thus, inhibition of VGCC represents an interesting target to intercept the glial reactivity and pain phenotype. Interestingly, the pharmacological studies of peptide toxins MVIIA and Ph α 1 β (purified from the venom of *Conus magus* and *Phoneutria nigriventer*, respectively) have progressed enormously in the last three decades. It is now clear that these toxins are useful analgesics (SOUZA *et al.*, 2008; DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2011; RIGO *et al.*, 2013; DINIZ, D. M. *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2014). Both MVIIA and Ph α 1 β appear to exert antinociceptive actions through inhibition of VGCC, which is expected to have an inhibitory role in pain transmission.

The MVIIA toxin is a selective, reversible blocker of N-type VGCC (KRISTIPATI *et al.*, 1994; KNAPP *et al.*, 2012). The Ph α 1 β toxin, otherwise, inhibits reversibly a

variety of VGCC (including N-, R-, P/Q- and L-types) (VIEIRA *et al.*, 2005) and the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (TONELLO *et al.*, 2017). Surprisingly, despite the considerable advance from studies using models of chronic pain, it is still unclear whether calcium channel blockers such as MVIIA and Ph α 1 β achieve analgesia as a result of the inhibition of glial reactivity in the spinal cord dorsal horn.

Here, we performed a morphological study of the spinal glial cells from an animal model of peripheral inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA). We injected rats intrathecally with MVIIA and Ph α 1 β and observed that both toxins produced robust reversal of allodynia and level of glial reactivity (measured by morphological changes and proliferation). Our findings suggest that the antinociceptive effects of MVIIA and Ph α 1 β in response to peripheral inflammatory injury may develop as a result of the calcium-dependent plasticity in glial cells.

3.3 METHODS

3.3.1 Animals

Male adult Wistar rats (180–250 g) were housed in a temperature-controlled facility with a 12 h light/dark schedule and provided with food and water *ad libitum*. The animals were habituated to the housing facilities for at least one week before the experiments began. The minimum number of animals was used, and the experiments were carried out following Ethical guidelines for investigations of experiments in conscious animals (ZIMMERMANN, 1983). All experiments were authorized by the Federal University of Minas Gerais (protocol number: 347/2012).

3.3.2 Drugs and treatments

The Ph α 1 β toxin was purified from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* (CORDEIRO MDO *et al.*, 1993). The ω -conotoxin MVIIA was purchased from Latoxan (Valence, France). Stock solutions of the toxins were prepared with phosphate buffered saline (PBS) maintained at -20°C and diluted to the required concentration before use. Freund's Complete Adjuvant (CFA) was obtained from

Sigma (St. Louis, MO, USA), consisting of 1 mg/mL heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannan monooleate.

3.3.3 Induction of inflammatory pain

The inflammatory pain was induced by subcutaneous intraplantar injection of 50 μ L of CFA to the right hind paw using a 27-gauge needle. The rats of the control group were injected with 50 μ L saline into the right hind paw. Inflammatory pain was produced over a period of 2, 7 or 14 days (see the result section for details).

3.3.4 Intrathecal injection

The intrathecal injection was performed following the method previously described (MESTRE *et al.*, 1994). Briefly, 2 days after peripheral inflammation induction, an intrathecal injection of Ph α 1 β (200 pmol/injection), ω -conotoxin MVIIA (100 pmol/injection) or vehicle (PBS) was administered with a 28-gauge needle connected to a 10 μ L Hamilton microsyringe (Hamilton, Nevada, USA). During the procedure, the animals were lightly restrained to maintain the position of the needle, and the puncture of the dura mater was indicated behaviorally by a slight flick of the tail.

3.3.5 von Frey testing

Electronic Von Frey (EFF Insight, São Paulo, Brasil) was performed to measure the sensitivity to mechanical stimulation induced by CFA injection and by the effects of the compounds injected intrathecally. Rats were placed individually and habituated for 30 minutes into clear front Plexiglass boxes (9 x 7 x 11 cm) on an elevated mesh platform to allow access to the ventral surface of the hind paws. The tip of the pressure transducer of the analgesimeter was applied linearly through the holes in the mesh on the plantar surface of the hind paw at increasing pressure. Paw withdrawal caused by the stimulation was registered as a response and the corresponding force applied was recorded in grams to determine the mechanical pain sensitivity threshold. The average of five trials per paw was used to measure the mechanical allgesia.

3.3.6 Tissue sections and immunofluorescence

Rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine/xylazine injection (100 mg/kg per 10 mg/kg body weight) and transcardially perfused with ice-cold saline (0.9%) followed by freshly prepared 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). The spinal cords were removed by hydraulic extrusion with PBS and maintained in 4% PFA for 24 h at 4°C. Then, 50 µm transverse slices were prepared using a vibrating blade microtome (Leica Microsystems; Wetzlar, Hesse, Germany) from the L3-L5 lumbar spinal cord. For BrdU detection, slices were pretreated for antigen-retrieval with 1M HCl for 30 min at 45°C and then washed with PBS. After this, the usual immunofluorescence protocol was used. Briefly, the free-floating slices were washed with PBS and incubated with permeabilizing-blocking solution (PBS containing 4% BSA and 0.2% Triton X-100) for 90 minutes at room temperature, and then, incubated overnight at 4°C in the same blocking solution containing the following primary antibodies at the indicated dilutions: GFAP (Sigma-Aldrich, G3893, 1:400 dilution), Iba1 (Wako Pure Chemical Industries, 019-19741, 1:400 dilution) and BrdU (Abcam, ab1893, 1:500 dilution). After primary antibody incubation, slices were rinsed three times in PBS for 10 min each time and incubated for 3 h with the following Alexa Fluor (AF) dye-conjugated secondary antibodies: AF-594 anti-mouse (Thermo Fisher, A11005, 1:1,000 dilution), AF-488 anti-rabbit (Thermo Fisher, A21206, 1:1,000 dilution) and AF-647 anti-sheep (Thermo Fisher, A-21448, 1:1,000 dilution). Following incubation, the slices were washed three times with PBS and mounted in Dako fluorescent mounting medium (Agilent Technologies, California, USA). The region of interest (ROI) encompassing the layers I-IV of the dorsal horn was selected as using the Leica Application Suite Advanced Fluorescence software (LAS-AF, Leica Microsystems). Three-dimensional z-stacks were acquired using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). Acquisition settings were kept constant in each experiment for comparison between rats. All images were captured under identical conditions (20x objective, 1024 x 1024 pixels, 200 Hz), and individual maximum z-projections images were used to quantify levels of GFAP (LAS-AF software) or quantify Iba1-positive cells (manually counted using the LAS-AF software). A 63x objective was used for BrdU colocalization and microglia morphology experiments. Colocalization experiments were performed in three confocal stacks for

each animal and evaluated using the orthogonal projection tool with the Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012) software.

3.3.7 Microglia morphology

Skeletal morphology: Z-stack images were acquired as explained above. Confocal images were then converted to binary images with Fiji (ImageJ) (SCHINDELIN *et al.*, 2012). Then, the binary images were edited manually to clear the background and to join all the branches, so that the cell image would be a continuous set of pixels. Once the image was ready, Fiji Skeleton plugin (ARGANDA-CARRERAS *et al.*, 2010) was applied to convert the cells in skeletons. With this image, Fiji software could calculate all the voxels type in the image and then count the number and length of the ramifications, as well as the number of junctions.

Regularity index (RI): Fiji binary images previously described were used to calculate the regularity index (RI), as described elsewhere (DAVIS *et al.*, 2017). Briefly, RI was calculated as the equation:

$$RI = \frac{X_{NND}}{\delta_{NND}}$$

where *NND* is the Nearest Neighbor Distance, X_{NND} is the average NND of a population and δ_{NND} is the standard deviation of that population. For NND calculation we used the Fiji NND plugin (Yuxiong Mao, 2016).

Roundness: Fiji binary images previously described were modified to consider only the cell soma. The roundness was calculated as described previously (DAVIS *et al.*, 2017). Briefly, we used the Fiji tool “Analyze particles”, where internal algorithm calculates the roundness of the cells with the following equation:

$$R = \frac{4A}{\pi M^2}$$

where *A* is the area of the soma of the cell and *M* is the length of the major axis, driven from the longest axis of an ellipse fit to each cell soma.

3.3.8 Luminex assay

Cytokine/chemokine levels in spinal cord or dorsal root ganglia (DRG) samples were measured after two days of CFA injection. First, the L3-L5 region of spinal cord ipsilateral to the inflammation was dissected and stored at -80°C until used in the Multiplex assay. Then, the samples were homogenized in PBS with a protease inhibitor. Total protein concentration for each sample was measured using a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. MA USA). A multiplexed immunoassay based on Luminex xMAP technology was performed using the Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels for measuring IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-18, IFN- γ , GM-CSF, and VEGF (RECYTMAG-65K, Millipore, Darmstadt, Germany). Assay plates were run according to the manufacturer's protocol using a Luminex 200 equipment (Luminex, Austin, TX, USA). Data was analyzed using Luminex xPONENT® software version 3.1. Contents for each sample were displayed in pg/mg of total protein.

3.3.9 Glutamate determination

Total glutamate determination was done through a redox reaction and quantified in the spectrofluorophotometer (SHIMADZU – RF-5301 PC). Tissue was homogenized in 0.1 mL of a 7.4 pH Krebs-Ringer-Hepes (KRH) buffer solution (KRH: 116 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 1.8 mM CaCl₂.2H₂O, glucose and 10 mM HEPES). Then, 15 μL of the homogenized samples were added to a curvet containing 1980 μL of KRH solution with β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺, 0.4 M) (Sigma #N6505-25MG) and 50U glutamate dehydrogenase (GDH, Sigma #G2626). The reaction consisted of indirectly quantifying glutamate through a quantification of the reduction of NADP⁺ to NADPH mediated through GDH. At the end of each quantification, 1 pmol glutamate was added to the reaction as a standard. Delta was calculated for each step subtracting the final RFU from each stage by the initial RFU of the previous stage. Relative values of glutamate (nmol/ μL) for each sample were normalized by total protein concentration using the Bradford Protein Assay (Sigma, #B6916-500mL).

3.3.10 Statistics

For two-sample comparisons of a single variable, such as fluorescence intensity and cell counting of the CFA model, we used the unpaired Student t-test. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests was performed to compare three groups or more with a single variable as it is shown in the fluorescence intensity of GFAP and Iba1-positive cell counting with the presence of toxins treatments and the microglia morphology with the toxin treatments. For studying different groups with two variables we used two-way ANOVA followed by Sidak's or Tukey's multiple comparison tests (see the results). For the exact number of animals used in each experiment and details of statistical analyses, see the figure legend. All tests were two-tailed and had an alpha level of 0.05. All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA). Values were expressed as means \pm SEM. Asterisks (*) in the figures indicate the P values for the post-hoc test and correspond to the following values: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, ****P < 0.0001, based upon mean \pm standard error of mean.

3.4 RESULTS

3.4.1 Peripheral inflammation induces astrocyte reactivity in the spinal cord

CFA is widely used to study the mechanisms of persistent and peripheral pain (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; XU, Z. Z. *et al.*, 2010; IKEDA *et al.*, 2012; XU, F. *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2016). To determine at which time point the CFA peripheral inflammation induces mechanical allodynia, we injected CFA or saline (0.9%) to the right hind paw of rats (50 μ L per animal). Then, we tested the mechanical nociception 2, 7 or 14 days after the hind paw injection (Figure 1a). CFA induced mechanical allodynia in the ipsilateral paw, compared to the saline group, in all time points tested (2 days: 15.18 ± 1.45 g in CFA vs. 43.18 ± 3.12 g in saline; 7 days: 15.73 ± 1.32 g in CFA vs. 40.25 ± 1.84 g in saline; 14 days: 17.16 ± 1.43 g in CFA vs. 37.20 ± 1.00 g in saline; two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 18)} = 12.19$, $p = 0.0001$; time: $F_{(1, 18)} = 144$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(3, 18)} = 16.40$, $p < 0.0001$; Figure 1b). Conversely, the contralateral paw of the CFA group did not

show a reduced mechanical nociceptive threshold in any time investigated (2 days: 31.68 ± 3.65 g in CFA vs. 40.48 ± 2.78 g in saline; 7 days: 37.68 ± 5.86 g in CFA vs. 40.67 ± 3.42 g in saline; two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test, treatment: $F_{(2, 30)} = 1.392$, $p = 0.2641$; time: $F_{(1, 30)} = 2.086$, $p = 0.159$; interaction: $F_{(2, 30)} = 0.6800$, $p = 0.5143$; Figure 1c).

To assess if the peripheral inflammation induces glial reactivity in the central nervous system (CNS), we measured the fluorescence intensity of the astrocyte marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) in the dorsal horn of the lumbar spinal cord (L3 - L5) (Figure 1d). Peripheral inflammation increased the fluorescence intensity of GFAP in the ipsilateral dorsal horn 2 days after the CFA paw injection, compared to the saline group (Figure 1e-f). The increase of fluorescence intensity of GFAP was not observed after 7 or 14 days of inflammation (2 days: $44.9\% \pm 0.20$; 7 days: $13.1\% \pm 0.03$; 14 days: $10\% \pm 0.04$, relative to the saline group; two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test, treatment: $F_{(1, 102)} = 12.81$, $p = 0.0005$; time: $F_{(2, 102)} = 3.069$, $p = 0.0508$; interaction: $F_{(2, 102)} = 3.069$, $p = 0.0508$; Figure 1f). In the CFA group, GFAP fluorescence intensity was greater in the ipsilateral dorsal horn compared to the contralateral side, an occurrence that was not found in the saline group (intragroup analysis, ipsilateral vs. contralateral in the CFA and saline groups: $17\% \pm 0.04$ ($p = 0.0027$) and $2\% \pm 0.05$ ($p = 0.7518$), respectively; Student's t-test; Figure 1g, h left). Interestingly, astrocyte reactivity was slightly higher in the contralateral side of the CFA group when compared to the contralateral side of the saline group (intergroup analysis, CFA:Sal ratio in ipsilateral: $33\% \pm 0.04$ ($p < 0.0001$); CFA:Sal ratio in contralateral: $17\% \pm 0.04$ ($p = 0.023$); Student's t-test; Figure 1h right).

Thus, the peripheral inflammation with CFA causes prolonged allodynia with acute effects on astrocyte activation in the dorsal horn of the spinal cord.

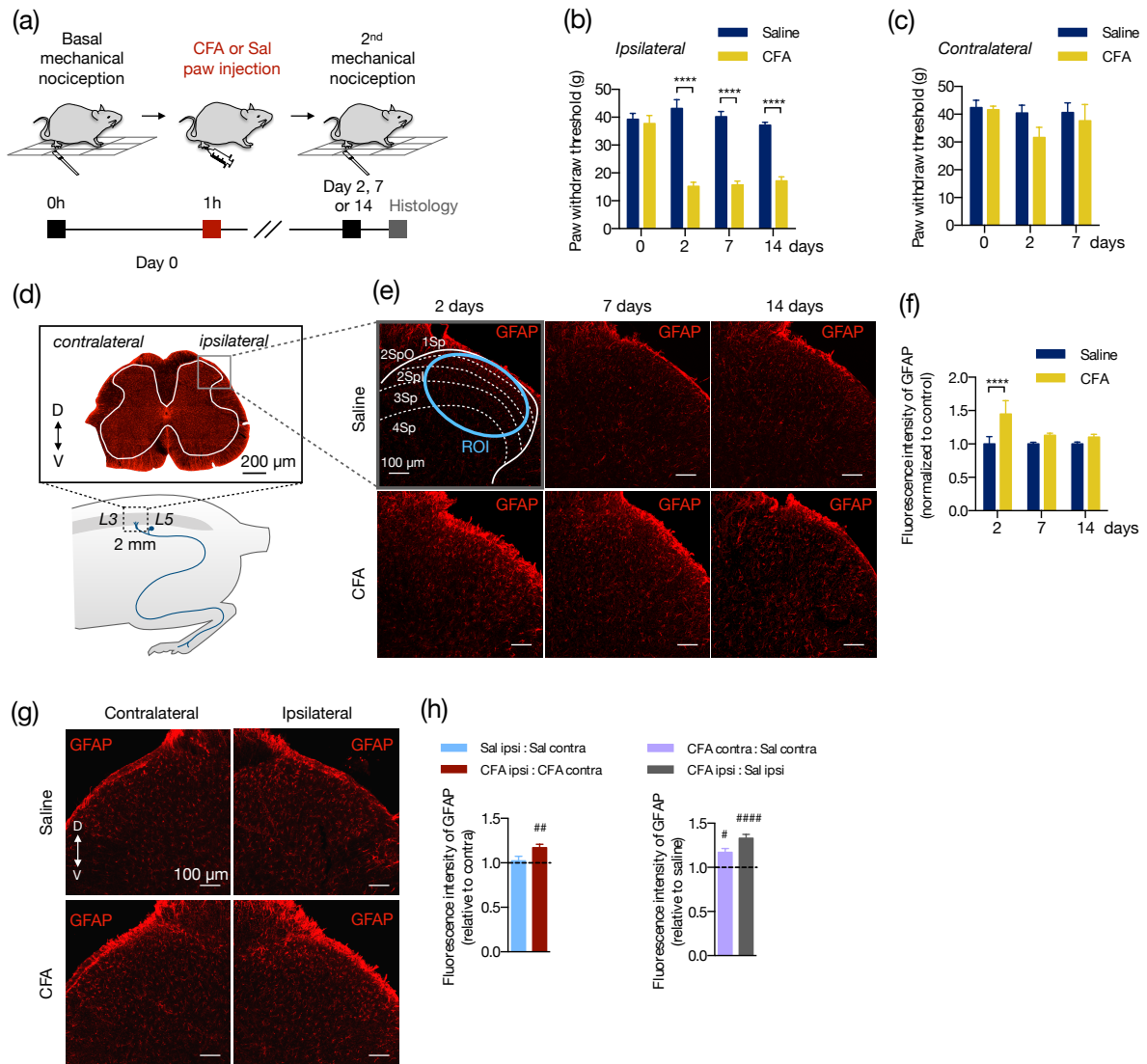


Figure 1. Peripheral inflammation induces astrocyte reactivity in the spinal cord.

(a) Experimental design for the CFA (complete Freund's adjuvant) model of peripheral inflammatory pain. One hour after the basal mechanical nociception, CFA or saline (Sal) were injected into the right hind paw of rats. Two, 7 or 14 days later, the second (2nd) mechanical nociception and histology were performed. (b, c) Mechanical nociception of the ipsilateral (b) and contralateral (c) hind paws was quantified before (day 0) and after saline or CFA injection (days 2, 7 and 14; $n = 6/\text{group}$). (d) Bottom: scheme showing the entry zone of the sciatic nerve in the lumbar spinal cord between L3 and L5 used for histology (~ 2 mm). Top: GFAP-labelled astrocytes in a transverse section of the lumbar spinal cord (D = dorsal, V = ventral coordinates relative to the central canal). The ipsilateral and contralateral sides are relative to the paw injection. The grey matter is within the white line. The grey square represents the area of the dorsal horn acquired in the histology studies. (e) Representative fluorescent images and (f) quantification of GFAP-labelled astrocytes in the dorsal horn of the lumbar spinal cord, showing the saline and CFA groups in 2, 7 or 14 days after the paw injection. All images are from the ipsilateral side. The dashed and blue lines delimit the Rexed's laminae and the region of interest (ROI) used for the

fluorescence intensity quantification, respectively. All values are relative to each respective saline group ($n = 3$ for saline and $n = 4$ for CFA groups, six slices per animal). (g) Representative fluorescent images of GFAP-labelled astrocytes in the dorsal horn of the spinal cord, showing the contralateral (left) and ipsilateral (right) sides of the Saline (upper) and CFA (bottom) groups. (h) Left: Intragroup analysis of GFAP fluorescence intensity of the ipsilateral relative to the contralateral side in each group (saline in blue, CFA in red). Right: Intergroup analysis of GFAP fluorescence intensity of the contralateral and ipsilateral sides of CFA-treated relative to the saline-injected rats (contralateral in purple, ipsilateral in grey; $n = 4$, six slices per animal; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ##### $p < 0.0001$). In all figures, the scale bars represent $100 \mu\text{m}$, except in figure (d) ($200 \mu\text{m}$). Summary data are represented as mean \pm SEM. In figures (b), (c) and (f), **** $p < 0.0001$.

3.4.2 Peripheral inflammation induces microglia reactivity in the spinal cord.

We also studied the effects of the peripheral inflammation on microglia reactivity in spinal cord. The number of microglia (Iba1-labelled cells) increased after inflammation compared to the saline group in all time points tested (2 days: $29\% \pm 0.02$; 7 days: $15\% \pm 0.02$; 14 days: $30\% \pm 0.05$, in CFA relative to the saline group; two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test, treatment: $F_{(1, 19)} = 93.90$, $p < 0.0001$; time: $F_{(2, 19)} = 203.5$, $p < 0.0001$; $F_{(2, 19)} = 2.923$, $p = 0.0782$; Figure 2a-b). As for astrocytes, the CFA intragroup analysis 2 days after inflammation showed that the number of Iba1-positive cells was increased only in the ipsilateral dorsal horn compared to the contralateral side (ipsilateral vs. contralateral in the CFA and saline groups: $49\% \pm 0.02$ ($p < 0.0001$) and $0.5\% \pm 0.036$ ($p = 0.98$), respectively; Student's t-test; Figure 2c and 2d left). Similarly, intergroup analysis revealed that the number of microglia was higher in the contralateral side of the CFA group when compared to the contralateral side of the saline group (CFA:Sal ratio in ipsilateral vs. contralateral: $49\% \pm 0.02$ ($p < 0.0001$) and $29\% \pm 0.02$ ($p < 0.0001$), respectively; Student's t-test; Figure 2d right).

When reactive, the microglia change their morphology and display different states of activation depending on the surrounding microenvironment (KETTENMANN, H. *et al.*, 2011). Upon activation, microglia's arborized appearance turns to a more phagocytic phenotype (including amoeboid morphology) with less ramifications, decreased process length and increased soma size. We then evaluated if peripheral inflammatory pain would also change the morphology of the spinal cord microglia

(Figure 2e-g). The number of branches, junctions, and the total branch length per microglia were diminished after 2 days of CFA injection compared to the saline group (number of branches: 63.76 ± 8.023 (CFA) and 102.5 ± 3.568 (saline); mean difference (MD) = -38.70 , 95% CI $[-64.28$ to $-13.12]$, $t_{(6)} = 3.889$, $p = 0.0115$, Student's t-test; number of junctions: 29.08 ± 3.455 (CFA) and 46.70 ± 1.338 (saline); MD = -17.62 , 95% CI $[-28.52$ to $-6.727]$, $t_{(5)} = 4.158$, $p = 0.0088$, Student's t-test; total branch length (μm): 175.5 ± 18.96 (CFA) and 268.9 ± 8.422 (saline); MD = -93.38 , 95% CI $[-143.1$ to $-43.65]$, $t_{(6)} = 4.827$, $p = 0.0048$, Student's t-test; Figure 2f). These morphological changes did not last long as these parameters were unaltered in the group analyzed 7 days after the inflammation onset (number of branches: 123.8 ± 7.429 (CFA) and 116.3 ± 9.309 (saline); MD = 7.462 , 95% CI $[-21.68$ to $36.61]$, $t_{(6)} = 0.6266$, $p = 0.5540$, Student's t-test; number of junctions: 29.08 ± 3.455 (CFA) and 46.70 ± 1.338 (saline); MD = -17.62 , 95% CI $[-28.52$ to $-6.727]$, $t_{(6)} = 4.158$, $p = 0.0088$, Student's t-test; total branch length (μm): 344.3 ± 16.72 (CFA) and 362.2 ± 18.98 (saline); MD = -17.95 , 95% CI $[-117.8$ to $81.94]$, $t_{(6)} = 0.4397$, $p = 0.6755$, Student's t-test; Figure 2g).

Therefore, the low-level peripheral inflammation with CFA induces microglial reactivity in the dorsal horn of the spinal cord.

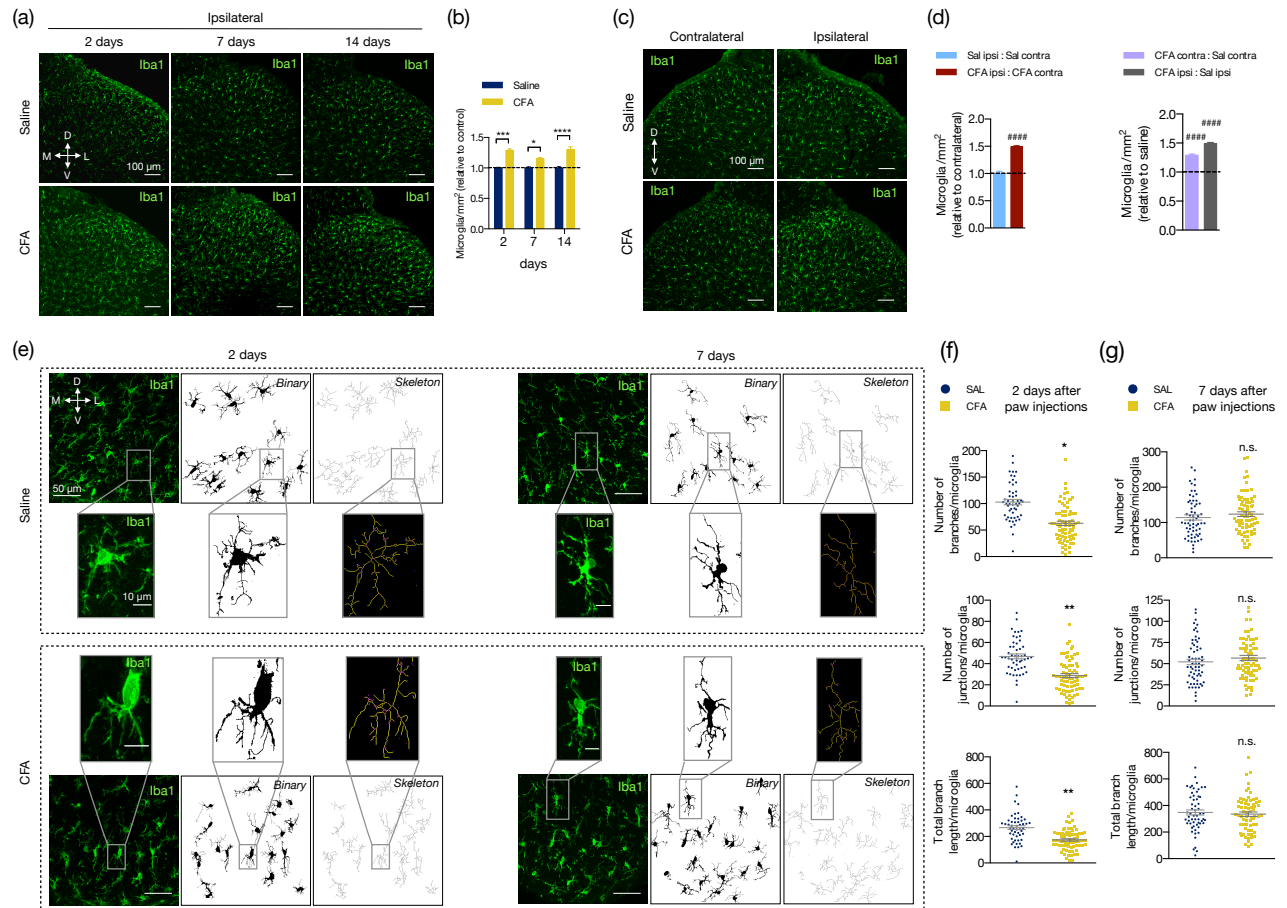


Figure 2. Peripheral inflammation induces microglia reactivity in the spinal cord

(a) Representative fluorescent images and (b) quantification of Iba1-labelled microglia (Iba1+) in the ipsilateral dorsal horn of the lumbar spinal cord, showing the saline and CFA groups in 2, 7 or 14 days after the paw injection. All values are relative to each respective saline group (n = 3 for saline and n = 4 for CFA groups, six slices per animal). (c) Representative fluorescent images of Iba1-labelled microglia in the dorsal horn of the spinal cord, showing the contralateral (left) and ipsilateral (right) sides of the saline (STEVENSON *et al.*) and CFA (bottom) groups. (d) Left: Intragroup analysis of the number of Iba1+ cells of the ipsilateral relative to the contralateral side in each group (saline in blue, CFA in red). Right: Intergroup analysis of the number of Iba1+ cells of the contralateral and ipsilateral sides of CFA-treated relative to the saline-injected rats (contralateral in purple, ipsilateral in grey; n = 4, six slices per animal; ##### p < 0.0001). (e) Representative images of the microglia morphology in the ipsilateral saline (STEVENSON *et al.*) and CFA (bottom) groups in 2 (left) or 7 (right) days after the paw injection. Left panel: Iba1+ immunofluorescence; Middle panel: the binary transformation; Right panel: the resulting skeleton. The insets represent the respective higher magnification image. (f, g) Quantification of the microglia morphology parameters in ipsilateral side of 2 (f) or 7 (g) days after the paw injection. The graphs show the quantification of the number of branches (STEVENSON *et al.*) and junctions (middle), or the total branches length (bottom) per microglia (n = 3-4 rats/group, three slices per animal). Each point in the graphs represents one microglia. Scale bars are 100 μm (a, c), 50 μm (e) or 10 μm (e, insets).

M: medial; L: lateral; D: dorsal; V: ventral (coordinates relative to the central canal). Summary data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; n.s., not significant.

3.4.3 Peripheral inflammation did not alter the concentration of inflammatory mediators and glutamate in DRG nor spinal cord.

Increased levels of cytokines and chemokines are known to signal inflammation (TURNER *et al.*, 2014). However, it is still unclear if a low-level peripheral inflammation is able to change the levels of these biomarkers in the CNS or peripheral nervous system (PNS). We performed a multiplex microbead assay for detection of 12 pro- and anti-inflammatory proteins (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-18, TNF- α , IFN γ , VEGF and GM-CSF) in the L3 - L5 segment of spinal cord and local dorsal root ganglia (DRG) of CFA- or saline-treated rats for 2 days. The tissue concentration of all studied biomarkers were unaltered in both spinal cord and DRG (CFA vs. saline, $p > 0.05$ in all cases, Student's t-test; Figure 3 a,b).

We also measured the levels of the excitatory amino acid glutamate, which increased release has been consistently described in response to inflammatory substances given peripherally (SHI *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2008; VIDAL-TORRES *et al.*, 2012). Similarly to the pro- and anti-inflammatory biomarkers, no change in the glutamate levels in the spinal cord was found upon CFA treatment (glutamate (nmol/mg of protein): 0.5713 ± 0.037 (CFA) and 0.5963 ± 0.046 (saline), MD = -0.025, 95% CI [-0.1687 to 0.1187], $t(6) = 0.4257$, $p = 0.6852$, Student's t-test; Figure 3c). Conversely to glial reactivity, low-level peripheral inflammation with CFA did not alter the concentration of selected pro- and anti-inflammatory biomarkers and glutamate in the spinal cord.

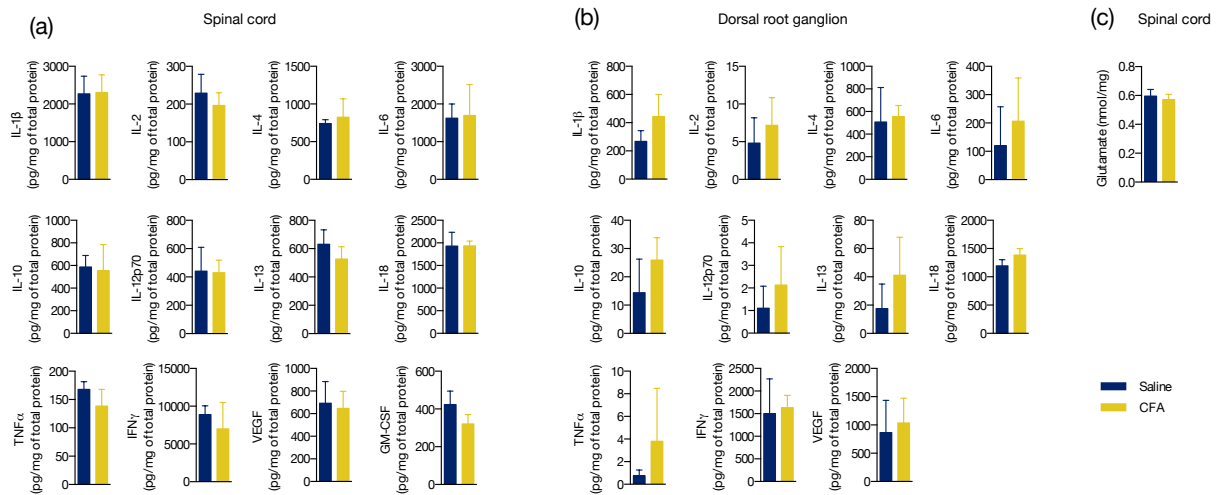


Figure 3. Peripheral inflammation did not alter the concentration of inflammatory mediators and glutamate in DRG nor spinal cord.

(a) Cytokine and chemokine levels in the ipsilateral L3 - L5 spinal cord segment or (b) in the respective dorsal root ganglia (DRG) of the CFA- or saline-injected groups. All values are relative to the total protein content of each sample (mg/mL). GM-CSF was not detected in the DRG. (c) Glutamate levels in the ipsilateral L3 - L5 spinal cord segment. Summary data are represented as mean \pm SEM ($n = 3-4$ rats/group).

3.4.4 The calcium-channel blocker toxin Ph α 1 β reverses allodynia and glial reactivity.

Animal toxins with analgesic properties have been considered as promising agents to treat persistent chronic pain (STAATS *et al.*, 2004; RAUCK *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008; DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2011; RIGO *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2015). The spider Ph α 1 β and marine snail MVIIA toxins are inhibitors of voltage gated calcium channels (VGCC), which are key molecules that transduce the nociceptive sensations through sensory neurons to CNS (TAKAHASHI e MOMIYAMA, 1993). However, as the VGCC are also important to trigger the glial reactive phenotype (WESTENBROEK *et al.*, 1998; DU *et al.*, 1999), we sought to investigate whether these therapeutic toxins would reverse the spinal glial response upon peripheral inflammation. We therefore injected intrathecally (i.t) PBS and toxins into the rats expressing the peripheral inflammatory pain two days

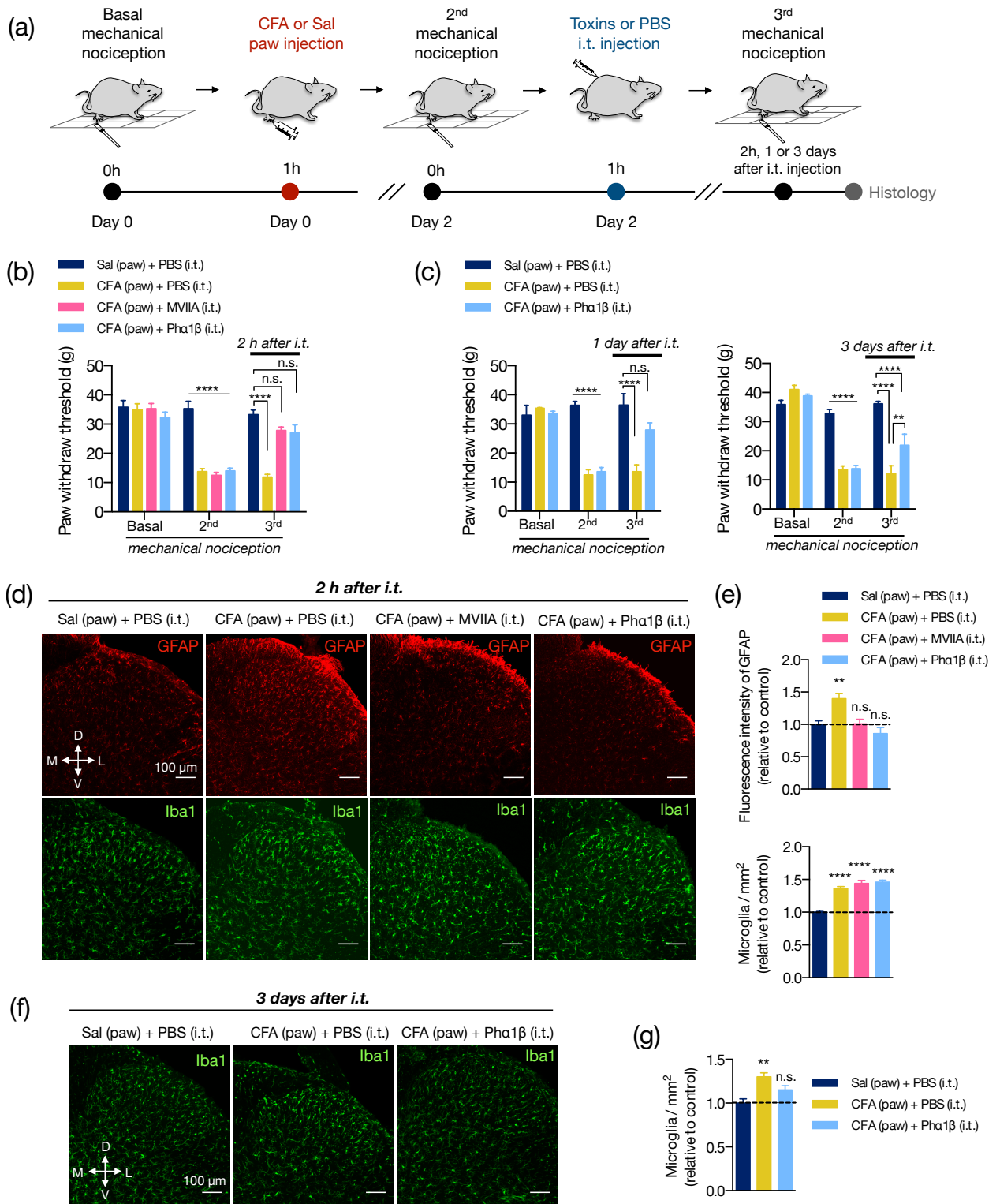
after the paw injection (Figure 4 a,b). Ph α 1 β and MVIIA toxins reversed the CFA-allodynia after 2 hours of their intrathecal administration (3rd mechanical nociception (g) in CFA (paw) + PBS (i.t.) vs. CFA (paw) + MVIIA (i.t.) and CFA (paw)+ Ph α 1 β (i.t.) groups: 11.93 ± 0.94 vs. 27.80 ± 1.25 and 27.07 ± 2.71 , respectively; two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 25)} = 24.57$, $p < 0.0001$; time: $F_{(2, 50)} = 103.5$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(6, 50)} = 20.13$, $p < 0.0001$; Figure 4b). We previously observed that Ph α 1 β toxin treatment produced robust, dose-dependent reversal of allodynia in rats for up to 24 h (DE SOUZA, A. H. *et al.*, 2013). Here, we extended the analysis and observed that the analgesic effects of the Ph α 1 β toxin could last longer, up to 3 days after a single intrathecal injection (3rd mechanical nociception (g) in CFA (paw) + PBS (i.t.) vs. CFA (paw)+ Ph α 1 β (i.t.) groups: 12.20 ± 2.66 vs. 21.93 ± 3.82 , respectively; two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, treatment: $F_{(2, 9)} = 26.59$, $p = 0.0002$; time: $F_{(2, 18)} = 107.9$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(4, 18)} = 25.65$, $p < 0.0001$ (Figure 4c).

We next assessed if the Ph α 1 β and MVIIA toxins reverse the CFA-induced glial reactivity (Figure 4d-k). After 2 days of the inflammation onset, both MVIIA and Ph α 1 β toxins reversed the CFA-increase of GFAP fluorescence intensity 2 hours after the i.t. injection (fluorescence intensity: 18.44 ± 0.3526 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 24.82 ± 1.527 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 18.73 ± 0.8621 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)], 16.86 ± 1.787 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)]; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 37)} = 6.438$, $p = 0.0013$; Figure 4d and 4e at the top). Conversely, the toxins did not reverse the CFA-induced number of microglia 2 hours after treatment (microglia/mm²: 307.2 ± 11.06 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 456.5 ± 9.887 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 410.7 ± 8.407 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)], 447 ± 9.396 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)]; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 83)} = 48.83$, $p < 0.0001$; Figure 4e at the bottom). However, the Ph α 1 β toxin diminished (~50%) the CFA-induced number of microglia when the treatment effects were analyzed 3 days after the intrathecal injection (microglia/mm²: 509.6 ± 24.06 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 660.55 ± 23.81 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 585.35 ± 24.33 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)]; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(2, 9)} = 9.829$, $p = 0.0055$) (Figure 4f,g).

We also evaluated if the Ph α 1 β and MVIIA toxins could reverse the microglial morphological changes in the spinal cord upon CFA paw injection (Figure 4h-k). Interestingly, the intrathecal administration of Ph α 1 β , but not the MVIIA toxin, reversed the CFA-induced increases in the number of branches, junctions, and the total branch length per microglia (number of branches per microglia: 121.1 \pm 11.39 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 61.49 \pm 5.97 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 67.31 \pm 9.87 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)], and 104.7 \pm 22.05 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)], one-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test, treatment: $F_{(3, 8)} = 4.459$, $p = 0.0404$); number of junctions per microglia: 55.24 \pm 5.47 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 30.62 \pm 2.90 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 32.24 \pm 3.52 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 51.71 \pm 11.92 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)], one-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test, treatment: $F_{(3, 8)} = 3.413$, $p = 0.073$; total branch length per microglia: 381.3 \pm 23.66 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 243.5 \pm 11.34 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 253.1 \pm 18.31 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 309 \pm 22.21 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)], one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 8)} = 10.59$, $p = 0.0037$; Figure 4h,i). These findings suggest that Ph α 1 β toxin treatment attenuate the microglial activation upon peripheral inflammation. We also studied the microglial somata morphology (Figure 4j,k). Peripheral inflammation ([CFA (paw) + PBS (i.t.)]) diminished the roundness of the soma when compared to the control group [Sal (paw) + PBS (i.t.)]. However, this typical morphological change was reversed with intrathecal treatments of Ph α 1 β or MVIIA, as the microglial soma displayed a more roundness shape (0.632 \pm 0.033 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 0.5120 \pm 0.017 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 0.557 \pm 0.017 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 0.585 \pm 0.007 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)]; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 8)} = 5.852$, $p = 0.0204$; Figure 4k left). The peripheral inflammation also increased the microglial soma size. Likewise, both Ph α 1 β and MVIIA reversed this morphological change as the microglial soma presented smaller in the treatment groups (42.42 \pm 3.95 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 56.58 \pm 3.18 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 49.38 \pm 3.63 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 45.17 \pm 1.57 [CFA (paw) + Ph α 1 β (i.t.)]; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, treatment: $F_{(4, 12)} = 6.90$, $p = 0.05$; Figure 4k, in middle). We also studied the tissue distribution of microglia cells through evaluation of the regularity index (RI), a parameter that describes the regular spacing of cells. The inflammation reduced the

RI, which was reversed with the $\text{Ph}\alpha 1\beta$ and MVIIA treatment (7.416 ± 1.028 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 3.98 ± 0.1914 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 4.85 ± 0.8562 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 4.951 ± 0.8084 [CFA (paw) + $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (i.t.)]; one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 8)} = 3.522$, $p = 0.0686$; Figure 4k right).

Altogether, these data suggest that the treatment with the analgesic calcium-channel blocker toxins $\text{Ph}\alpha 1\beta$ and MVIIA reverses the inflammatory pain and glial activation. Conversely to MVIIA, the $\text{Ph}\alpha 1\beta$ treatment reversed all the studied glial morphological changes induced by the peripheral inflammation.



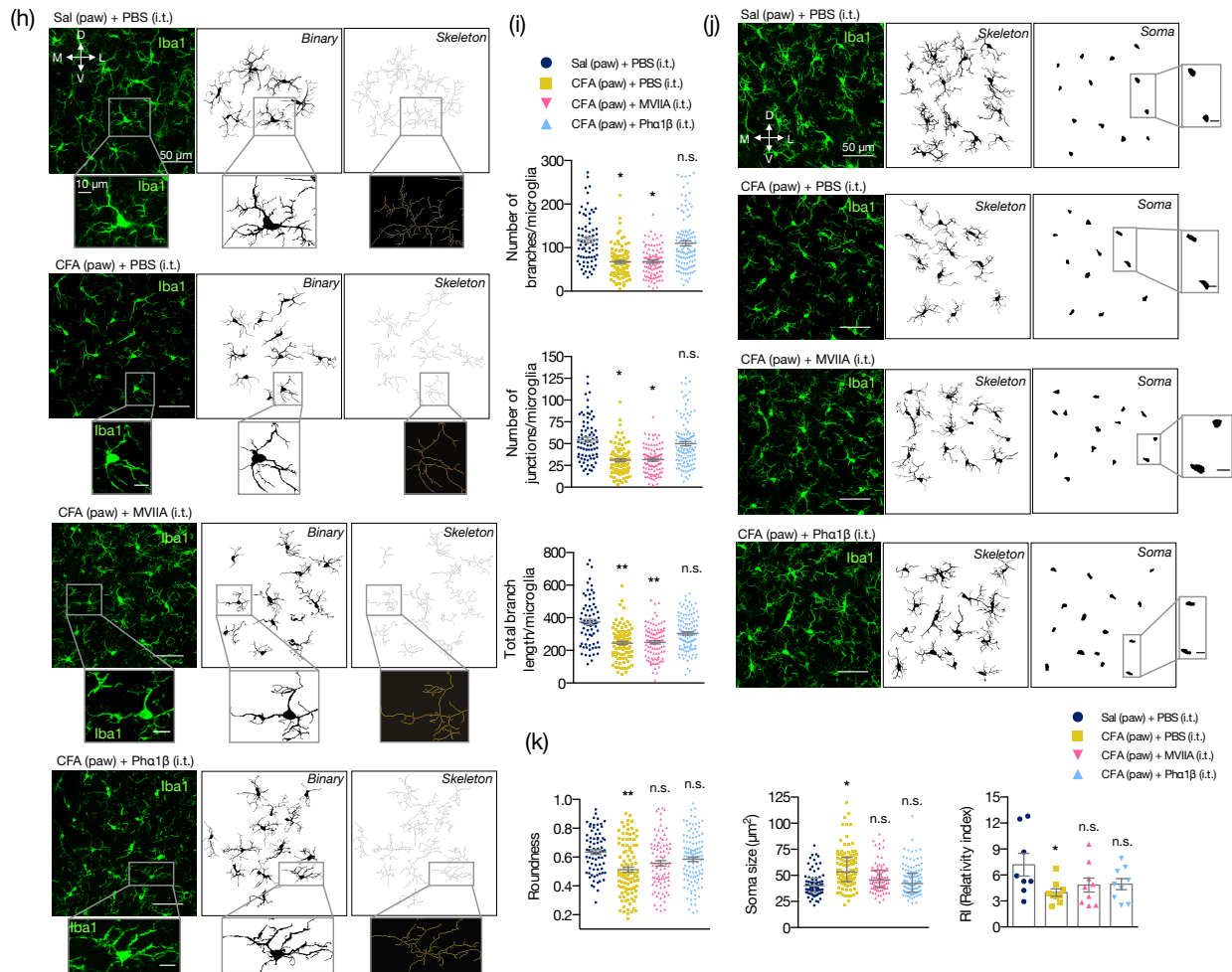


Figure 4. The calcium-channel blocker toxin Ph α 1 β reverses allodynia and glial reactivity.

(a) Experimental design for the CFA (complete Freund's adjuvant) model of peripheral inflammatory pain followed by intrathecal (i.t.) injections of PBS or calcium-channel blocker MVIIA and Ph α 1 β toxins. After the basal mechanical nociception, CFA or saline was injected into the right paw (day 0). Two days later, the second (2nd) mechanical nociception was performed. Then, PBS or the MVIIA and Ph α 1 β toxins were injected (i.t.). The third (3rd) mechanical nociception was performed 2 h, 1 day or 3 days after the i.t. injection. Histology was carried out immediately after the 3rd mechanical nociception. (b) Mechanical nociception of the ipsilateral hind paw was quantified before (Basal, day 0), after 2 days of saline or CFA paw injection (2nd, day 2) and two hours after the i.t. injections (MVIIA, Ph α 1 β or PBS, 3rd, day 2) ($n = 7-8/\text{group}$). (c) In an independent group of animals, the 3rd mechanical nociception of the ipsilateral hind paw was also quantified 1 day (left) or 3 days (right) after the i.t. injection of Ph α 1 β or PBS ($n = 4/\text{group}$). (d) Representative fluorescence images and (e) quantification of the fluorescence intensity of GFAP (STEVENS *et al.*) or the number of microglia (Iba1+, in the bottom) in the ipsilateral dorsal horn of the lumbar spinal cord 2 h after the i.t. injection ($n = 3-4/\text{group}$, six slices per animal). Graphs show values relative to the control group (Sal (paw) + PBS (i.t.)). (f, g) In an independent group of animals, the number of microglia (Iba1+) was also quantified 3 days after the i.t. injection of Ph α 1 β or PBS ($n = 4/\text{group}$, three slices per animal). The values in the graph are relative to the control group

(Sal (paw) + PBS (i.t)). (h-k) Toxins reverse the CFA-induced microglial morphology changes. (h) Representative images of the resulting ipsilateral skeleton and (i) branching complexity analyses 2 h after the i.t. injection ($n = 3\text{-}4/\text{group}$, three slices per animal). (j) Representative images show the resulting microglial soma appearance. The insets represent the respective higher magnification image. (k) Measurements for roundness (left), soma size (middle) and regularity index (RI, right). Each point in the graphs represents one microglia (except for RI, which depicts each animal). Scale bars are $100\ \mu\text{m}$ (d, f), $50\ \mu\text{m}$ (h, j) or $10\ \mu\text{m}$ (insets). M: medial; L: lateral; D: dorsal; V: ventral (coordinates relative to the central canal). Summary data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; n.s., not significant (compared to the Sal (paw) + PBS (i.t) group).

3.4.5 The $\text{Ph}\alpha 1\beta$, but not the MVIIA toxin, reverses astrocyte proliferation induced by peripheral inflammation.

Glial cells often present the capacity to proliferate in the injured and uninjured CNS (WANNER *et al.*, 2013; BELLVER-LANDETE *et al.*, 2019). To assess if the increases in GFAP intensity (astrocytes) and the number of Iba1-positive cells (microglia) were due to local proliferation, we determined the number of astrocytes and microglia cells that colabeled with the BrdU marker (Figure 5a-d). Peripheral inflammation increased the number of proliferating astrocytes (GFAP⁺BrdU⁺ cells), which was reversed by the $\text{Ph}\alpha 1\beta$ treatment, but not with the MVIIA administration (GFAP⁺BrdU⁺ relative to total BrdU⁺ cells: 2.983 ± 1.111 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 7.10 ± 0.922 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 7.892 ± 0.748 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 3.741 ± 0.223 [CFA (paw) + $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (i.t.)]; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 9)} = 7.87$, $p = 0.0069$; Figure 5b). On the contrary, we did not observe local microglia proliferation induced by the CFA peripheral inflammation. Intriguingly, the treatment with the MVIIA toxin, otherwise, produced a significant increased the microglia proliferation (Iba1⁺BrdU⁺ cells) (Iba1⁺BrdU⁺ relative to total BrdU⁺ cells: 0.436 ± 0.223 [Sal (paw) + PBS (i.t.)], 1.149 ± 0.991 [CFA (paw) + PBS (i.t.)], 3.266 ± 0.914 [CFA (paw) + MVIIA (i.t.)] and 0.305 ± 0.164 [CFA (paw) + $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (i.t.)]; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, treatment: $F_{(3, 9)} = 2.937$, $p = 0.0917$; Figure 5d).

These finding suggest that astrocyte proliferation is a pathological hallmark of the peripheral inflammation, which could be reversed by the $\text{Ph}\alpha 1\beta$ but not MVIIA treatment.

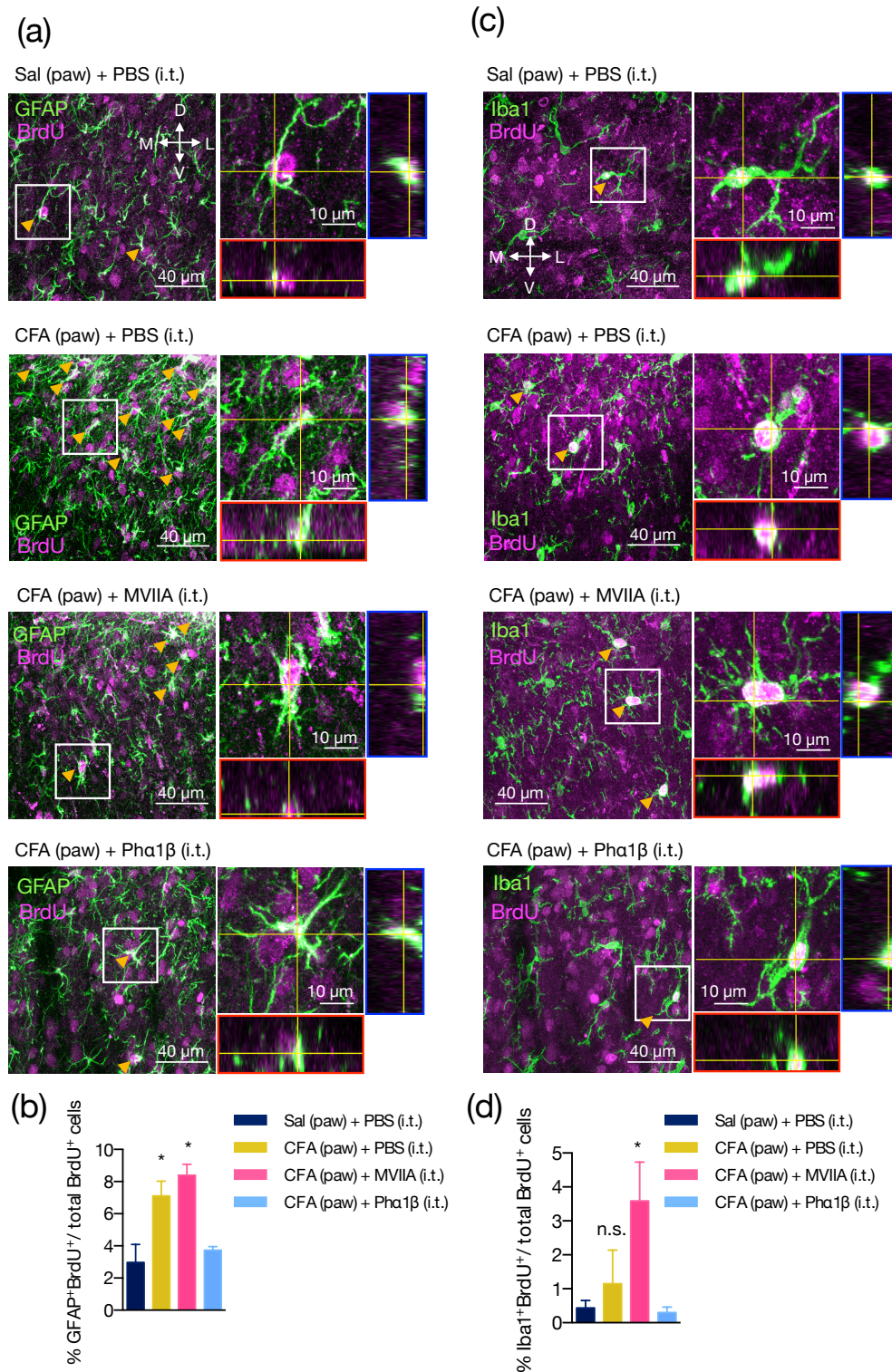


Figure 5. The Pha1 β , but not the MVIIA toxin, reverses astrocyte proliferation induced by peripheral inflammation

(a,c) Representative images of **(a)** astrocyte and **(c)** microglia proliferation in the ipsilateral dorsal horn of the lumbar spinal cord. Arrows indicate examples of GFAP⁺BrdU⁺ or Iba1⁺BrdU⁺ cells. Insets contain the resulting confocal orthogonal view of the selected cells showing colocalization between GFAP or

Iba1 with BrdU (in white). The lateral (blue) and bottom (red) rectangles represent the yz and xz views, respectively. **(b, d)** Quantification of **(b)** GFAP⁺BrdU⁺ or **(d)** Iba1⁺BrdU⁺ cells relative to the total number of BrdU⁺ cells ($n = 3/\text{group}$, three slices per animal). Scale bars are 40 or 10 μm for the low and high magnification images, respectively. M: medial; L: lateral; D: dorsal; V: ventral (coordinates relative to the central canal). Summary data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; n.s., not significant (compared to the Sal (paw) + PBS (i.t) group).

3.5 DISCUSSION

Along with the critical role in maintaining the central nervous system (CNS) development and homeostasis, glial cells participate in the inflammatory response by becoming reactive after injury (BURDA e SOFRONIEW, 2014). Whether peripheral inflammation shapes distinct glial responses in the damaged CNS remains a critical question to address. In this study, we demonstrated that a low-level peripheral inflammation triggers a complex and heterogenous glial reactivity in the dorsal horn of the lumbar spinal cord. Notably, intrathecal administration of the Ph α 1 β spider toxin, a voltage-gate calcium channel (VGCC) blocker, rapidly reversed the several features of the glial reactivity in peripheral inflammatory pain. The findings of this study provide a new direction for understanding the antinociceptive effects of VGCC blockers toxins that may involve the structural remodeling of the glial morphology.

Previous studies showed that reactive glial cells proliferate in response to injury and release a variety of proalgesic mediators that can adversely prolong the CNS inflammation and allodynia. Here we observed that the peripheral inflammatory pain caused both astrogliosis and microgliosis in the ipsilateral dorsal horn of the lumbar spinal cord (L3-L5) two days after the CFA paw injection (Figure 1e, 2a). Conversely to astrogliosis, the microgliosis persisted for up to 14 days after the inflammation onset, indicating that the chronic microgliosis is a remarkable pathological feature in response to the CFA-induced inflammatory pain (Figure 1f, 2b). Since the microglial cells are known to reduce inhibitory synaptic inputs (COULL *et al.*, 2005), the chronic microgliosis could mediate the inflammatory pain not only directly by strengthening the nociceptive synaptic connections, but also by physically displacing inhibitory terminals from surrounding reactive glia (KAMBRUN *et al.*, 2018). Although the CFA intragroup analysis showed increased gliosis in the ipsilateral dorsal horn relative to the contralateral side, CFA paw injection also caused a faint increase in gliosis within the

contralateral side in comparison to the contralateral side of the saline group (Figure 1g, h; 2c, d). Possibly, the gliosis spread to the contralateral side might result from the intrinsic spinal commissural circuits (PETKO e ANTAL, 2000; PETKO *et al.*, 2004), which discourages the use of the animal as its own control since the glial alterations did not appear to be strictly unilateral.

Reactive glia alters morphology in response to injury, which can offer valuable information about their state of activation (FERNANDEZ-ARJONA *et al.*, 2017; HEINDL *et al.*, 2018). Reactive microglia, for example, exhibit cytoskeletal alterations, including decreases in branching complexity (JONAS *et al.*, 2012). Likewise, body size and processes rich in glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes become thicker and highly immunoreactive (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; PEKNY, M. e PEKNA, 2016). Accordingly, we observed that the peripheral inflammation induced morphological features of reactive microglia in the dorsal horn of the spinal cord. The number of branches, junctions, and the total branch length per microglia were diminished 2 days post the CFA injection compared to the saline group (Figure 2e, f). However, similar to astrogliosis, these morphological changes did not last long after the inflammation onset (Figure 2g). These findings are in concordance with the fact that inflammation is a dynamic process involving a myriad of biological mechanisms, including microglial plastic changes (MORALES *et al.*, 2014). Possibly, the reactive microglial remodeling in the CNS upon peripheral inflammation manifests in the acute early proinflammatory response, which can be shortly reversed. This observation provides an opportunity to investigate if the microglial morphological transition to a less reactive phenotype could be critical for tissue recovery during the late anti-inflammatory responses.

Other studies have also shown that the pro-inflammatory peripheral stimuli are potent positive regulators of glial reactivity in the CNS. In most cases, however, this relationship was studied under experimental models with high levels of inflammation likely to disrupt the blood brain barrier. For example, compared to most reports describing paw injection volumes of CFA varying between 100 – 150 μ L (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2007; XU, F. *et al.*, 2014), we injected only 50 μ L. Surprisingly, this low dose of CFA induced a significant and persistent mechanical allodynia that lasted up to 14 days (Figure 1b, 4b). In contrast to previous studies (SAMAD *et al.*, 2001; RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; LEDEBOER *et al.*, 2005), the 12 inflammatory mediators studied after the CFA insult were unaltered in the

lumbar spinal cord or dorsal root ganglia (Figure 3). Nevertheless, these data support that glial reactivity is potentially more sensitive to detect the CNS inflammatory effects of low doses of CFA.

We hypothesized that the overstimulated nociceptive endings located in the CFA injection site, possibly, provide a neuroimmune pathway mediating inflammatory signals towards the dorsal horn of the spinal cord, which could then induce spinal glial reactivity and strength of pain transmission (WATKINS *et al.*, 2001; WOOLF e MA, 2007). It is well known that release of pro-nociceptive neurotransmitters by sensory afference into the superficial laminae of the dorsal horn depends on the calcium influx through presynaptic terminals (AUGUSTINE, 2001). Therefore, this previous evidence might explain the suppressor effects of VGCC blockers such as the spider toxin Ph α 1 β on abnormal sensory firing (Figure 4b, c). Strikingly, our findings also showed that the Ph α 1 β toxin reverses all the studied morphological features of reactive microglia (Figure 4h-k), as well as other hallmarks such as decreases in the distance between the glial bodies (regularity index) and distribution homogeneity (POMILIO *et al.*, 2016; DAVIS *et al.*, 2017). This observation is unprecedented and raises the question of whether the Ph α 1 β toxin, apart from its traditional use as an anti-nociceptive agent, may be a promising anti-inflammatory drug in the CNS. It should be also noted that the treatment with the toxin MVIIA presented less robust reversal effects of the CFA-induced morphological changes, which were restricted to the soma of microglia (roundness and soma size).

Spinal cord gliosis following peripheral inflammation might result from either migration toward the dorsal horn or local proliferation (by producing newly proliferated BrdU⁺ glia) (SUTER *et al.*, 2007). We observed that CFA paw injection increased the number of proliferated astrocytes (GFAP⁺BrdU⁺) in the lumbar dorsal horn (Figure 5a, b), indicating that the increased GFAP fluorescence intensity might be resulted from both astrocytic hypertrophy and proliferation. Conversely, peripheral inflammation with CFA did not alter the number of newly proliferated microglia (Iba1⁺BrdU⁺) (Figure 5c, d). Taking together, these finding suggest that migrating microglia (and/or infiltrating macrophages) from other regions of the spinal cord contribute to dorsal horn microgliosis and support the notion that heterogeneous glial populations respond differently to the peripheral inflammation.

Both microglia and astrocytes express a wide array of different VGCC types that are key mediators of calcium entry from the extracellular space, thereby regulating the glial autocrine release, structural remodeling and proliferation (SONTHEIMER, 1994; VERKHRATSKY e KETTENMANN, 1996; STEBBING *et al.*, 2015). In corroboration with recent evidence (ZAMPONI, 2016), we also proposed these calcium channels as therapeutic targets in CNS inflammation because the calcium signaling in the glia may provide positive feedback to the establishment of the reactive phenotype (WESTENBROEK *et al.*, 1998; DU *et al.*, 1999). In contrast to the MVIIA toxin, we observed that only the Ph α 1 β toxin reversed the increased number of newly proliferated astrocyte following the peripheral inflammation (Figure 5a, b). The MVIIA toxin is a peptide isolated from the venom of the *Conus magus* snail, regarded as a highly selective blocker of N-type Ca²⁺ channels (OLIVERA *et al.*, 1987; KRISTIPATI *et al.*, 1994). The Ph α 1 β , on the other hand, has been shown to block other VGCC subtypes including N, R, P/Q and L-types (Vieira 2005), in some cases even the TRPA1 channel (TONELLO *et al.*, 2017). Possibly, the remarkable effect of the Ph α 1 β on the astrocytic proliferation could thus be critically dependent on the blockage of the TRPA1 and VGCC other than the N-type.

In summary, our findings demonstrate that the glial structural remodeling induced by the peripheral inflammatory pain are reversed by the VGCC blocker Ph α 1 β toxins. We suggest that the Ph α 1 β spider toxin, apart from its analgesic effects, is also a potent anti-inflammatory compound acting on glial plasticity. Whether this effect arise from the direct inhibition of VGCC in glia or sensory neurons is yet to be determined.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho surgiu pela falta de estudos que mostrassem de forma mais profunda as mudanças gliais decorrentes da dor inflamatória periférica e o tratamento antinociceptivo de toxinas inibidoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem. Por exemplo, como já foi descrito no presente estudo, as células da glia são amplamente estudadas no processo da dor (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; LEDEBOER *et al.*, 2005; XU, F. *et al.*, 2014; XU, J. *et al.*, 2014; BAS *et al.*, 2015), mas nenhum estudo fez a caracterização morfológica glial em resposta ao tratamento com essas toxinas.

O estudo observou que a inflamação periférica suave induzida por CFA, provoca uma reatividade na glia espinal, ou seja, no sistema nervoso central. Essa astrogliose e microgliose foi localizada no lado ipsilateral do corno dorsal da medula espinal lombar. Entretanto, ela não foi restrita ao lado ipsilateral, tendo também certo nível de gliose no lado contralateral. Isso concorda com estudos neuronais da medula espinal que mostram ampla conexão sináptica entre os lados ipsi e contralateral da medula espinal através da comissura branca (PETKO e ANTAL, 2000; PETKO *et al.*, 2004). O interessante foi ver que, mesmo tendo certo nível de gliose no lado contralateral, os animais não apresentavam alodinia na pata contralateral à inflamação, o que sugere que o nível de gliose associa-se a alodinia.

A gliose permaneceu durante vários dias, sendo mais duradoura no caso da micróglia. Sabe-se que a micróglia costuma ser o primeiro tipo celular a responder as mudanças do microambiente tecidual, e essa reatividade microglial provoca uma ativação dos astrócitos (WEI *et al.*, 2008). Nesse estudo, a reatividade glial só foi estudada depois de 2 dias de inflamação. Provavelmente, por esta razão, tanto a micróglia quanto os astrócitos já estivessem ativados. Não obstante, a micróglia parece ser necessária para a manutenção da alodinia já que permaneceu ativada durante os 14 dias estudados pós inflamação.

Uma inflamação periférica suave conseguiu induzir também uma plasticidade na glia da medula espinal. Isso é bem surpreendente se pensamos a distância desde o sítio lesionado (pata) até a medula espinal. No caso de uma inflamação mais severa ou de lesão do nervo, essas mudanças na glia central devem ser devido ao desequilíbrio homeostático da barreira hematoencefálica. Esse acometimento aumenta a permeabilidade às citocinas liberadas periféricamente, além de outras células imunes provocando uma reação bem contundente na glia espinal.

São escassos os estudos que visem estudar as mudanças morfológicas da glia. A explicação parece clara: é muito difícil fazer tal avaliação. Além de necessitar de microscopia de alta tecnologia e recursos computacionais, gasta-se muito tempo de análise. O reconhecimento dos padrões morfológicos gliais deve indicar muitos aspectos patológicos do sistema nervoso que ainda são desconhecidos. Também é preciso reconhecer que o conhecimento da morfologia glial por completo pode ser algo impossível a ser feito. A glia são células que se adaptam tão bem (e rápido) a pequenas mudanças no microambiente que, nem sempre a mesma mudança morfológica seria consistente, afinal nem sempre o corpo responde igualmente a uma lesão. Por isso, os resultados encontrados por este estudo parecem ter grande interesse no estudo da inflamação periférica.

Neste estudo, uma inflamação periférica suave foi suficiente para provocar mudanças na expressão de marcadores de glia, como GFAP (astrócitos) e Iba1 (microglia), além das mudanças morfológicas. Uma limitação do nosso estudo foi que o marcador GFAP só marca as ramificações principais. Isso nos deixa com pouca margem para o estudo morfológico dos processos pequenos/finos dessas células. Além disso, este marcador tampouco marca o soma. O emprego de outros marcadores para astrócitos ou estudo tridimensional do microambiente celular podem garantir melhor observação de astrócitos.

No caso da microglia, é mais viável um estudo morfológico porque o marcador Iba1 consegue marcar toda a célula, tanto da microglia ativada quanto em repouso. O estudo morfológico da microglia permitiu observar como estas células conseguem detectar mudanças mínimas do ambiente, e usam a sua capacidade plástica para se adaptar e tentar retornar a homeostase local. As mudanças morfológicas observadas na presença de inflamação não foram exageradas, se adaptando assim ao nível inflamatório. Mas essas mudanças foram suficientes para causar alterações morfológicas nessas células, o que foi possível observar com a metodologia empregada neste estudo. As células da microglia no corno dorsal da medula espinal, em animais controle, parecem ter uma ativação intermediária e não de células totalmente em repouso. Isso deve ocorrer pois o corno dorsal é uma zona com muita estimulação sensorial devido a entrada axonal dos nervos sensoriais. Além disso, nesta zona, os neurônios de primeira ordem realizam sinapses com outros neurônios locais, tanto os de projeção como inibitórios. A perda e encurtamento de ramificações da microglia (embora não a torne ameboide) e a perda de circularidade do soma

diante de uma inflamação periférica parece realmente ter sido uma resposta a ativação continuada (e exagerada) dos nervos sensoriais durante a inflamação periférica.

A resposta glial ao tratamento da toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ foi surpreendente. Ela não só foi capaz de reverter os efeitos da gliose, diminuindo os marcadores celulares de GFAP e Iba1, mas também reverteu a morfologia e a distribuição da micróglia para o seu estado natural. Ainda resta a dúvida se esse efeito da toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ é devido a uma ação direta sobre a glia. Pode-se supor que o efeito é direto através de canais de cálcio, os quais aqueles do tipo L são expressos em astrócitos (TIPPENS *et al.*, 2008) e, de modo interessante, é alvo da toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (VIEIRA *et al.*, 2005). Os astrócitos também apresentam canais iônicos TRPA1 (SHIGETOMI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012; TAKIZAWA *et al.*, 2018), que está relacionado com a experiência sensorial que é bloqueada pela toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ (TONELLO *et al.*, 2014; TONELLO *et al.*, 2017). Curiosamente, o canal TRPA1 também parece estar relacionado, pelo menos, com a proliferação de células tronco no intestino (XU, C. *et al.*, 2017). Isso poderia explicar por que o tratamento com a $\text{Ph}\alpha 1\beta$ consegue reverter a proliferação astrocitária?

Muitos estudos feitos pelo Prof. Marcus V. Gomez mostraram que os efeitos analgésicos da $\text{Ph}\alpha 1\beta$ são semelhantes ao da toxina já em uso clínico aprovado MVIIA, embora os estudos indiquem que a farmacoterapia com a $\text{Ph}\alpha 1\beta$ apresente benefício superior. Por exemplo, a $\text{Ph}\alpha 1\beta$ tem uma janela terapêutica maior e menos efeito adverso. São poucas as evidências que possam explicar essas diferenças. Os resultados desse estudo acrescentam informação sobre este tema, pois notou-se que, pelo menos a nível glial, a $\text{Ph}\alpha 1\beta$ foi mais eficaz em reverter as alterações morfológicas gliais induzidas pela inflamação periférica. O efeito anti-inflamatório da $\text{Ph}\alpha 1\beta$ na glia foi notório. Já a MVIIA, só reverteu as alterações do soma (sem efeito sobre as ramificações e proliferação).

Este estudo levanta a hipótese de que os diferentes efeitos das toxinas sobre a morfologia glial devem surgir das diferentes afinidades que essas toxinas possuem sobre VGCC. Diferente da $\text{Ph}\alpha 1\beta$, a MVIIA não mostra afinidade em outros canais de cálcio que não sejam de tipo N.

Mais estudos devem ser feitos para estudar, a nível molecular, o efeito da toxina $\text{Ph}\alpha 1\beta$ na plasticidade estrutural da glia em resposta a inflamação (seja periférica ou não). Sabe-se tanto que a glia está envolvida em inúmeras enfermidades

neurodegenerativas onde os processos inflamatórios são bem presentes (PEKKNY, MILOS *et al.*, 2016; HICKMAN *et al.*, 2018). Sabe-se pouco sobre medicamentos que agem na glia reativa. Seria bem interessante fazer uso de novas tecnologias como a optogenética para inibir só astrócitos ou micróglia, ou experimentos usando animais geneticamente modificados que eliminem a glia local para responder: será que os efeitos terapêuticos da Ph α 1 β persistem? Essas estratégias experimentais junto com ferramentas que indiquem a atividade celular em tempo real, *in vivo*, contextualizada com as respostas comportamentais de cobaias aportariam informações mais acuradas sobre a dinâmica biológica que rege a plasticidade funcional dessas células frente a uma inflamação. Um estudo assim conseguiria revelar de fato o verdadeiro potencial anti-inflamatório da Ph α 1 β .

5 CONCLUSÃO

A inflamação periférica na pata provoca alterações no nervo sensorio, como ativação de canais de cálcio sensíveis a voltagem e liberação de glutamato e outras substâncias pelo terminal pré-sináptico da medula. Conseqüentemente, o neurônio de segunda ordem se ativa e a transmissão nervosa da dor chega nas áreas encefálicas, provocando alodinia. Esse trabalho mostrou que se produz uma reatividade acentuada da glia no corno dorsal da medula espinal em resposta a inflamação periférica. O tratamento com as toxinas bloqueadoras de canais de cálcio sensíveis a voltagem $Ph\alpha 1\beta$ e a MVIIA reverte a alodinia mecânica e reatividade da glia. Em comparação com a MVIIA, o efeito anti-inflamatório da $Ph\alpha 1\beta$ foi muito mais acentuado já que reverteu todas as mudanças morfológicas gliais causadas pela inflamação periférica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S.; NASHMI, R.; FEHLINGS, M. Role of L-and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. **Neuroscience**, v. 99, n. 1, p. 179-188, 2000.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. In: (Ed.). **Nature**. England, v.457, 2009. p.675-7. ISBN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

ALTIER, C.; ZAMPONI, G. W. Targeting Ca²⁺ channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 9, p. 465-70, 2004.

ARGANDA-CARRERAS, I. et al. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. **Microsc Res Tech**, v. 73, n. 11, p. 1019-29, 2010.

AUGUSTINE, G. J. How does calcium trigger neurotransmitter release? **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 3, p. 320-6, 2001.

BAS, D. B. et al. Spinal release of tumour necrosis factor activates c-Jun N-terminal kinase and mediates inflammation-induced hypersensitivity. **Eur J Pain**, v. 19, n. 2, p. 260-70, 2015.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BELLVER-LANDETE, V. et al. Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 518, 2019.

BENFENATI, V. et al. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 6, p. 2563-8, 2011.

BEZZI, P. et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 281-5, 1998.

BINDA, N. S. et al. PhTx3-4, a Spider Toxin Calcium Channel Blocker, Reduces NMDA-Induced Injury of the Retina. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 3, 2016.

BORGKVIST, A. et al. Loss of Striatonigral GABAergic Presynaptic Inhibition Enables Motor Sensitization in Parkinsonian Mice. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 976-88, 2015.

BOZOYAN, L.; KHLGHATYAN, J.; SAGHATELYAN, A. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. **J Neurosci**, v. 32, n. 5, p. 1687-704, 2012.

BRADESI, S. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. **Neurogastroenterol Motil**, v. 22, n. 5, p. 499-511, 2010.

BROWN, A. M.; RANSOM, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. **Glia**, v. 55, n. 12, p. 1263-71, 2007.

BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 229-48, 2014.

CARBONELL, W. S. et al. Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an in situ time-lapse confocal imaging study. **J Neurosci**, v. 25, n. 30, p. 7040-7, 2005.

CASTRO-JUNIOR, C. J. et al. Phalpha1beta toxin prevents capsaicin-induced nociceptive behavior and mechanical hypersensitivity without acting on TRPV1 channels. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 237-46, 2013.

CATTERALL, W. A.; FEW, A. P. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 882-901, 2008.

CHEN, J. J. et al. Intrathecal curcumin attenuates pain hypersensitivity and decreases spinal neuroinflammation in rat model of monoarthritis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10278, 2015.

CLARK, A. K. et al. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. **Eur J Pain**, v. 11, n. 2, p. 223-30, 2007.

CORDEIRO MDO, N. et al. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). **Toxicon**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 1993.

CORDEIRO MDO, N. et al. The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). **FEBS Lett**, v. 310, n. 2, p. 153-6, 1992.

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

COX, J. J. et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 894-8, 2006.

CUDABACK, E. et al. Apolipoprotein E isoform-dependent microglia migration. **Faseb j**, v. 25, n. 6, p. 2082-91, 2011.

CUNHA, T. M.; DIAS, Q. M. Glial modulation of pain: a step beyond. **J Neurosci**, v. 29, n. 11, p. 3340-2, 2009.

D'ASCENZO, M. et al. Electrophysiological and molecular evidence of L - (Cav1), N - (Cav2. 2), and R - (Cav2. 3) type Ca²⁺ channels in rat cortical astrocytes. **Glia**, v. 45, n. 4, p. 354-363, 2004.

DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; TAVARES, J. C.; RAPÔSO, C. Phoneutria nigriventer Venom: Action in the Central Nervous System. In: GOPALAKRISHNAKONE,

P.;CORZO, G. A., *et al* (Ed.). **Spider Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p.175-202. ISBN 978-94-007-6389-0.

DA SILVA, J. F. *et al*. Characterization of the antinociceptive effect of PhTx3-4, a toxin from *Phoneutria nigriventer*, in models of thermal, chemical and incisional pain in mice. **Toxicon**, v. 108, p. 53-61, 2015.

DAVALOS, D. *et al*. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-8, 2005.

DAVIS, B. M. *et al*. Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1576, 2017.

DE CASTRO JUNIOR, C. J. *et al*. Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. **Neurosci Lett**, v. 439, n. 2, p. 170-2, 2008.

DE LEO, J. A.; TAWFIK, V. L.; LACROIX-FRALISH, M. L. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. **Pain**, v. 122, n. 1-2, p. 17-21, 2006.

DE LIMA, M. E. *et al*. *Phoneutria nigriventer* Venom and Toxins: A Review. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.;CORZO, G. A., *et al* (Ed.). **Spider Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p.71-99. ISBN 978-94-007-6389-0.

DE SOUZA, A. H. *et al*. An evaluation of the antinociceptive effects of Phalpha1beta, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*, and omega-conotoxin MVIIA, a cone snail *Conus magus* toxin, in rat model of inflammatory and neuropathic pain. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 1, p. 59-67, 2013.

DE SOUZA, A. H. *et al*. Antiallodynic effect and side effects of Phalpha1beta, a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: comparison with omega-conotoxin MVIIA and morphine. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 626-33, 2011.

DE SOUZA, J. M. *et al*. Animal Toxins as Therapeutic Tools to Treat Neurodegenerative Diseases. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 145, 2018.

DINIZ, D. M. *et al*. Effects of the calcium channel blockers Phalpha1beta and omega-conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 126, p. 97-102, 2014.

DINIZ, M. R. V. *et al*. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0200628, 2018.

DU, S. *et al*. Calcium influx and activation of calpain I mediate acute reactive gliosis in injured spinal cord. **Exp Neurol**, v. 157, n. 1, p. 96-105, 1999.

ELLIS, D. J. *et al*. Continuous Intrathecal Infusion of Ziconotide for Treatment of Chronic Malignant and Nonmalignant Pain Over 12 Months: A Prospective, Open-label Study. **Neuromodulation**, v. 11, n. 1, p. 40-9, 2008.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R. M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. **Trends Immunol**, v. 33, n. 12, p. 579-89, 2012.

ENGELMAN, H. S.; MACDERMOTT, A. B. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 2, p. 135-45, 2004.

FALNIKAR, A. et al. GLT1 overexpression reverses established neuropathic pain-related behavior and attenuates chronic dorsal horn neuron activation following cervical spinal cord injury. **Glia**, v. 64, n. 3, p. 396-406, 2016.

FAULKNER, J. R. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2143-55, 2004.

FEIZERFAN, A.; SHEH, G. Transition from acute to chronic pain. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2014.

FERNANDEZ-ARJONA, M. D. M. et al. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 235, 2017.

FIELDS, R. D. Oligodendrocytes changing the rules: action potentials in glia and oligodendrocytes controlling action potentials. **Neuroscientist**, v. 14, n. 6, p. 540-3, 2008.

FIGUEIREDO, S. G. et al. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 83-93, 1995.

FRY, B. G.; ROELANTS, K.; NORMAN, J. A. Tentacles of venom: toxic protein convergence in the Kingdom Animalia. **J Mol Evol**, v. 68, n. 4, p. 311-21, 2009.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. **J Neurochem**, v. 115, n. 2, p. 505-14, 2010.

GOMEZ, M. V. et al. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. **Cell Mol Neurobiol**, v. 22, n. 5-6, p. 579-88, 2002.

GRABERT, K. et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. **Nat Neurosci**, v. 19, n. 3, p. 504-16, 2016.

GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: immune network in the CNS. **Brain Pathol**, v. 1, n. 1, p. 2-5, 1990.

_____. Microglia: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 89-105, 2010.

GUAN, Z. et al. Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. **Nat Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 94-101, 2016.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1387-94, 2007.

HEINDL, S. et al. Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. **Front Cell Neurosci**, v. 12, p. 106, 2018.

HICKMAN, S. et al. Microglia in neurodegeneration. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1359-1369, 2018.

HIDE, I. et al. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. **J Neurochem**, v. 75, n. 3, p. 965-72, 2000.

IADECOLA, C.; NEDERGAARD, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1369-76, 2007.

IKEDA, H.; KIRITOSHI, T.; MURASE, K. Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat. **Mol Pain**, v. 8, p. 43, 2012.

JHA, M. K.; JEON, S.; SUK, K. Glia as a link between neuroinflammation and neuropathic pain. **Immune network**, v. 12, n. 2, p. 41-47, 2012.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154 Suppl 1, p. S10-28, 2013.

JI, R. R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JI, X. T. et al. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a rat chemotherapy-induced neuropathic pain model. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60733, 2013.

JONAS, R. A. et al. The spider effect: morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30763, 2012.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

KAMBRUN, C. et al. TFAFA4 reverses mechanical allodynia through activation of GABAergic transmission and microglial process retraction. **Cell reports**, v. 22, n. 11, p. 2886-2897, 2018.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of neural science**. McGraw-hill New York, 2000.

- KARLSTETTER, M. et al. Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 125, 2011.
- KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.
- KETTENMANN, H.; RANSOM, B. Neuroglia Oxford. **Oxford Univ. Press**, 2013.
- KNAPP, O.; MCARTHUR, J. R.; ADAMS, D. J. Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: potential analgesics? **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 11, p. 1236-60, 2012.
- KOROTZER, A. R.; COTMAN, C. W. Voltage-gated currents expressed by rat microglia in culture. **Glia**, v. 6, n. 2, p. 81-8, 1992.
- KRISTIPATI, R. et al. Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. **Mol Cell Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 219-28, 1994.
- LALO, U. et al. Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. **PLoS Biol**, v. 12, n. 1, p. e1001747, 2014.
- LATOUR, I. et al. Expression of voltage - gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes. **Glia**, v. 41, n. 4, p. 347-353, 2003.
- LAVAND'HOMME, P. The progression from acute to chronic pain. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 24, n. 5, p. 545-50, 2011.
- LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-70, 1990.
- LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 71-83, 2005.
- LEE, S. M. et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. **J Chem Neuroanat**, v. 45, n. 1-2, p. 45-9, 2012.
- LIN, T. et al. Dissociation of spinal microglia morphological activation and peripheral inflammation in inflammatory pain models. **J Neuroimmunol**, v. 192, n. 1-2, p. 40-8, 2007.
- LIU, F.; YUAN, H. Role of glia in neuropathic pain. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 19, p. 798-807, 2014.
- MACVICAR, B. A.; NEWMAN, E. A. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 5, 2015.

MARIN-TEVA, J. L. et al. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. **Neuron**, v. 41, n. 4, p. 535-47, 2004.

MARRIOTT, D. R.; WILKIN, G. P. Substance P receptors on O-2A progenitor cells and type-2 astrocytes in vitro. **J Neurochem**, v. 61, n. 3, p. 826-34, 1993.

MATAVEL, A. et al. Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6. **FEBS Lett**, v. 523, n. 1-3, p. 219-23, 2002.

MATHIISEN, T. M. et al. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1094-103, 2010.

MCCLESKEY, E. W. et al. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 12, p. 4327-31, 1987.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 3, n. 1, p. 69-85, 2007.

MCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v. 192, n. 2, p. 444-62, 2005.

MCMAHON, S. B.; LA RUSSA, F.; BENNETT, D. L. Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 389-402, 2015.

MCMAHON, S. B.; MALCANGIO, M. Current challenges in glia-pain biology. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 46-54, 2009.

MEI, X. P. et al. Combining ketamine with astrocytic inhibitor as a potential analgesic strategy for neuropathic pain ketamine, astrocytic inhibitor and pain. **Mol Pain**, v. 6, p. 50, 2010.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 32, n. 4, p. 197-200, 1994.

MIRANDA, D. M. et al. Phoneutria nigriventer toxins block tityustoxin-induced calcium influx in synaptosomes. **Neuroreport**, v. 9, n. 7, p. 1371-3, 1998.

MOLLACE, V. et al. The effect of nitric oxide on cytokine-induced release of PGE2 by human cultured astroglial cells. **Br J Pharmacol**, v. 124, n. 4, p. 742-6, 1998.

MORALES, I. et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 112, 2014.

NEHER, J. J. et al. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. **J Immunol**, v. 186, n. 8, p. 4973-83, 2011.

NICOLETTI, N. F. et al. Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. **Toxicon**, v. 129, p. 58-67, 2017.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, 2005.

NODA, M. et al. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 251-8, 2000.

NORTLEY, R.; ATTWELL, D. Control of brain energy supply by astrocytes. **Curr Opin Neurobiol**, v. 47, p. 80-85, 2017.

OHANA, L. et al. The Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. **Channels (Austin)**, v. 3, n. 2, p. 129-39, 2009.

OLD, E. A.; CLARK, A. K.; MALCANGIO, M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 145-70, 2015.

OLIVEIRA, L. C. et al. PnTx4-3, a new insect toxin from *Phoneutria nigriventer* venom elicits the glutamate uptake inhibition exhibited by PhTx4 toxic fraction. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 793-800, 2003.

OLIVERA, B. M. et al. Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. **Biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2086-90, 1987.

OLIVERA, B. M. et al. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1338-43, 1985.

PAN, W. et al. Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 33, p. 3729-40, 2011.

PAOLICELLI, R. C. et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1456-8, 2011.

PARKHURST, C. N. et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. **Cell**, v. 155, n. 7, p. 1596-609, 2013.

PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. **Neurochem Int**, v. 61, n. 4, p. 610-21, 2012.

PAVLOV, V. A.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Molecular and Functional Neuroscience in Immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 36, p. 783-812, 2018.

PEIGNEUR, S.; DE LIMA, M. E.; TYTGAT, J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. **Toxicon**, v. 151, p. 96-110, 2018.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-34, 2005.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 3, p. 483-91, 2016.

PEKNY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 3, p. 323-345, 2016.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 8, p. 421-31, 2009.

PERRY, V. H.; TEELING, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 5, p. 601-12, 2013.

PETKO, M.; ANTAL, M. Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. **J Comp Neurol**, v. 422, n. 2, p. 312-25, 2000.

PETKO, M. et al. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. **J Comp Neurol**, v. 480, n. 4, p. 364-77, 2004.

PIMENTA, A. M. et al. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 19, n. 1, p. 31-7, 2005.

PINHEIRO, A. C. et al. *Phoneutria* spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. **Hippocampus**, v. 19, n. 11, p. 1123-9, 2009.

POMILIO, C. et al. Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in Abeta internalization. **Hippocampus**, v. 26, n. 2, p. 194-210, 2016.

POPE, J. E.; DEER, T. R. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 7, p. 957-66, 2013.

POWELL, E. M.; GELLER, H. M. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. **Glia**, v. 26, n. 1, p. 73-83, 1999.

PROMMER, E. Ziconotide: a new option for refractory pain. **Drugs Today (Barc)**, v. 42, n. 6, p. 369-78, 2006.

QI, J. et al. Crosstalk between Activated Microglia and Neurons in the Spinal Dorsal Horn Contributes to Stress-induced Hyperalgesia. **Sci Rep**, v. 6, p. 39442, 2016.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F. Y.; DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 467-73, 2004.

RAUCK, R. L. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of intrathecal ziconotide in adults with severe chronic pain. **J Pain Symptom Manage**, v. 31, n. 5, p. 393-406, 2006.

REZENDE JUNIOR, L. et al. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v. 29, n. 10, p. 1225-33, 1991.

RIGO, F. K. et al. Spider peptide Phalphi1beta induces analgesic effect in a model of cancer pain. **Cancer Sci**, v. 104, n. 9, p. 1226-30, 2013.

ROMANO-SILVA, M. A. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTX2 and potassium depolarization. **Biochem J**, v. 296 (Pt 2), p. 313-9, 1993.

ROMERO-SANDOVAL, E. A.; HORVATH, R. J.; DELEO, J. A. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 7, p. 726-34, 2008.

ROSA, F. et al. Phalphi1beta, a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer* shows antinociceptive effects after continuous infusion in a neuropathic pain model in rats. **Anesth Analg**, v. 119, n. 1, p. 196-202, 2014.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 775-87, 2011.

SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease. **Nat Med**, v. 23, n. 9, p. 1018-1027, 2017.

SAMAD, T. A. et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-5, 2001.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, 2012.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, 2007.

SHI, L. et al. Formalin-induced spinal glutamate release in freely moving rats: comparison of two spinal microdialysis approaches. **Acta Anaesthesiol Belg**, v. 55, n. 1, p. 43-8, 2004.

SHIGETOMI, E. et al. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 70-80, 2011.

SIERRA, A. et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 4, p. 483-95, 2010.

SILEI, V. et al. Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. **Brain Res**, v. 818, n. 1, p. 168-70, 1999.

SILVA, C. N. et al. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a Phoneutria nigriventer Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. **J Urol**, v. 194, n. 5, p. 1481-90, 2015.

SILVA, F. R. et al. The Phoneutria nigriventer spider toxin, PnTx4-5-5, promotes neuronal survival by blocking NMDA receptors. **Toxicon**, v. 112, p. 16-21, 2016.

SILVA, R. B. M. et al. Beneficial Effects of the Calcium Channel Blocker CTK 01512-2 in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 12, p. 9307-9327, 2018.

SIMARD, M.; NEDERGAARD, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 877-96, 2004.

SMITH, H. S.; DEER, T. R. Safety and efficacy of intrathecal ziconotide in the management of severe chronic pain. **Ther Clin Risk Manag**, v. 5, n. 3, p. 521-34, 2009.

SMITHSONIAN.COM. Why Walking on Legos Hurts More Than Walking on Fire or Ice. 11/13/2018 2018. Disponível em: < <https://www.smithsonianmag.com/science-nature/why-walking-legos-hurts-more-walking-fire-or-ice-180970784/> >. Acesso em: 02/15/2019.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

SONTHEIMER, H. Voltage-dependent ion channels in glial cells. **Glia**, v. 11, n. 2, p. 156-72, 1994.

SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 1081-3, 2015.

SOUZA, A. H. et al. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. **Pain**, v. 140, n. 1, p. 115-26, 2008.

STAATS, P. S. et al. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. **Jama**, v. 291, n. 1, p. 63-70, 2004.

STEBBING, M. J.; COTTEE, J. M.; RANA, I. The Role of Ion Channels in Microglial Activation and Proliferation—A Complex Interplay between Ligand-Gated Ion

Channels, K⁺ Channels, and Intracellular Ca²⁺. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 497, 2015.

STEVENS, B. Glia: much more than the neuron's side-kick. **Curr Biol**, v. 13, n. 12, p. R469-72, 2003.

STEVENS, B. et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1164-78, 2007.

SUTER, M. R. et al. Do glial cells control pain? **Neuron Glia Biol**, v. 3, n. 3, p. 255-68, 2007.

SVENSSON, C. I. et al. Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. **J Neurochem**, v. 92, n. 6, p. 1508-20, 2005.

TAKAHASHI, T.; MOMIYAMA, A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. **Nature**, v. 366, n. 6451, p. 156, 1993.

TAKIZAWA, M. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 channels are involved in spontaneous peptide hormone release from astrocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 501, n. 4, p. 988-995, 2018.

TAKUMA, K. et al. Role of Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in agonist-induced Ca²⁺ signaling in cultured rat astrocytes. **J Neurochem**, v. 67, n. 5, p. 1840-5, 1996.

TALBOT, S.; FOSTER, S. L.; WOOLF, C. J. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. **Annu Rev Immunol**, v. 34, p. 421-47, 2016.

TANGA, F. Y.; RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem Int**, v. 45, n. 2-3, p. 397-407, 2004.

TAYLOR, D. L.; DIEMEL, L. T.; POCOCK, J. M. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. **J Neurosci**, v. 23, n. 6, p. 2150-60, 2003.

THOMSON, C. A. et al. Peripheral inflammation is associated with remote global gene expression changes in the brain. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 73, 2014.

TIPPENS, A. L. et al. Ultrastructural evidence for pre- and postsynaptic localization of Cav1.2 L-type Ca²⁺ channels in the rat hippocampus. **J Comp Neurol**, v. 506, n. 4, p. 569-83, 2008.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 12, p. 823-36, 2010.

TOKUHARA, N. et al. N-type calcium channel in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 33294-306, 2010.

TONCHEV, A. B. et al. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. **Glia**, v. 42, n. 3, p. 209-24, 2003.

TONELLO, R. et al. The peptide Phalpha1beta, from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 1, p. 57-69, 2017.

TONELLO, R. et al. Action of Phalpha1beta, a peptide from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the analgesic and adverse effects caused by morphine in mice. **J Pain**, v. 15, n. 6, p. 619-31, 2014.

TORRES, F. S. et al. Functional expression of a recombinant toxin - rPnTx2-6 - active in erectile function in rat. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1172-80, 2010.

TOTH, A. et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 135, n. 1-2, p. 162-8, 2005.

TREMBLAY, M. E.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biol**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2010.

TREMBLAY, M. E.; MAJEWSKA, A. K. A role for microglia in synaptic plasticity? **Commun Integr Biol**, v. 4, n. 2, p. 220-2, 2011.

TREMBLAY, M. E. et al. The role of microglia in the healthy brain. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16064-9, 2011.

TSUDA, M. et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 778-83, 2003.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

VERKHRATSKY, A.; KETTENMANN, H. Calcium signalling in glial cells. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 346-52, 1996.

VERKHRATSKY, A.; REYES, R. C.; PARPURA, V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 166, p. 1-22, 2014.

VERKHRATSKY, A.; STEINHAUSER, C. Ion channels in glial cells. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 32, n. 2-3, p. 380-412, 2000.

VIDAL-TORRES, A. et al. Evaluation of formalin-induced pain behavior and glutamate release in the spinal dorsal horn using in vivo microdialysis in conscious rats. **J Pharmacol Sci**, v. 120, n. 2, p. 129-32, 2012.

VIEIRA, L. B. et al. Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 3, p. 1370-7, 2005.

WAKE, H. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **J Neurosci**, v. 29, n. 13, p. 3974-80, 2009.

WALDBURGER, J. M.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by the central nervous system. **Curr Rheumatol Rep**, v. 12, n. 5, p. 370-8, 2010.

WANNER, I. B. et al. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 33, n. 31, p. 12870-86, 2013.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 201-5, 2001.

WATSON, C.; PAXINOS, G.; KAYALIOGLU, G. **The spinal cord: a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas**. Academic press, 2009. ISBN 0080921388.

WEI, F. et al. Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. **J Neurosci**, v. 28, n. 42, p. 10482-95, 2008.

WESTENBROEK, R. E. et al. Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia. **J Neurosci**, v. 18, n. 7, p. 2321-34, 1998.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000.

XU, C. et al. Oxidative stress induces stem cell proliferation via TRPA1/RyR-mediated Ca(2+) signaling in the Drosophila midgut. **Elife**, v. 6, 2017.

XU, F. et al. Complete Freund's adjuvant-induced acute inflammatory pain could be attenuated by triptolide via inhibiting spinal glia activation in rats. **J Surg Res**, v. 188, n. 1, p. 174-82, 2014.

XU, J. et al. NFkappaB-mediated CXCL1 production in spinal cord astrocytes contributes to the maintenance of bone cancer pain in mice. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 38, 2014.

XU, Q.; YAKSH, T. L. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 24, n. 4, p. 400-7, 2011.

XU, Z. Z. et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nat Med**, v. 16, n. 5, p. 592-7, 1p following 597, 2010.

YAMADA, J.; SAWADA, M.; NAKANISHI, H. Cell cycle-dependent regulation of kainate-induced inward currents in microglia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 349, n. 3, p. 913-9, 2006.

ZAMPONI, G. W. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 1, p. 19-34, 2016.

ZAMPONI, G. W. et al. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 84-9, 2009.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, 1983.