

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LÍVIA MARIA SILVESTRE ELISEI

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRANSIENTE DO POTENCIAL
VANILÓIDE 1, RECEPTOR TOLL LIKE 4 EM CÉLULAS GLIAIS TALÂMICAS
DURANTE A DOR NEUROPÁTICA**

Alfenas/MG

2023

LÍVIA MARIA SILVESTRE ELISEI

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRANSIENTE DO POTENCIAL
VANILÓIDE 1, RECEPTOR TOLL LIKE 4 EM CÉLULAS GLIAIS TALÂMICAS
DURANTE A DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
Área de concentração: Fisiologia e farmacologia da dor.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino

Alfenas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Elisei, Lívia Maria Silvestre.

Avaliação da participação do receptor transiente do potencial vanilóide 1, receptor Toll like 4 em células gliais talâmicas durante a dor neuropática / Lívia Maria Silvestre Elisei. - Alfenas, MG, 2023.

114 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino Souza.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Tálamo ventrobasal. 2. Micróglia,. 3. Astrócitos. 4. TLR4. 5. TNF α . I. Souza, Giovane Galdino, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LÍVIA MARIA SILVESTRE ELISEI

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE DO TIPO 1 E TOLL LIKE 4 E CÉLULAS GLIAIS TALÂMICAS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da Dor

Aprovada em: 04 de Julho de 2023.

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza
Instituição: Centro Universitário de Patos de Minas
UNIPAM

Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso Moura
Instituição: Universidade Federal do Amazonas
UFAM

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ

Prof. Dr. Flávio de Protasio Veras
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 04/07/2023, às 12:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Guimarães Marinho, Usuário Externo**, em 06/07/2023, às 19:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1023590** e o código CRC **19785304**.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer à UNIFAL-MG, minha segunda casa desde 2012, a todos os membros da Pró Reitoria de Pós-graduação, à biblioteca da Unifal-MG, bem como ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

Com carinho, dedico esse trabalho a todos os meus amigos de laboratório que me ajudaram e ajudam em todos os sentidos, pela companhia do dia a dia, pelas risadas e por compartilhar a vida comigo, é um privilégio ter essas amizades.

Aos animais, minha eterna gratidão e respeito por cada vida sacrificada em prol da ciência e do conhecimento. Aos funcionários da limpeza e secretários pelo zelo e empenho no cuidado do ambiente de trabalho.

Aos meus pais por terem se sacrificado para poder me proporcionar o melhor na vida, sempre com o pé no chão, a cabeça erguida, amor incondicional e perseverança, também por me ensinarem o respeito, a humildade e a educação, independente do lugar e hora. Aos meus irmãos pelo exemplo e a todos os familiares e demais amigos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui hoje.

Em especial, a minha eterna gratidão ao meu amor, meu companheiro de vida e meu filho de quatro patas que me ajudaram durante todos os dias, incansavelmente, com amor, carinho, respeito e paciência.

RESUMO

As células gliais estão envolvidas em diversas dores crônicas, incluindo a dor neuropática (DN). Elas potencializam as descargas neuronais oriundas da lesão periférica no tálamo, por meio do aumento na expressão de receptores que ativam cascatas de sinalização intracelulares, com consequente síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, o presente estudo investigou a participação das células gliais frente a ativação dos receptores TLR4 (receptor *Toll like 4*) e TRPV₁ (receptor transiente do potencial vanilóide 1) e da via MAPK p38 (mapquinase p38)/NFκB (fator nuclear kappa B) no tálamo ventrobasal de camundongos com DN. Para tal, foram utilizados camundongos C57BL6 machos e a injúria por constrição crônica (CCI) foi utilizada para induzir alodinia mecânica. A avaliação da coordenação motora de animais neuropáticos após tratamento com inibidores farmacológicos foi realizada no 14^o dia de neuropatia por meio do teste rota rod. Examinamos a participação das células da glia, dos receptores TLR4 e TRPV₁, MAPK p38 e do NFκB na manutenção da alodinia mecânica no tálamo de animais com 14 dias de neuropatia. O tálamo foi extraído a fim de analisar a expressão e síntese proteica de marcadores gliais, Iba1 (molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1), TMEM119 (proteína transmembrana 119) e GFAP (proteína glial fibrilar ácida), dos receptores TLR4 e TRPV₁ e da via MAPK p38 utilizando a técnica de Western Blot e RT-PCR, bem como, os níveis de citocinas TNFα e IL1β por meio do ELISA. A ativação do TLR4 em células da glia em animais neuropáticos também foi examinada no tálamo por meio da imunofluorescência. Como resultado, as microinjeções administradas no tálamo ventrobasal contralateral à lesão por CCI, reduziram significativamente a alodinia mecânica sem alterações motoras. A expressão e síntese proteica aumentada para Iba1/TMEM119, GFAP e TLR4 foram demonstradas no tálamo ventrobasal, após 14 dias de CCI, com aumento dos níveis de TNFα, corroborando com a co-localização entre marcadores gliais e o TLR4. Sendo assim, sugerimos que as células da glia tem determinante participação na neuromodulação da dor neuropática à nível talâmico por meio da ativação do receptor TLR4, permitindo o NFκB a transcrição gênica para a produção de TNFα a qual contribui para o estado persistente de dor.

Palavras-chave: tálamo ventrobasal; micróglia, astrócitos; TLR4; TNFα.

ABSTRACT

Glial cells are involved in several chronic pains, including neuropathic pain (NP). They potentiate neuronal discharges arising from peripheral injury in the thalamus, by increasing the expression of receptors that activate intracellular signaling cascades, with consequent synthesis and release of pro-inflammatory cytokines. Thus, the present study investigated the participation of glial cells in the activation of TLR4 (Toll-like receptor 4) and TRPV1 (transient receptor of vanilloid potential 1) receptors and the MAPK p38 (p38 mapkinase)/NF κ B (nuclear factor kappa B) pathway in the ventrobasal thalamus of mice with NP. For this, male C57BL6 mice were used, and chronic constriction injury (CCI) was used to induce mechanical allodynia. The evaluation of the motor coordination of neuropathic animals after treatment with pharmacological inhibitors was performed on the 14th day of neuropathy using the rota rod test. We examined the participation of glial cells, TLR4 and TRPV1 receptors, MAPK p38 and NF κ B in the maintenance of mechanical allodynia in the thalamus of animals with 14 days of neuropathy. The thalamus was extracted to analyze the expression and protein synthesis of glial markers, Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), TMEM119 (transmembrane protein 119) and GFAP (glial fibrillary acidic protein), of the TLR4 and TRPV1 receptors and of the p38 MAPK pathway using the Western Blot and RT-PCR technique, as well as the levels of TNF α and IL1 β cytokines through ELISA. TLR4 activation in glial cells from neuropathic animals was also examined in the thalamus by means of immunofluorescence. As a result, manipulated microinjections in the ventrobasal thalamus contralateral to the CCI lesion significantly reduced mechanical allodynia without motor changes. Increased expression and protein synthesis for Iba1/TMEM119, GFAP and TLR4 were demonstrated in the ventrobasal thalamus, after 14 days of CCI, with increased levels of TNF α , corroborating the co-localization between glial markers and TLR4. Therefore, we suggest that glial cells play a decisive role in the neuromodulation of neuropathic pain at the thalamic level through activation of the TLR4 receptor, allowing NF κ B gene transcription to produce TNF α , which contributes to the persistent state of pain.

Keywords: ventrobasal thalamus; microglia, astrocytes; TLR4; TNF α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fibras aferentes nociceptivas e suas características.....	20
Figura 2	Via ascendente da dor.....	22
Figura 3	Neuromodulação da dor pelas células gliais.....	29
Figura 4	Projeções neuronais nociceptivas ascendentes e suas interconexões.....	31
Figura 5	Vias de ativação do receptor TLR4.....	34
Figura 6	Vias de ativação do receptor TRPV ₁	36
Figura 7	Modelo experimental de injúria por constrição crônica.....	42
Figura 8	Cirurgia de estereotaxia.....	43
Figura 9	Aparelho estereotático.....	44
Figura 10	Coordenadas estereotáticas do tálamo ventrobasal.....	46
Figura 11	Administração intratálâmica.....	47
Figura 12	Filamentos de von Frey e suporte.....	49
Figura 13	Aparelho Rota rod.....	50
Figura 14	Delineamento experimental da avaliação da alodinia mecânica durante a DN.....	51
Figura 15	Delineamento experimental das avaliações da alodinia mecânica durante a DN após inibição farmacológica.....	52
Figura 16	Delineamento experimental para avaliação da coordenação motora.....	54
Figura 17	Delineamento experimental para experimentos moleculares RT-PCR, Western Blot, Imunofluorescência e ELISA.....	55
Figura 18	Sítios de microinjeção intratálâmica de substâncias no tálamo	76
Figura 19	Imunomarcagem de células gliais e TLR4 no tálamo ventrobasal durante a dor neuropática.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Avaliação do limiar nociceptivo durante a DN.....	64
Gráfico 2	Avaliação da coordenação motora após estereotaxia.....	65
Gráfico 3	Avaliação da participação da micróglia talâmica durante a DN..	66
Gráfico 4	Avaliação da participação de astrócitos talâmicos durante a DN.....	67
Gráfico 5	Avaliação da participação do TLR4 talâmico durante a DN.....	69
Gráfico 6	Avaliação da participação do TRPV ₁ talâmico durante a DN.....	70
Gráfico 7	Avaliação da participação da via MAPK P38 talâmica durante a DN.....	72
Gráfico 8	Avaliação da participação do NFκB talâmico durante a DN.....	73
Gráfico 9	Avaliação da coordenação motora de animais com DN após inibição farmacológica intratalâmica	75
Gráfico 10	Avaliação da expressão gênica de células gliais e dos receptores TLR4 e TRPV ₁ durante a DN.....	84
Gráfico 11	Quantificação da expressão proteica de células gliais no tálamo durante a DN.....	85
Gráfico 12	Quantificação da expressão proteica de receptores TLR4 e TRPV ₁ no tálamo durante a DN.....	86
Gráfico 13	Quantificação da expressão proteica de MAPK p38 fosforilada no tálamo durante a DN.....	87
Gráfico 14	Avaliação dos níveis de citocinas pró inflamatórias no tálamo durante a DN.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados para a quantificação de proteínas pela técnica de Western Blot.....	57
Tabela 2	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação pela RT-PCR	59
Tabela 3	Anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AMPAR	Receptor α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Soro de albumina bovina
CCA	Córtex cingulado anterior
CD14	Cluster de diferenciação 14
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CEUA	Comitê de ética em uso animal
CFA	Completo adjuvante de Freund
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Dor neuropática
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima desoxiribonuclease
DNTP	Desoxitimidina trifosfatada
DTT	Ditiotreitol
E.P.M	Erro padrão da média
ECL	Quimiluminescência aprimorada
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
FC	Fluorocitrato
FRI-5	Fator regulador de intérferon 5
GFAP	Proteína fibrilar glial ácida
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HRP	Peroxidade de rábano
IgG	Imunoglobulina
i.m	Intramuscular
i.p	Intraperitoneal

IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
Iba1	Molécula adaptadora ionizada de ligação ao cálcio 1
IL1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
JAK	Proteína Janus quinase
JNK	Proteína quinase terminal c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
LPS-RS	Lipopolissacarídeo da <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
LTP	Potenciação de longo prazo
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MB	Medida basal
MD-2	Fator de diferenciação mielóide 2
ME	Medula espinal
MED1	Complexo mediador da subunidade 1
MGnD/DAM	Fenótipo microglial ligado às doenças neurodegenerativas
MINO	Minociclina
Myd88	Proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88
NF κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NK1R	Receptor de neurocinina 1
NLRP	Domínio pirina da família NLR
NMDAR	Receptor de N-metil D-Aspartato
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO	Óxido nítrico
P.O	Pós-operatório
p38	Proteína 38
PA-1	Proteína adaptadora 1
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PDTC	Ditiocarbamato de pirrolidina
PE-10	Polietileno 10
PGE	Prostaglandina
PGI	Fosfoglicose isomerase
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
P-p38	Proteína p38 fosforilada
RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação

RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RTX	Resiniferatoxina
s.c	Subcutâneo
SB366791	N-(3- <i>Metoxifenil</i>)-4-clorocinamida
SCP	Substância cinzenta periaqueductal
SDHA	Subunidade A da flavoproteína do complexo succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SML0540	Oxifenbutazona
SNC	Sistema Nervoso Central
SNI	Lesão nervosa poupada
STAT	Proteína transdutora de sinal e ativador da transcrição
TAK1	Proteína quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador- β
TBS-T	Solução Tris salina com tween 20
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio do receptor de interleucina-1 <i>Toll</i> ;
TLR	Receptores do tipo <i>Toll like</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TMEM119	Proteína transmembrana 119
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRAM	Proteína de membrana associada à cadeia de translocação
TRIF	Proteína adaptadora de interferon- β contendo domínio do receptor de interleucina-1
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRPV ₁	Receptor transiente do potencial vanilóide 1
TR κ B	Tirosina quinase <i>kappa B</i>
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
Vec	Veículo

VPL

Núcleo ventropóstero lateral do tálamo

VPM

Núcleo ventropóstero medial do tálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
2.2	DOR NEUROPÁTICA.....	24
2.2.1	Patologia da dor neuropática periférica.....	26
2.3	CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA.....	27
2.4	TÁLAMO E DOR.....	31
2.5	RECEPTORES TLR4 E TRPV ₁ E A VIA MAPKp38/NFκB.....	34
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO.....	41
4.3	CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA.....	43
4.4	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	45
4.4.1	<i>Via intraperitoneal.....</i>	<i>45</i>
4.4.2	<i>Via intratalâmica.....</i>	<i>46</i>
4.4.3	<i>Substâncias utilizadas no estudo.....</i>	<i>47</i>
4.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	49
4.5.1	<i>Avaliação da alodinia mecânica.....</i>	<i>49</i>
4.5.2	<i>Avaliação da coordenação motora.....</i>	<i>50</i>
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
4.7	ENSAIOS MOLECULARES.....	56
4.7.1	<i>Quantificação de proteínas pela técnica de Western Blot.....</i>	<i>57</i>
4.7.2	<i>Quantificação da expressão gênica de RNAm pela técnica de RT-PCR.....</i>	<i>59</i>
4.7.3	<i>Localização de células da glia e de receptores TLR4 no tálamo durante a dor neuropática.....</i>	<i>60</i>
4.7.4	<i>Quantificação dos níveis talâmicos de citocinas pró inflamatórias</i>	

	<i>por meio do ELISA.....</i>	62
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	RESULTADOS.....	64
5.1	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO APÓS INDUÇÃO DE DOR NEUROPÁTICA.....	64
5.2	AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA APÓS ESTEREOTAXIA.....	65
5.3	ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	66
5.4	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TLR4 NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	68
5.5	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPV ₁ NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	70
5.6	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA MAPK P38 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA.....	72
5.7	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO NF κ B NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	73
5.8	ANÁLISE DA COORDENAÇÃO MOTORA APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRATALÂMICA DE SUBSTÂNCIAS.....	75
5.9	ANÁLISE DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO TÁLAMO.....	76
5.10	ENVOLVIMENTO DE GENES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS DA GLIA, RECEPTORES TLR4 E TRPV1 NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	84
5.11	ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS DA GLIA NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	85
5.12	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 E TRPV1 NO TÁLAMO.....	87
5.13	ENVOLVIMENTO DA VIA MAPK P38 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA.....	88
5.14	CO-LOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS DA GLIA E DO TLR4 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA.....	89
5.15	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ	

	INFLAMATÓRIAS NO TÁLAMO DURANTE A DN.....	93
6	DISCUSSÃO.....	95
7	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o estudo da dor (IASP), a DN é uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (Raja *et al.*, 2020), a qual gera uma sequência de eventos neurobiológicos adaptativos na tentativa de reparo da lesão e os conduz a um quadro de dor crônica (Yang; Chang, 2019).

Diversas doenças podem levar a manifestação de sintomas característicos de DN, as doenças metabólicas e neurodegenerativas, traumas e acidentes, tumores compressivos e acidentes vasculares encefálicos são exemplos a serem elencados. A DN evoca sinais e sintomas diversos, dentre eles, alodinia (dor oriunda de um estímulo inócuo), hiperalgesia (exacerbação da sensação dolorosa por um estímulo que já causa dor) entre outros que, muitas vezes, são incapacitantes e difíceis de tratar devido a multifatoriedade existente no quadro clínico (Finnerup; Jensen; Kuner, 2021). Um estudo realizado no Brasil revela que a DN é capaz de afetar cerca de 14,5% de pessoas com possível diagnóstico (Udall *et al.*, 2019).

Após a lesão do nervo periférico, mediadores pró inflamatórios são liberados oriundos de vasos rompidos, de células imunes e por meio da degeneração neuronal. Esses mediadores pró infamatórios contribuem para o desequilíbrio do potencial de membrana do neurônio aferente primário, com conseqüente deflagração de potencial de ação, o qual será conduzido pelo axônio do neurônio aferente primário até o corno dorsal da medula espinal (CDME) (Milligan; Watkins, 2009).

O estímulo elétrico ascenderá contralateralmente pelo axônio até o tálamo, especificamente nos núcleos ventral póstero medial (VPM) e ventral póstero lateral (VPL), em conjunto conhecidos como tálamo ventrobasal até o córtex somatossensorial para, então, o estímulo ser percebido e interpretado como dor (López-Bendito, 2018).

Esse processo, chamado de sensibilização central, pode tornar-se crônico quando as entradas sensoriais não cessam com o tempo e mudanças no processamento bioquímico e neuronal acontecem de modo a facilitar a dor, o qual tem sido observado em modelos de neuropatia no tálamo, córtex pré-frontal e amígdala (Alonso-Calviño *et al.*, 2016; Banati, 2002; Giardini *et al.*, 2017; Leblanc *et al.*, 2011;

Mannelli *et al.*, 2013; Taylor, *et al.*, 2017; Zhao; Waxman; Hains, 2007; Yu *et al.*, 2023; Zhao; Waxman; Hains, 2007).

Com isso, a redução do limiar de excitabilidade neuronal, o aumento da expressão de canais iônicos, receptores e neurotransmissores excitatórios ocorre (Colloca *et al.*, 2017). Em conjunto, as células gliais podem ser ativadas e se tornarem reativas, desenvolvendo um fenótipo pró-inflamatório por meio do aumento da expressão de receptores de membrana, como por exemplo o receptor Toll like 4 (TLR4) e o receptor transiente do potencial vanilóide 1 (TRPV₁) (Bettoni *et al.*, 2008; Meza *et al.*, 2022; Walters, 2014).

Análogo a esse raciocínio, estudos prévios da literatura mostram a participação da via p38 ativada por mitógeno (MAPK p38) no tálamo de animais com DN (Ji *et al.*, 2009; Ji; Suter, 2007; Leblanc *et al.*, 2011), culminando na síntese de proteínas para citocinas pró-inflamatórias, por meio do fator nuclear kappa B (NFκB) (Takeda; Akira, 2004; Yoshida *et al.*, 2016), porém, as evidências apontando por quais receptores essa via é ativada não são elucidadas.

Sendo assim, investigar a participação das células gliais, bem como os receptores TLR4 e TRPV₁ e a via MAPK p38 no tálamo de camundongos com dor neuropática torna-se o objetivo do presente estudo, pois a elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais essas células contribuem para a DN auxiliará no desenvolvimento futuro de novas estratégias de tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Abaixo está detalhadamente descrita a revisão de literatura:

2.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor é um mecanismo evolutivo de defesa que tem como objetivo nos alertar sobre possíveis lesões/doenças em nosso corpo. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês a sigla *International Association Study of Pain*) restabelece o conceito de dor como sendo uma “experiência sensitiva e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos de tal lesão” (Raja *et al.*, 2020).

Para além do conceito de dor propriamente dito, devemos considerar os aspectos biopsicossociais de cada indivíduo e tratá-la com seriedade, pois a dor não é apenas determinada pela lesão ou doença, mas sim pelas experiências emocionais, socioculturais e ambientais adquiridas por toda a vida (Raja *et al.*, 2020). Além disso, o fato de não haver verbalização ou demonstração de dor, não significa que o indivíduo/animal não a experiencie (Santana *et al.*, 2020).

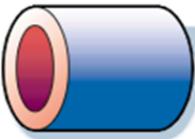
Ao falarmos de dor, cujo entendimento é complexo e subjetivo, precisamos abordar também o conceito de nocicepção. A nocicepção é definida pela IASP como um processo neural de codificação de estímulos nocivos, a qual fornece um meio de *feedback* neural que permite que o Sistema Nervoso Central (SNC) detecte e evite estímulos nocivos e potencialmente prejudiciais (Millan, 1999; Woolf; Ma, 2007).

Para permitir a decodificação de estímulos reais ou potencialmente lesivos, existem estruturas sensoriais nervosas na pele, órgãos e todo o corpo. Elas são denominadas terminações nervosas livres não especializadas; ou seja, com velocidade de condução lenta, a qual iniciam a sensação de dor e são denominadas também de nociceptores (Dubin; Patapoutian, 2010; Julius; Basbaum, 2001).

Os axônios que conduzem o impulso elétrico da terminação receptora desse sinal até o botão sináptico primário originam as fibras nociceptivas. As fibras nociceptivas como as fibras C, são responsáveis por estímulos nociceptivos

mecanotérmicos e químicos além de temperatura inócua e coceira, sendo caracterizada como uma fibra de baixa velocidade de condução (Dubin; Patapoutian, 2010; Julius; Basbaum, 2001). Já as outras são mielinizadas e de velocidade rápida, como as fibras $A\alpha$, são caracterizadas por reconhecer estímulos proprioceptivos e toque leve, as $A\beta$ que reconhecem estímulos do tipo mecanotérmicos. Por fim, as fibras $A\delta$ especializadas em reconhecer estímulos nociceptivos do tipo calor, frio e informações mecanotérmicas da pele, como mostra a figura 1 (Chen; Abdi, 2022; Dubin; Patapoutian, 2010; Julius; Basbaum, 2001).

Figura 1 — Fibras aferentes nociceptivas e suas características

		Limiar térmico
	Fibras $A\alpha$ e $A\beta$ Mielinizada Largo diâmetro Propriocepção e toque leve	Não possui
	Fibras $A\delta$ Levemente mielinizada Médio diâmetro Nocicepção (térmica, mecânica e química)	~ 53°C Tipo I ~ 43°C Tipo II
	Fibras do tipo C Amielinizada Pequeno diâmetro Temperatura inócua, coceira Nocicepção (térmica, mecânica e química)	~ 43°C

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

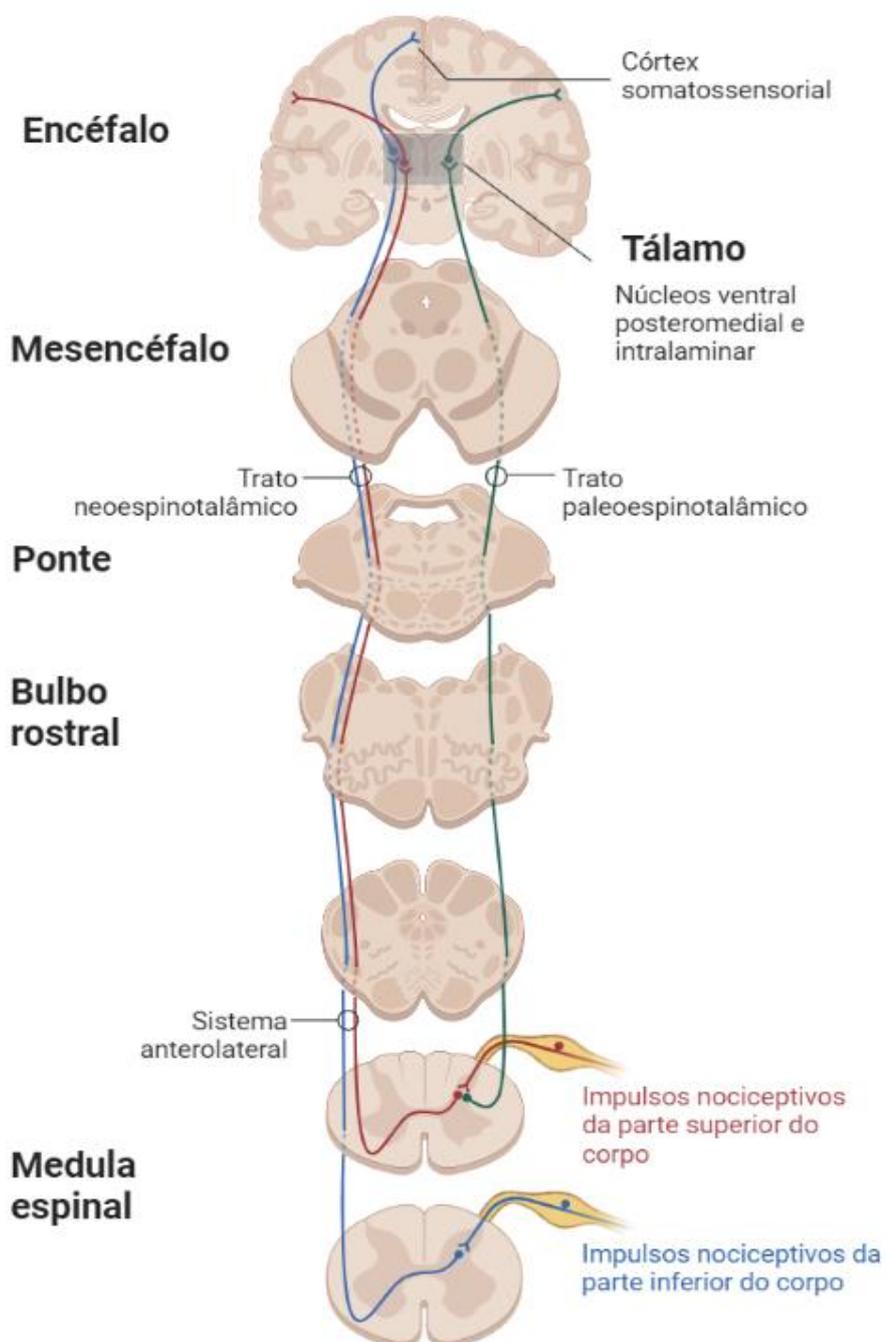
Com isso, os estímulos químicos liberados por células imunes ativas na periferia, seja por lesão, inflamação etc., são detectados por meio da ativação desses receptores sensoriais de dor. Estes receptores, por sua vez, são responsáveis por transduzirem o sinal químico em impulso elétrico. O impulso elétrico então é conduzido pelo axônio da fibra nociceptiva até alcançar o corpo neuronal do neurônio

aferente primário, presente no gânglio da raiz dorsal (GRD) ou na raiz do nervo trigêmeo, seguindo a condução do impulso elétrico até o botão sináptico no corno dorsal da medula espinhal (CDME) (Basbaum, 2009; Woolf, 2007).

No CDME, as fibras chegam de maneira amplamente organizada, sendo que as fibras A δ terminam seu trajeto nas lâminas I e V, e as fibras C, nas lâminas I, II e V do CDME, com isso a modulação do impulso, bem como o cruzamento de vias ocorre, culminando na união de fibras ascendentes do sistema anterolateral. Assim, os tratos espinotalâmicos se prolongam para os centros supra espinais de processamento da dor (núcleo ventropóstero medial e ventropóstero lateral do tálamo – VPM e VPL) e o tronco cerebral (Ab Aziz; Amad, 2006; Almeida; Roizenblatt; Tufik, 2004; Woolf; Ma, 2007).

Os axônios do tálamo se estendem e fazem sinapse com neurônios aferentes terciários para várias estruturas corticais como o córtex somatossensorial, e esta última, dá características a esse estímulo, como percepção, intensidade e localização da dor (Ab Aziz; Amad, 2006; Almeida; Roizenblatt; Tufik, 2004; Ma; Woolf, 2007) (FIGURA 2).

Figura 2 — Via ascendente da dor



Fonte: da autora.

Nota: Via ascendente demonstrando os impulsos nociceptivos oriundos da parte superior (linha vermelha) e inferior (linha azul) do corpo, os quais alcançam o corno dorsal da medula espinal e realiza uma sinapse com o neurônio aferente secundário. O impulso ascende contralateralmente pelo sistema anterolateral até centros superiores, passando pelo tálamo (núcleos ventral posteromedial, posterolateral e intralaminar), realizando outra sinapse com neurônio aferente terciário, transmitindo o impulso até o córtex somatossensorial, além de outras áreas responsáveis pelo aspecto afetivo-cognitivo da dor.

2.2 DOR NEUROPÁTICA

A DN é classificada entre dor neuropática periférica, sendo àquela lesão ou doença que atinge o Sistema Nervoso Periférico (SNP) e a dor neuropática central, a qual acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) (Bielewicz *et al.*, 2023; Colloca *et al.*, 2017; Finnerup; Jensen; Kuner, 2021).

Maus hábitos de vida, como sedentarismo, estresse, má alimentação, má qualidade do sono e excesso de horas trabalhadas, oriundos da vida frenética, levam a piora da qualidade de vida, ansiedade, depressão, além do aumento nos gastos com saúde pública (Attal *et al.*, 2011; Finnerup; Jensen; Kuner, 2021; Smith; Torrance, 2012).

Associado a isso, o aumento da expectativa de vida está conduzindo a população ao envelhecimento, conseqüentemente, problemas crônicos de saúde surgem, como por exemplo a DN. Indivíduos com doenças metabólicas, vasculares e neurodegenerativas, além de sarcopenia, quedas, fraturas e outros inúmeros acometimentos podem desenvolver sintomas de DN e afetar milhões de pessoas no mundo, sendo, portanto, importante entender e tratar essa doença (Finnerup; Jensen; Kuner, 2021).

Diversas doenças têm como principal diagnóstico clínico a dor neuropática e dentre elas estão a polineuropatia dolorosa, acidente vascular encefálico (AVE), traumas medulares, doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla, vírus como a neuralgia pós herpética, amputação, compressão nervosa, cirurgias, dentre outras (Finnerup; Jensen; Kuner, 2021).

Dados epidemiológicos sugerem que a lesão da medula espinhal leva a 50% dos pacientes apresentar dor neuropática, enquanto a lesão do nervo periférico está associada a aproximadamente 73% (Bielewicz *et al.*, 2023). Nos EUA cerca de 20 milhões de indivíduos sofrem com dor neuropática crônica que, por vezes, afeta a qualidade de vida (Finnerup *et al.*, 2015). Uma revisão sistemática verificou que cerca de 6,9 a 10% da população geral sofre com dor neuropática no mundo, porém, essas taxas podem ser subestimadas devido à falta de padrões diagnósticos eficientes para tal (Smith, 2018).

Pesquisas são unânimes em dizer que a dor neuropática está associada a problemas de saúde física, psicológica e social (Smith; Torrance, 2012). Em adição, os indivíduos que sofrem de DN frequentam as unidades de saúde e de serviços especializados mais vezes do que os não acometidos, além de apresentarem problemas de sono, ansiedade e depressão (Attal *et al.*, 2011; Smith; Torrance 2012).

Alguns sintomas como queimação, pontada, picada, alfinetadas, aperto ou congelamento podem aparecer. A dor nesses indivíduos pode ser evocada, ou seja, provocada por algum estímulo inócuo, como por exemplo o toque leve ou frio não intenso, sintoma denominado alodinia. Ela também pode ser evocada a partir de um estímulo normalmente doloroso (hiperalgesia) como estímulos mecânicos ou térmicos e, pode ainda ocorrer na ausência desses casos (Bielewicz *et al.*, 2023; Colloca *et al.*, 2017).

Outras características como a dor espontânea, que é àquela dor observada sem estímulo sensorial externo com sensação de choque elétrico também podem ser observadas. Ambas as manifestações espontânea e evocada podem ser contínuas ou intermitentes podendo trazer sintomas anormais como disestesia (sensação não dolorosa anormal e desagradável), hiperpatia (uma reação dolorosa anormal e explosiva com um limiar aumentado frente à um estímulo repetitivo) e dor referida (sensações dolorosas ou não dolorosas em áreas adjacentes à área de origem da dor) (Finnerup; Jensen; Kuner, 2021).

Existe um desafio em estabelecer ferramentas de diagnóstico eficazes para mapear a população acometida, a fim de traçar estratégias específicas de tratamento devido à complexidade e a infinidade de manifestações clínicas (Bielewicz *et al.*, 2023; Smith; Torrance, 2012). Por isso, a DN não deve ser tratada de maneira simplista e generalizada.

O Grupo de Interesse Especial em Dor Neuropática da IASP realizou uma revisão sistemática de estratégias medicamentosas para o tratamento da dor neuropática. Dentre eles estão os inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN's), antidepressivos tricíclicos e antiepiléticos como a gabapentina e pregabalina (primeira linha de tratamento), lidocaína, capsaicina e tramadol (segunda linha) e opioides fortes (terceira linha de tratamento) (Murnion, 2018).

Apesar de haver uma infinidade de medicamentos para o tratamento da DN, a maioria deles podem causar dependência e tolerância ao longo do tempo de uso, além

de efeitos colaterais como o aumento no risco de quedas, fadiga, interação medicamentosa, visto que a maioria desses indivíduos possuem comorbidades e tomam outras medicações (Murnion, 2018).

A fim de alcançar um tratamento efetivo da DN devem ser identificados os mecanismos essenciais ao longo do trajeto, ou seja, é necessária a compreensão de como o sistema nervoso mantém a dor espontânea após o reparo da lesão inicial e, ainda, se a sinalização mal adaptativa que ocorre à nível central é suficiente para gerar esse sintoma de dor (Meacham *et al.*, 2017).

2.2.1 Fisiopatologia da dor neuropática periférica

A lesão do sistema somatossensorial faz com que células imunes especializadas como macrófagos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos T e outros liberem inúmeros produtos químicos, incluindo prótons, trifosfato de adenosina (ATP), fator de crescimento do nervo (NGF), bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas, serotonina, histamina e prostaglandinas (Brodin; Ernberg; Olgart, 2016).

Juntos, eles aumentam a sensibilidade de nociceptores na região à despolarização e excitação, processo conhecido como sensibilização periférica. Além disso, o nociceptor periférico, de maneira autócrina, libera substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que causam vasodilatação e extravasamento de plasma (inflamação neurogênica) (Brodin; Ernberg; Olgart, 2016).

A hiperexcitabilidade, causada por essa série de eventos neurobiológicos na periferia, conduz o estímulo elétrico até o gânglio da raiz dorsal (GRD), com ativação de células gliais satélite e alterações mal adaptativas, como a nos números gerais e de distribuição glial, padrões de brotamento e aumento da expressão de canais nessas células, levando a liberação de mediadores pró-inflamatórios e neurotransmissores excitatórios no GRD (Meacham *et al.*, 2017).

O resultado final, por sua vez, é a sinalização imprópria do neurônio periférico para seus alvos de segunda ordem, no CDME, tanto na transdução quanto na transmissão do impulso elétrico, conduzindo a mudanças gênicas e estruturais permanentes nos neurônios, canais iônicos e neurotransmissores, os quais

prejudicam ou até mesmo limitam o reconhecimento sensorial (Meacham *et al.*, 2017; Bielewicz *et al.*, 2023; Yam *et al.*, 2018).

Concomitantemente, as chamadas potenciações de longa duração que são uma tentativa de melhorar a transmissão do sinal entre dois neurônios para que o cérebro entenda que existe algo de errado com a via acontecem (Zhou *et al.*, 2011).

Outra característica importante é a reorganização do campo sensorial, em que as fibras A β e A δ , do CDME, passam a fazer sinapse em regiões fisiologicamente distintas do habitual, devido à perda tardia de fibras C. Por fim, as fibras A β e A δ (não nociceptivas) passam a liberar neurotransmissores relacionados como glutamato e substância P contribuindo ainda mais para o aumento da percepção da dor (Dinakar; Stillman, 2016).

A neurotransmissão excessiva no CDME também contribui para o aumento da atividade de células gliais nessa região. Ao se tornarem reativas, essas células podem contribuir ainda mais para o processo de sensibilização central, desencadeando uma série de eventos intracelulares que culminam na produção e liberação de citocinas pró inflamatórias (Milligan; Watkins, 2009).

Essas alterações, em segundo plano, podem causar novos processos patológicos nas estruturas supraespinais relacionadas com a dor, como na região do tálamo ventrobasal (Banati *et al.*, 2001; Giardini *et al.*, 2017; Leblanc *et al.*, 2011) e na via tálamo-cortical (Blaszczyk *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023), além do enfraquecimento dos processos inibitórios da dor pela via descendente (Bielewicz *et al.*, 2023; Bruzanette; Magrinelli; Tamburin, 2013; Yam *et al.*, 2018).

2.3 CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA

As células da glia são importantes neuromoduladores do Sistema Nervoso Central (SNC). Elas compreendem os oligodendrócitos, a micróglia e os astrócitos. Os oligodendrócitos, originados de células radiais, são responsáveis por auxiliar na melhor condução do estímulo dos axônios até o cérebro, por meio da bainha de mielina, além de fornecer estabilidade e transportar suprimento das células sanguíneas para os axônios (Allen; Lyons 2018).

Enquanto a micróglia, uma célula imune especializada do SNC e originada do saco vitelino, apresenta processos ramificados quando em repouso, além de um papel neuroimune de fagocitose e homeostase. Ela pode se diferenciar em 4 fenótipos, sendo o primeiro o M_0 em que a célula está em repouso, o clássico M_1 com função pró-inflamatória, em terceiro o M_2 , com características anti-inflamatórias e por fim, o fenótipo relacionado à doenças neurodegenerativas, o MGnD/DAM (Boche; Garland; Hartnell, 2022).

Já os astrócitos são células em formato de estrela quando se encontram em repouso. São originados de células radiais, tem como função a manutenção da barreira hematoencefálica, controlam o fluxo sanguíneo e a atividade neuronal, a regulação de neurotransmissores, do metabolismo energético cerebral e fagocitose (Boche; Garland; Hartnell, 2022). São as células não neuronais mais abundantes do SNC e podem se diferenciar em 2 fenótipos a saber, A_1 e A_2 , que vão desempenhar papéis neurotóxicos e neuroprotetores, respectivamente (Boche; Garland; Hartnell, 2022).

De uma forma geral, a micróglia e os astrócitos encontram-se normalmente em um estado quiescente e desempenhando seu papel fisiológico. Com a entrada aumentada de estímulos resultantes de lesões ou doenças do sistema nervoso somatossensorial, como ocorre na DN, essas células ficam reativas, se hipertrofiam e proliferam, aumentando a expressão de proteínas, como a proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Iba1) para micróglia e a proteína fibrilar glial ácida (GFAP) para astrócitos, além de uma gama de receptores, tais como TLR4 e TRPV₁ (Grace *et al.*, 2014; Marrone *et al.*, 2017; Milligan; Watkins, 2009).

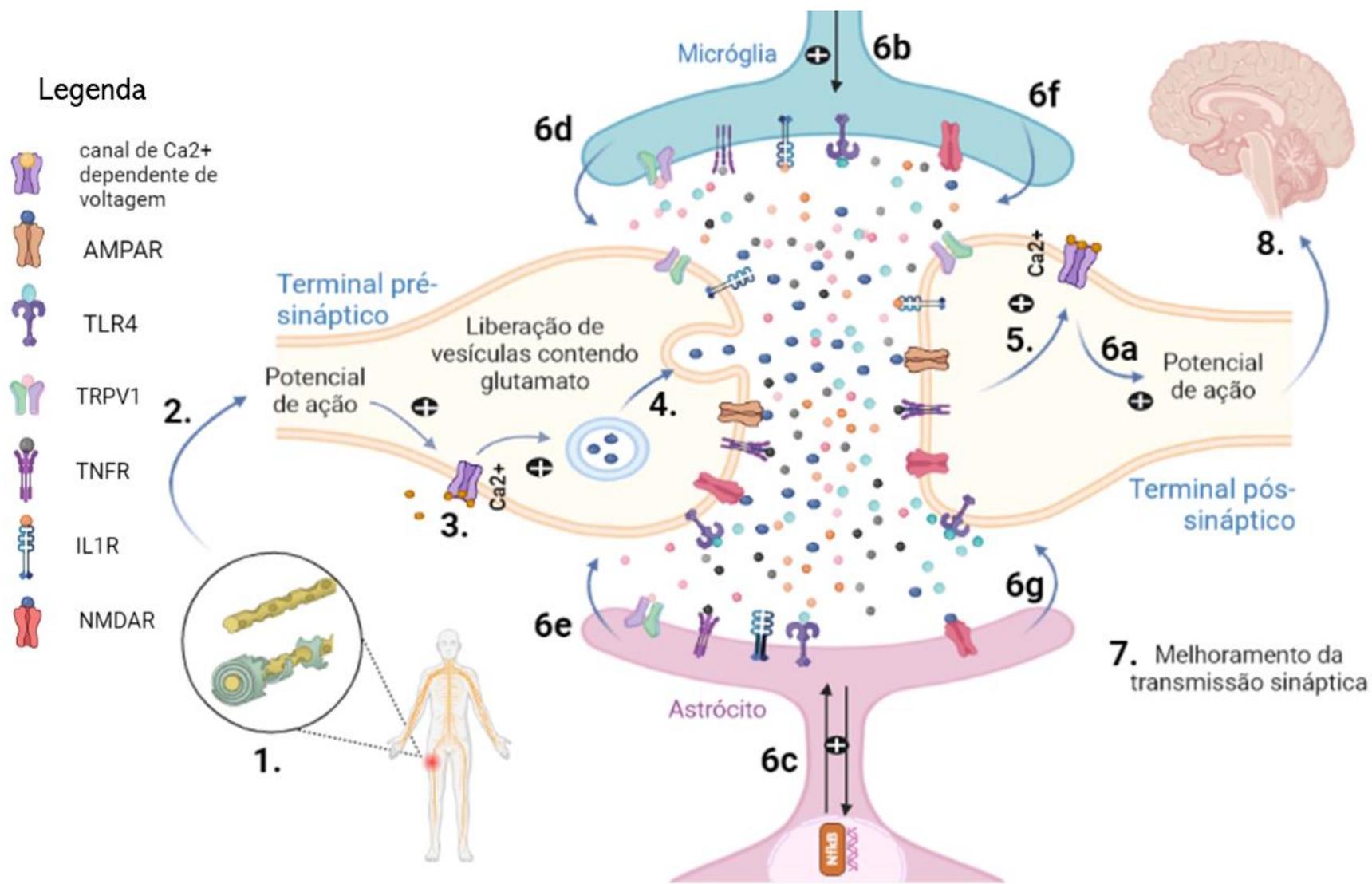
Após a injúria do nervo, ocorre a degeneração de axônios, e estes, por sua vez, podem liberar produtos moleculares associados ao dano (DAMP's), além de neurotransmissores, quimiocinas e citocinas. Em conjunto, esses elementos podem ativar as células da glia (Milligan; Watkins, 2009). Uma vez ativadas, por meio de receptores expressos em sua membrana celular, elas desencadeiam cascatas de sinalização intracelulares responsáveis por produzir uma resposta frente àquela lesão a depender do complexo receptor/ligante (Ji *et al.*, 2010).

Existem inúmeras cascatas de sinalização intracelular em que essas células podem ativar e, uma delas, é a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Após recrutamento dessa MAPK, uma série de eventos bioquímicos ocorrem no

interior da célula, como a regulação transcricional feita, por exemplo, pelo fator nuclear kappa B (NFκB), o qual permite a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, a saber, o fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas 1 β e 6 (IL1 β e IL-6), por exemplo (Ji *et al*, 2010).

Essas citocinas juntamente com os neurotransmissores, DAMP's e quimiocinas contribuem para um microambiente de neurotoxicidade no CDME e outras áreas do cérebro. Esse processo leva a um *feedback* positivo de ativação glial e estimulação dos neurônios aferentes primário e secundário. Assim, essa transmissão aumentada dos sinais resulta em uma percepção aumentada da dor (Grace *et al.*, 2014; Milligan; Watkins, 2009) (FIGURA 3).

Figura 3 — Neuromodulação da dor pelas células gliais



Fonte: da autora, realizado no site Biorender.

Nota: 1) A lesão nervosa pela DN leva a sensibilização de receptores que são ativados e perturbam o potencial de repouso da membrana do neurônio e 3) deflagra um potencial de ação. Este, por sua vez é conduzido pelo axônio e promove o 4) influxo de Ca^{2+} gerando a 5) liberação das vesículas contendo neurotransmissores excitatórios, como glutamato e substância P na fenda sináptica. 6a) Os neurotransmissores, por sua vez, se ligarão aos respectivos receptores, no neurônio de segunda ordem, a membrana da célula irá despolarizar e o influxo de Ca^{2+} ocorrerá causando excitação neuronal, regulação gênica com alteração na síntese de proteínas e conseqüente 7) melhoramento da transmissão sináptica devido ao aumento da expressão de receptores na membrana do neurônio secundário. Os neurotransmissores também poderão ativar células da glia, como 6b micróglia e 6c astrócitos. Elas tornam-se, portanto, reativas e passam a realizar síntese, produção e liberação de citocinas pró inflamatórias como TNF- α e IL-1/6, entre outros, na fenda sináptica que vão estimular tanto o 6d,e) neurônio aferente primário quanto o 6f,g) secundário. Esse processo torna-se um *feedback* positivo, onde o neurônio primário ficará mais hiperexcitado, liberando mais neurotransmissores e hipersensibilizando mais o neurônio aferente secundário que, por sua vez, 8) enviará o estímulo elétrico por meio de potencial de ação aos centros superiores, tálamo, córtex somatossensorial e áreas límbicas para que o processo seja interpretado e percebido como dor. NMDAR: receptor de N-metil D-Aspartato; AMPAR: receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; TLR4: receptor Toll like 4; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral α ; IL1R: receptor para interleucinas; TRPV₁: receptor do potencial transiente vanilóide do tipo 1.

Embora existam evidências científicas que embasam a hipótese da participação glial na sensibilização de neurônios nociceptivos em um quadro de DN, principalmente na medula espinal, pouco ainda se sabe a respeito da participação dessas células no tálamo, que é um importante centro supramedular de regulação das informações aferentes.

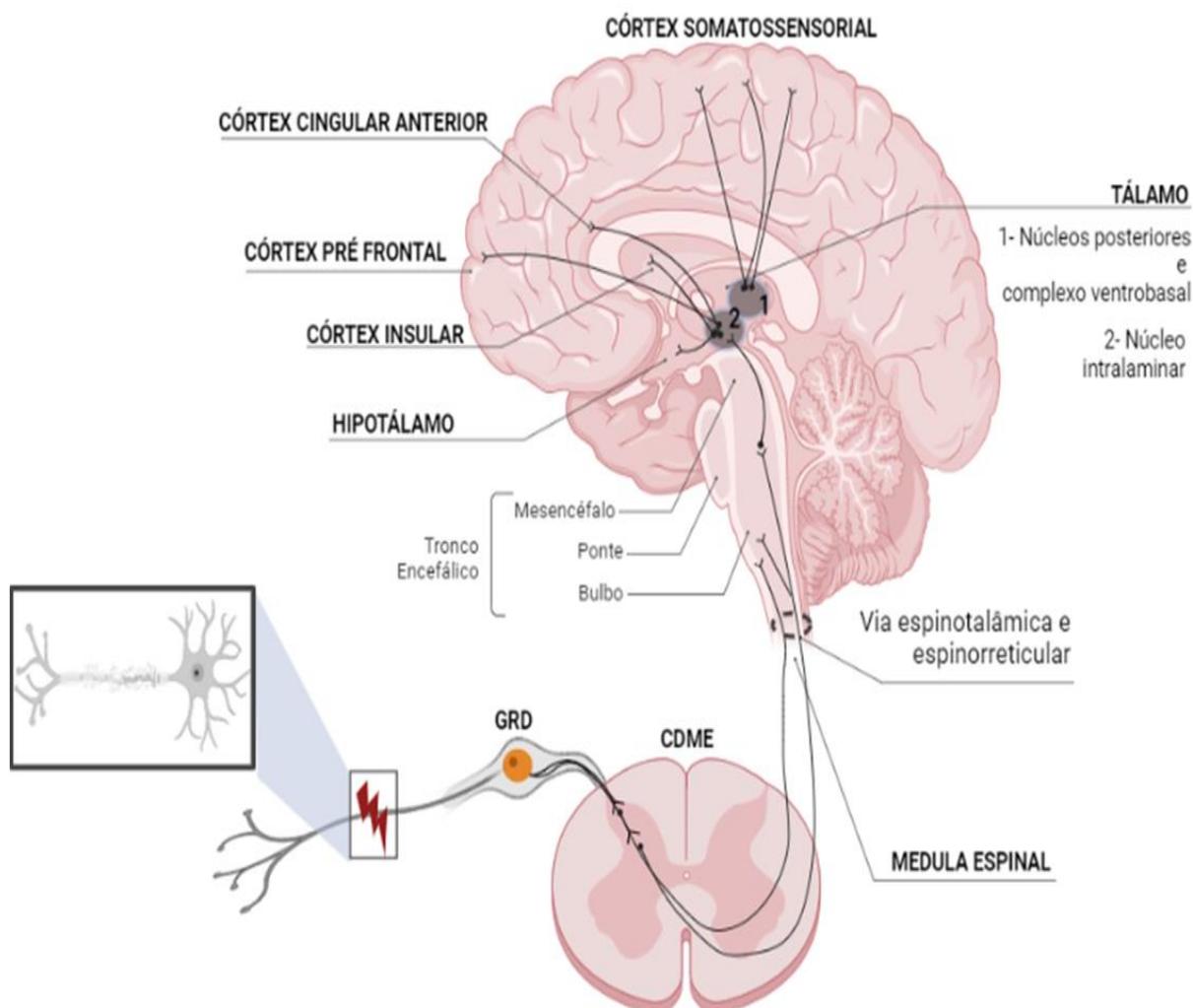
2.4 TÁLAMO E DOR

O tálamo é uma estrutura do SNC, localizado especificamente no diencéfalo e possui diversos núcleos responsáveis por modular diversas funções encefálicas, incluindo atenção, estresse, ansiedade e o processamento das informações sensoriais, incluindo a dor. Dentre os núcleos talâmicos, o núcleo intralaminar e parte do núcleo ventral medial estão relacionados com o aspecto afetivo-motivacional da dor (Ab Aziz; Ahmad, 2006; Morimura; Ossipov; Porreca, 2014).

Projeções de neurônios nociceptivos de lâminas intermediárias do CDME alcançam o núcleo parabraquial na ponte, e então axônios oriundos desse núcleo fazem sinapse com os núcleos intralaminar e ventral medial do tálamo. Por fim, esses

núcleos talâmicos enviam impulsos para áreas corticais como o córtex cingulado anterior e córtex insular, além de outras regiões como mesencéfalo, hipotálamo, núcleo lentiforme e córtex pré-frontal envolvidos na circuitaria nociceptiva (Ab Aziz; Ahmad, 2006) (FIGURA 4).

Figura 4 — Projeções neuronais nociceptivas ascendentes e suas interconexões



Fonte: da autora, realizado no site Biorender.

Nota: Imagem representativa da via ascendente da dor após lesão nervosa periférica conduzindo o estímulo elétrico do local da lesão, passando pelo GRD até o CDME. No CDME realiza a primeira sinapse com o neurônio aferente secundário, cruzando os tratos e ascendendo contralateralmente até o tálamo pela via espinotalâmica e espinoreticular. Projeções para o tronco encefálico ocorrem, a fim de ativar a via descendente (não representada na figura). No tálamo, especificamente nos núcleos posteriores (1) e complexo ventrobasal (2) uma outra sinapse ocorre com neurônios aferentes terciários, os quais conduzirão o estímulo elétrico até os centros superiores responsáveis pelo processamento cognitivo, afetivo da dor e processamento somatossensorial.

Entretanto, é sabido que áreas corticais exercem influência e interajam com o tálamo, afetando a percepção dolorosa. Dados da literatura apontam que tratos descendentes corticotálâmicos podem favorecer as entradas sensoriais na sinapse de terceira ordem no tálamo em condições em que a via aferente está fortemente ativa, hiperexcitando o neurônio (Alamancos, 2002; Grant; Molnár; Suabedissen, 2012).

Ainda, o núcleo submédio do tálamo tem sido implicado na interação com a substância cinzenta periaquedutal (SCP) localizada no mesencéfalo, uma importante estrutura relacionada com a via descendente inibitória que modula a nocicepção (Ab Aziz; Ahmad, 2006; Wu *et al.*, 2014). Em macacos, foram identificadas fibras ascendentes diretas da SCP a núcleos talâmicos, e em humanos acredita-se que também haja essa conexão (Salt *et al.*, 2014).

Já os núcleos ventral pósteromedial (VPM) e o núcleo ventral pósterolateral (VPL) que compreendem em conjunto o tálamo ventrobasal são estruturas talâmicas as quais contêm fibras neuronais que recebem aferências da periferia com entradas somatossensoriais de origem mecânica, térmica e química (Welker, 1973).

Portanto, percebe-se que o tálamo não é apenas uma estrutura de direcionamento dos estímulos sensoriais. Ele é também uma estrutura complexa responsável pela integração das informações nociceptivas e um sítio que recebe influências modulatórias importantes de outras regiões cerebrais.

Estudos em ratos demonstraram que modelos experimentais de dor inflamatória ou neuropática resultaram em redução do limiar de ativação de neurônios do tálamo ventrobasal, associada à presença de hiperalgesia ou alodinia mecânica (Giardini *et al.*, 2017; Guilbaud *et al.*, 1986, 1987, 1990; Leblanc *et al.*, 2017). Em adição, foi observada a ativação do tálamo ventrobasal de indivíduos com amputação de membro inferior, associada a dor neuropática por meio de estudos de imagem (Banati *et al.*, 2001).

Além disso, foi verificado em recentes estudos que animais com hemorragia talâmica apresentavam alodinia, hiperalgesia mecânica e térmica e que a sua expressão estava aumentada no tálamo desses animais. E ainda, que o bloqueio da micróglia com um inibidor reduziu esses sintomas (Hiraga *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Infantino *et al.*, 2022). Entretanto, esses estudos não investigaram a participação do tálamo frente a lesão periférica, somente à lesão no SNC.

Dentre os estudos evidenciados, tanto as lesões do SNC quanto do SNP têm demonstrado que as células da glia no tálamo podem ser ativadas e favorecer o microambiente neurotóxico no botão sináptico da via tálamo-cortical, de modo a favorecer a transmissão do impulso elétrico (Banati, 2002; Cobiañchi; Mòdol; Navarro, 2014;; Giardini *et al.*, 2017; Hains; Zhao; Waxman, 2006; Hiraga *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021; Infantino *et al.*, 2022; Mannelli *et al.*, 2013).

Leblanc e colaboradores (2011) injetaram um inibidor de micróglia, em ratos com neuropatia e identificaram a redução da alodinia mecânica nesses animais. Além de encontrar evidências da participação microglial e da ativação da via MAPK P38 no VPL contralateral de ratos neuropáticos por meio de experimentos moleculares. Eles sugerem que a proteína MAPK p38 está ativa nessas células, o que indica uma possível participação da via MAPK p38 (Leblanc *et al.*, 2011).

Contudo, apesar das evidências na literatura indicarem a participação de células gliais no tálamo ventrobasal, a forma com a qual essas células são ativadas ainda permanece obscura, uma vez que as evidências não determinam por qual receptor essas células iniciam seu papel pró-inflamatório. Sendo assim, investigar os receptores envolvidos nessa ativação são de suma importância.

2.5 RECEPTORES TLR4 E TRPV₁ E A VIA MAPK38/NFKB

O receptor TLR4 é um receptor transmembrana de reconhecimento de padrões (RRP's), evolutivamente conservado e expresso por células imunes, tais como os macrófagos, neurônios e pelas células da glia (Grace; Lacagnina; Watkins, 2019; Milligan; Watkins, 2009). Sua ativação pode se dar pelo seu agonista clássico o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), componente principal da membrana exterior de bactérias gram-negativas, ou por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's), os quais uma vez ativados são responsáveis por iniciar respostas imunes por meio da ativação de vias de sinalização intracelulares (Grace; Lacagnina; Watkins, 2019; Akira; Takeda, 2004).

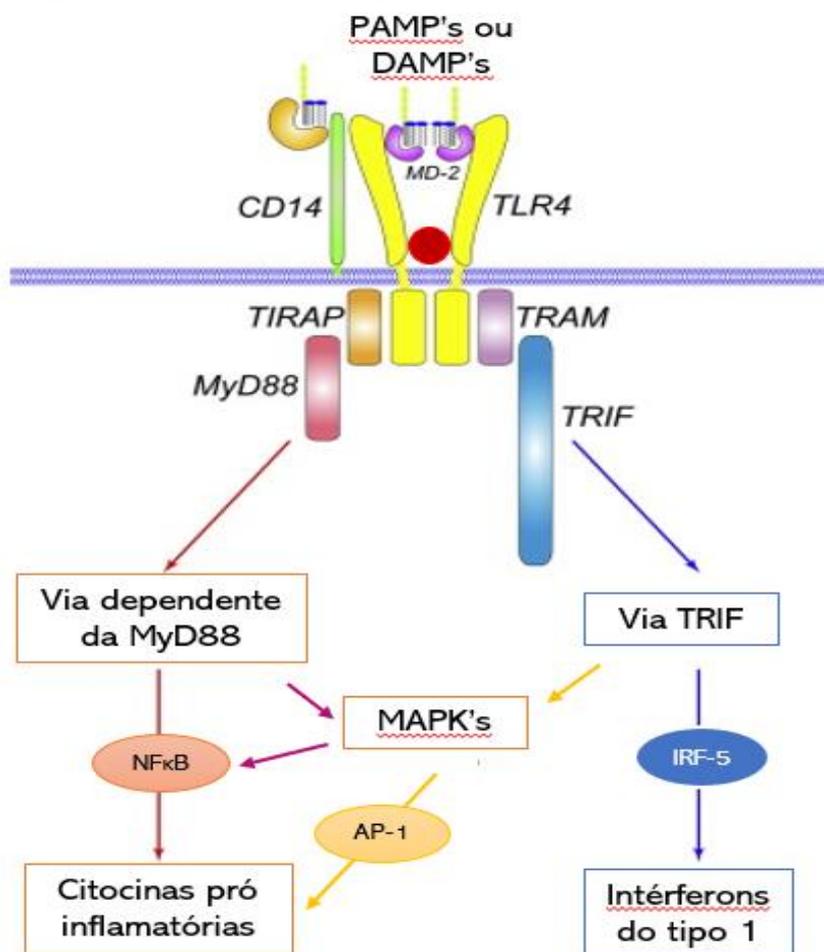
O início da resposta imune via TLR4 pode ocorrer de duas maneiras distintas a depender de seu ligante, sendo a primeira pela ativação da via de sinalização

intracelular dependente da proteína de diferenciação mieloide 88 (Myd88) e a segunda pela via da proteína adaptadora de interferon- β contendo domínio TIR (TRIF) (Grace; Lacagnina; Watkins, 2019).

Portanto, ao passo que é ativada uma cascata de sinalização intracelular por meio de processos bioquímicos, as MAPK's são recrutadas, além de fatores nucleares de transcrição como o NF κ B, proteína adaptadora 1 (PA-1) ou fator regulador de int erferon 5 (FRI-5) (Grace, Lacagnina; Watkins, 2019; Akira; Takeda, 2004).

O passo final desse processo pode ser a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias e interferons (Akira; Takeda, 2004; Grace; Lacagnina; Watkins, 2019), fazendo com que em doenças como a DN ocorra o aumento da despolarização do neurônio e conseqüente sensibilização central (Liu *et al.*, 2022; Milligan; Watkins, 2009) (FIGURA 5).

Figura 5 — Vias de ativação do receptor TLR4



Fonte: Adaptado de Yong-ChenLu e colaboradores (2008).

Nota: MD-2: Fator de diferenciação 2; TIRAP: Proteína adaptadora contendo domínio do receptor de interleucina-1 Toll; CD14: cluster de diferenciação 14; TRAM: Proteína de membrana associada à cadeia de translocação; TLR4: receptor *Toll like 4*; MyD88: Fator de diferenciação mieloide 88; MAPK's: Proteínas quinases ativadas por mitógeno; NFκB: Fator nuclear *kappa B*; PA-1: Proteína adaptadora 1; IRF-5: Fator regulador de interferon 5; TRIF: Proteína adaptadora de interferon-β contendo domínio TIR.

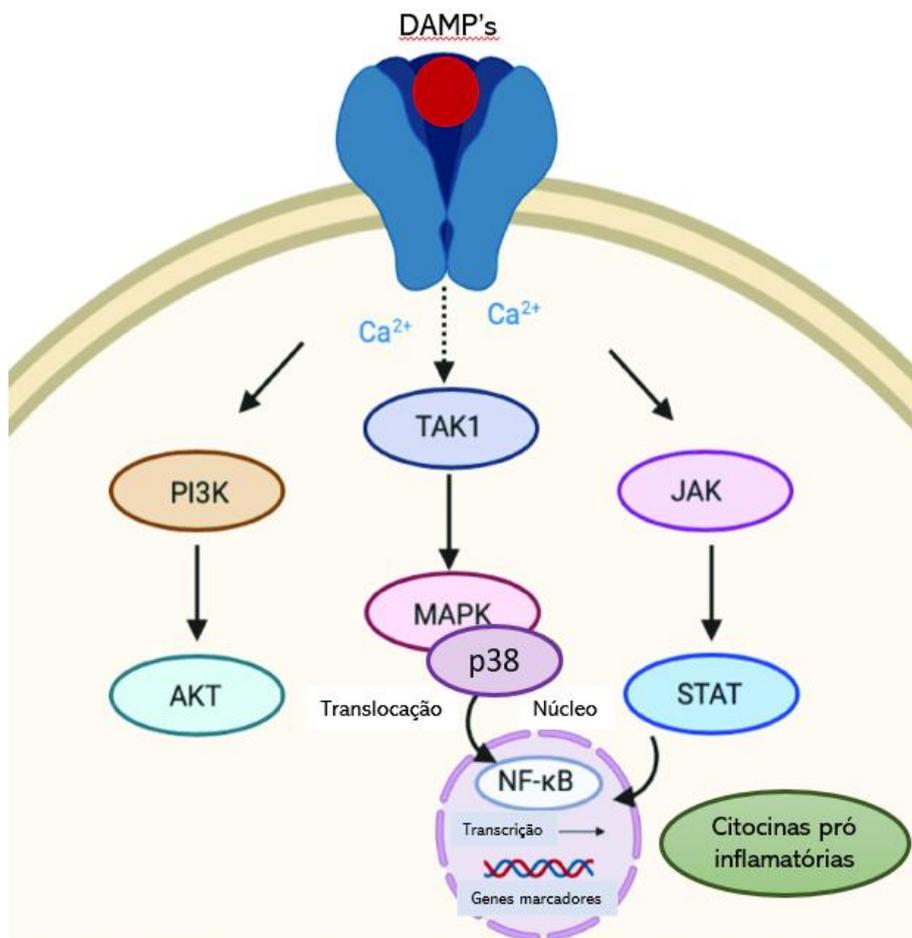
O papel do TLR4 na sensibilização central já está bem descrito, uma vez que estudos demonstraram a participação desse receptor em células gliais do CDME frente a DN e outras dores crônicas (Grace, Lacagnina; Watkins, 2019; Milligan; Watkins, 2009; Zhao *et al.*, 2017).

Estudos experimentais também têm mostrado a ativação desse receptor em células gliais à nível supramedular, principalmente em lesões hemorrágicas, fibromialgia e em doenças neurodegenerativas; visto que, a resposta frente à ativação desse receptor induz a liberação de moléculas pró-inflamatórias responsáveis por processos neurotóxicos no SNC (Hsiao; Lin, 2022; Huang *et al.*, 2021; Lehnardt, 2010; Wu *et al.*, 2022).

Huang e colaboradores (2021) observaram que os níveis de expressão de Iba1, GFAP e proteínas associadas à via de sinalização de TLR4 como NFκB e ERK1/2 foram aumentadas em camundongos que apresentavam sintomas de dor após indução de hemorragia talâmica (Huang *et al.*, 2021). Porém, frente a nocicepção induzida por lesão periférica nenhum estudo avaliou este processo.

O receptor transiente do potencial vanilóide 1 (TRPV₁) é um canal catiônico não seletivo e amplamente estudado devido ao seu principal papel de detectar estímulos nocivos produzidos por produtos químicos. A capsaicina é o seu agonista clássico oriundo de pimentas, além da resiniferatoxina, etanol e algumas toxinas de venenos como a da tarântula, as quais são ativadores exógenos.

Temperaturas nocivas (acima de 43°C), mediadores pró inflamatórios como a bradicinina, o fator de crescimento do nervo e as prostaglandinas (PGE2 e PGI2) são ativadores endógenos, além da anandamida e produtos da lipoxigenase. Eles atribuem a esse receptor, portanto, um perfil nociceptivo (Delmas *et al.*, 2021). Ao ser ativado, o TRPV₁ pode desencadear cascatas de sinalização intracelular, como a das MAP quinases (Aghazadeh *et al.*, 2021) (FIGURA 6).

Figura 6 — Vias de ativação do receptor TRPV₁

Fonte: Adaptado de Nadia Peyravian e colaboradores (2020).

Nota: DAMP's: padrões moleculares associados ao dano; PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase; AKT: Proteína quinase B; TAK1: Proteína quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador- β ; MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno; p38: Proteína 38; NF κ B: Fator nuclear *kappa* B; JAK: Proteína Janus quinase; STAT: Proteína transdutora de sinal e ativador da transcrição.

Os receptores TRPV₁ são encontrados não apenas em neurônios, mas em células da glia em diversas regiões cerebrais e o seu papel nessas células é de ativação de vias de sinalização intracelular, dentre elas incluem a das MAP quinases. Esse processo de ativação culmina na transcrição gênica, produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a excitabilidade neuronal, a neuroinflamação e, conseqüentemente, a percepção da dor, principalmente descrito até o momento no CDME (Calkins, Ho; Ward, 2012; Eder; Schilling, 2009; Mannari *et al.*, 2013; Marrone *et al.*, 2017; Miyake *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Um estudo recente em roedores encontrou o aumento da expressão de proteínas para TLR4, além da via MAPK/NF κ B p38 no tálamo de camundongos com

dor do tipo fibromiálgica e a ausência do TRPV₁ em camundongos nocaute diminuiu a expressão dessas proteínas, demonstrando a relação desses receptores na via MAPK/NFκB p38 (Hsiao; Lin, 2022).

Um outro estudo demonstrou o aumento da expressão de TRPV₁ em cultura primária de micróglia de camundongos com DN no córtex cingulado anterior (CCA), no tálamo, córtex somatossensorial, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e hipocampo, porém esse aumento foi observado em menor proporção quando comparados a esse mesmo aumento expressivo de TRPV₁ em neurônios na medula espinal (ME) e GRD. Já a expressão de TRPV₁ em astrócitos foi encontrada somente no CCA e em menor proporção que em células microgliais (Marrone *et al.*, 2017). Estes estudos reforçam a existência desses receptores no tálamo, podendo ser expressos em células da glia.

A inibição farmacológica prévia da micróglia seguido do desafio com capsaicina, um agonista do TRPV₁, evidenciou o papel dessa célula glial no aumento da frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias no CCA. Além disso, foi identificada a liberação de TNFα por essas células após desafio com capsaicina.

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), dentre elas a via p38 regulada por sinais de estresse (MAPKp38), as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK's) e as quinases amino-terminais Jun (JNK's), são vias de sinalização intracelular determinantes no processo de nocicepção, incluindo a DN (Arthur; Ley, 2013; Ji; Suter, 2007; Mai *et al.*, 2020).

A sinalização de MAP quinases tem inúmeras faces frente às respostas imunes inatas as quais vão desde a indução de genes para produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios até a anti-inflamatórios. Sendo assim, um dos fatores nucleares importantes para produzir esses genes é o fator nuclear *kappa* B (NFκB) (Akira; Takeda, 2004; Arthur; Ley, 2013).

Em adição, as MAP quinases podem ser ativadas por meio de uma série de receptores, como os do tipo *Toll* (TLR's) e TRPV₁, ambos presentes em células gliais (Akira; Takeda, 2004; Marrone *et al.*, 2017). Estudos de revisão sobre a via MAPK p38, glia e DN demonstraram a contribuição dessa via na sensibilização periférica e central por meio de sua ativação em células gliais (Ji; Suter, 2007; Mai *et al.*, 2020).

O NFκB é um fator de transcrição nuclear capaz de controlar diversas funções imunes sendo utilizado como um mediador de respostas imunes inatas e adaptativa.

Nos processos fisiológicos da inflamação ele é sequestrado do citoplasma da célula por meio de uma proteína, o κ B para o núcleo da célula. Ele, portanto, induz a expressão de vários genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles que codificam citocinas e quimiocinas (Liu *et al.*, 2017).

Além disso, ele regula o inflamassoma, a sobrevivência, a ativação e diferenciação de células imunes inatas e células T inflamatórias (Liu *et al.*, 2017). Entretanto, estímulos desregulados frente a inflamação podem vir a causar excessivos danos teciduais e fazer com que ele contribua para o desenvolvimento de dor inflamatória crônica, como é o caso da dor neuropática crônica (Liu *et al.*, 2017).

A via MAPK p38/NF κ B é uma via comum em que os dois receptores podem ativar nas células gliais em condições patológicas da DN (Arthur; Ley, 2013; Bai *et al.*, 2021; Ji; Suter, 2007; Liu *et al.*, 2017). Porém, apesar de descrito na literatura a participação da via TLR4/MAPK p38 e TRPV₁/MAPK p38 em células da glia em diferentes regiões do SNC, o mesmo não pode ser dito quando se trata dessa via no tálamo ventrobasal, onde há apenas dois estudos que apontam a participação dessa via em ratos com DN, porém sem especificar à montante qual receptor está envolvido (Ji; Suter, 2007; Leblanc *et al.*, 2011).

Sendo assim, estudar os aspectos que levam à ativação de células da glia via receptores TRPV₁ e TLR4 a níveis supraespinais, assim como as vias moleculares responsáveis pelo aumento da excitabilidade de neurônios são de extrema importância, pois já vem sendo discutido e demonstrado o papel de outras regiões supramedulares da via da dor que são tão necessárias quanto às periféricas para todo seu entendimento.

Portanto, a hipótese do presente trabalho é a de que a ativação dos receptores TLR4 e TRPV₁ ativam a via MAPKp38/NF κ B em células da glia no tálamo e por consequência, essas células ativadas contribuem para a excitabilidade dos neurônios aferentes à nível talâmico, liberando citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a manutenção da DN.

3 OBJETIVOS

Abaixo seguem descritos os objetivos do presente trabalho:

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento de células da glia, dos receptores TRPV₁, TLR4 e da via MAPKp38/NFκB no tálamo durante a DN em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a participação de micróglia e astrócitos, dos receptores TLR4 e TRPV₁, bem como da via MAPKp38 no tálamo mediante alodinia mecânica induzida pela DN;
- b) Avaliar a expressão proteica de marcadores de micróglia e astrócitos, dos receptores TRPV₁ e TLR4, além da MAPKp38 no tálamo durante a DN;
- c) Investigar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de genes para TRPV₁, TLR4 e de células da glia no tálamo de camundongos durante a DN;
- d) Avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL1β) no tálamo durante a DN;
- e) Co-localizar o receptor TLR4 em células gliais talâmicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Abaixo está detalhadamente descrita a metodologia utilizada no presente estudo:

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57/BL6 machos, pesando entre 20 e 25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas sob o número de protocolo 19/2019.

Os animais foram mantidos sob condições padrão de temperatura (22-24°C), ciclo claro/escuro (12h/12h) e umidade de 65%, com livre acesso a ração e água. Eles foram alojados em caixas de polipropileno que ficam dentro de uma rack microisoladora (Insight, Brasil), sendo 6 animais por caixa e todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela IASP (Zimmermann, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela CEUA da UNIFAL-MG.

4.2 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO

Para esse procedimento foi utilizada uma adaptação do modelo de injúria por constrição crônica previamente descrito por Bennet e Xie (1988) (Bennett; Xie, 1988) o qual já é bem estabelecido e conhecido na literatura por induzir comportamentos do tipo dor neuropática.

Sendo assim, eles foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (ambas da Syntec, Brasil), nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg i.m, respectivamente. O volume utilizado foi de 10 µL a cada 10 gramas de peso do animal e injetado no músculo gastrocnêmio ipsilateral a injúria por

constricção crônica (CCI). Após verificada a sedação, os animais foram tricotomizados na região posterior da coxa, permitindo a incisão cirúrgica da pele e músculos para consequente exposição do nervo ciático.

Além disso, os animais foram mantidos aquecidos em cima de uma placa térmica (Insight equipamentos, Brasil), com o intuito de minimizar o risco de hipotermia e consequente morte durante a anestesia no período operatório. Em adição, para evitar a desidratação da córnea, foi gotejada solução de salina estéril (0,9%) nos olhos dos animais.

Este modelo de dor neuropática consiste em uma amarradura frouxa em três pontos do nervo ciático, com um fio de sutura de seda na espessura 4,0 (*Technew*, Brasil) (FIGURA 7). Os animais falsos operados, nomeados de sham, não foram submetidos a nenhuma amarradura no nervo, apenas a exposição dele, seguida de sutura da pele e músculos.

Após a recuperação da anestesia, todos os animais foram colocados em suas respectivas caixas e mantidos aquecidos sob a luz de uma lâmpada incandescente mantida a 40 cm de distância de cada caixa.

Figura 7 — Modelo experimental de injúria por constrição crônica



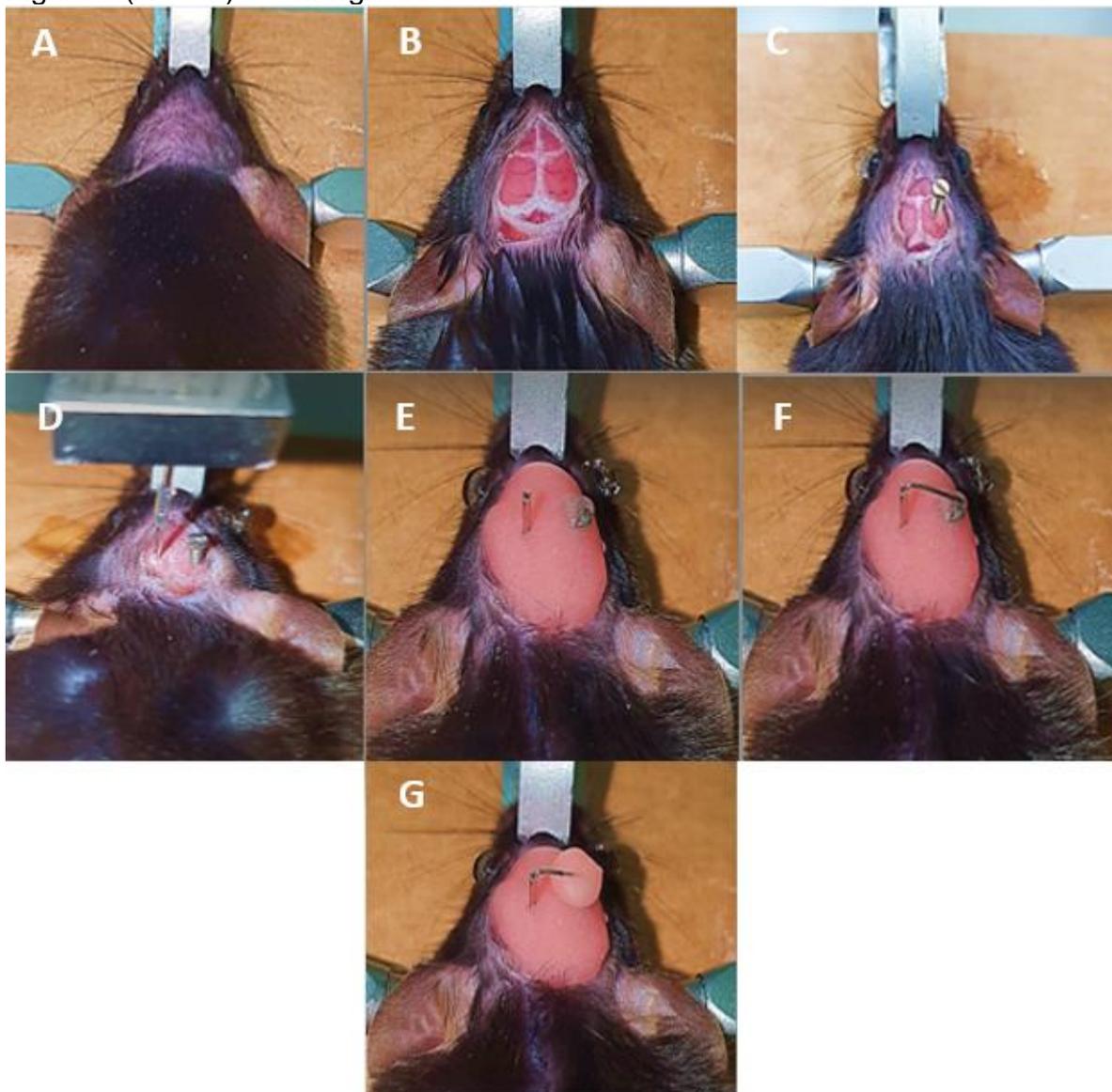
Fonte: da autora.

Nota: Imagem representativa da injúria por constrição crônica em camundongos;

4.3 CIRURGIA DE ESTEREOTAXIA

A neurocirurgia estereotáxica baseia-se no deslocamento tridimensional de um ponto, obedecendo coordenadas determinadas por meio de um atlas (Messier; Émond; Ethier, 1999). Ela é utilizada quando se deseja atuar especificamente sobre uma determinada estrutura encefálica (FIGURA 8, A—G). Para tal, foi utilizado um estereotáxico manual (*Insight Equipamentos, Brasil*), o qual permite a projeção espacial do ponto bregma e a localização precisa da estrutura em questão (FIGURA 9).

Figura 8 (A — G) — Cirurgia de estereotaxia



Fonte: da autora.

Nota: Passo a passo da realização da cirurgia de estereotaxia para implantação da cânula guia de administração das substâncias: A) Tricotomia e esterilização da região da cabeça, seguida de fixação dela pelas barras auriculares e nasal; B) Incisão cirúrgica da pele com exposição dos ossos cranianos por meio da aplicação de peróxido de hidrogênio 10%; C) Perfuração e implantação de um parafuso no lado ipsilateral à lesão permitindo a fixação posterior do mandril e da cânula guia; D) Direcionamento e perfuração do crânio para fixação da cânula guia ao local de acesso ao tálamo ventrobasal por meio das coordenadas do atlas para camundongos de Franklin e Paxinos; E) Confeção e fixação do cimento dentário sobre o crânio do animal para permitir a fixação da cânula guia e do parafuso de sustentação do mandril; F) Colocação do mandril para evitar entupimento da cânula guia; G) Fixação do mandril no parafuso com cimento odontológico.

Figura 9 — Aparelho estereotático



Fonte: da autora.

Nota: Imagem representativa do aparelho estereotático manual para implantação da cânula guia.

4.4 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Abaixo estão descritas as vias de administração utilizadas no presente estudo:

4.4.1 Via intraperitoneal

A via intraperitoneal (i.p) foi utilizada para administrar os anestésicos a fim de sedar os animais durante os experimentos para a implantação da cânula-guia. A injeção é feita no quadrante abdominal inferior direito a 45 graus. O animal foi contido pelo dorso e com a face ventral voltada para cima. O corpo inclinado a 45 graus com a cabeça para baixo e a agulha foi inserida no quadrante inferior direito do abdômen em um ângulo de 30 a 45 graus (Freitas; Tada; Antiorio, 2020).

4.4.2 Via intratálâmica

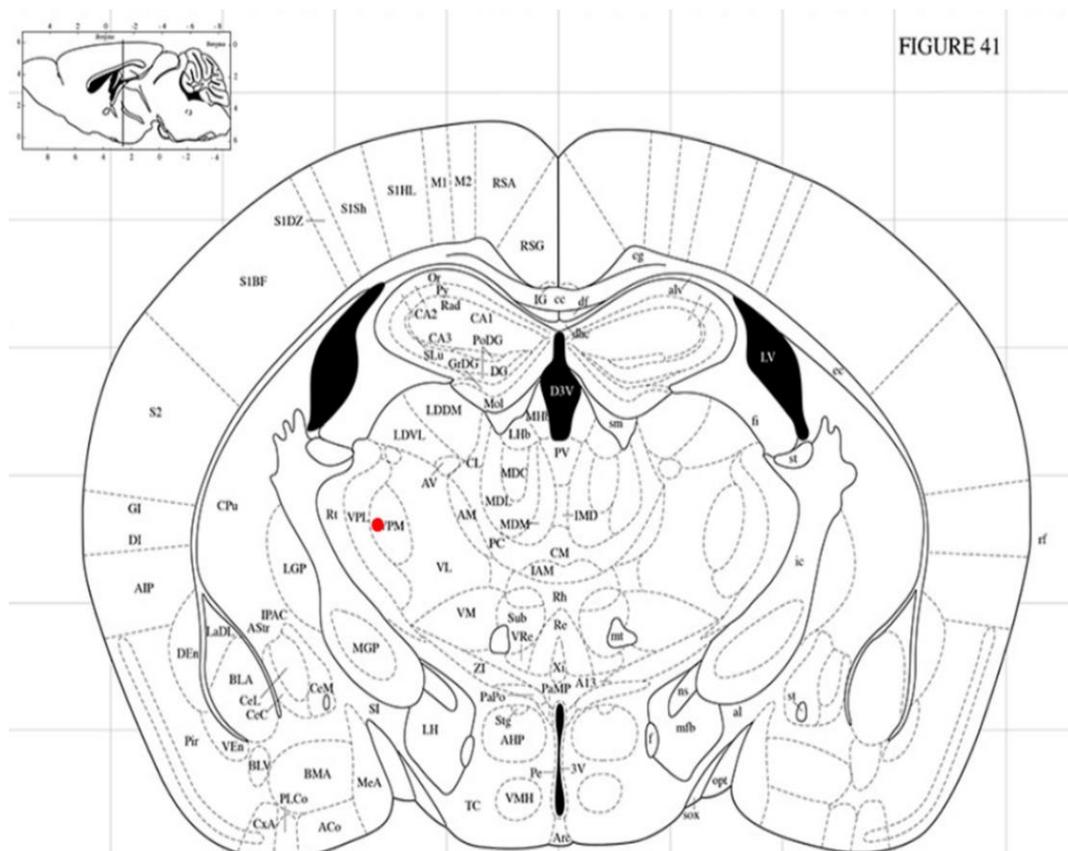
Com a finalidade de investigar a participação das células da glia, dos receptores e da via p38 no tálamo ventrobasal de animais com DN, a via intratálâmica foi escolhida. Para tal, a realização da estereotaxia e a microinjeção das substâncias foi realizada, sendo que os animais foram previamente anestesiados com uma solução contendo cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina injetadas por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, em um volume de 0,1 mL/kg. Uma vez verificada a anestesia, foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça do animal e ela foi fixada no estereotáxico por meio de duas barras auriculares e uma barra bucal.

Após posicionados, os animais foram submetidos a um implante craniano de uma cânula-guia (agulha de 22G, Solidor, Brasil) com 9 mm de comprimento, utilizando um cimento acrílico auto polimerizante (Jet, Brasil). Foi então realizada uma neurocirurgia estereotáxica baseada no deslocamento tridimensional de um ponto seguindo as coordenadas determinadas, permitindo assim a projeção espacial deste ponto (bregma) e a localização exata de estruturas.

As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula-guia no hemisfério esquerdo do tálamo ventrobasal foram definidas de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997), sendo elas: ântero posterior -1.2 mm; médio-lateral -1.6 mm e ventral -3.2 mm em relação ao bregma (FIGURA 10) (Paxinos; Franklin, 2012). Um fio de menor diâmetro (mandril) foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação.

Logo após a estereotaxia, os camundongos receberam administração de 0,1 mL para cada 10g de peso corporal de pentabiótico por via intramuscular (i.m) na dose de 17 mg/mL diluído em salina e cetoprofeno (0,1mL/10g de peso corporal, por via subcutânea (s.c) (Figura 8, A-G). Após a cirurgia os animais foram devidamente colocados em caixas individuais até a recuperação total até o dia das avaliações comportamentais (delineamentos experimentais figuras 15 e 16) ou para a coleta do tálamo (FIGURAS 17, 18 e 19).

Figura 10 — Coordenadas estereotáticas do tálamo ventrobasal



Fonte: Atlas de Franklin e Paxinos, 1997.

Nota: Coordenadas estereotáticas de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos, indicando o ponto em vermelho onde encontra-se o tálamo ventrobasal cuja injeção das substâncias foram realizadas após fixação da cânula guia.

4.4.3 Substâncias utilizadas no estudo

No presente estudo foram utilizadas as seguintes substâncias:

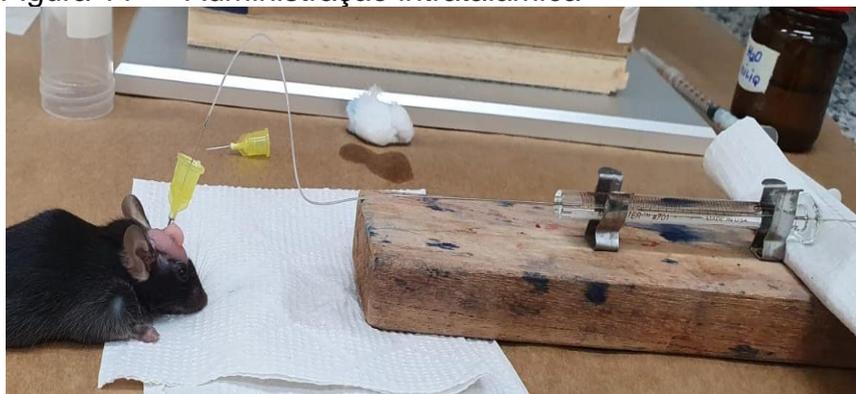
- a) Minociclina (Sigma, EUA): inibidor de micrógliã, diluída em solução salina estéril (0,9%). Administrada por via intratálâmica nas concentrações 50 e 500ng/ μ L (Tu *et al.*, 2017);
- b) Fluorocitrato (Invivogen, EUA): inibidor de astrócitos, diluído em solução salina estéril (0,9%). Administrado por via intratálâmica nas concentrações de 10 e 100pmol/ μ L (Zhang *et al.*, 2020);
- c) Lipopolissacarídeo da *Rhodobacter Sphaeroides* (LPS-RS) (Invivogen, EUA): antagonista do receptor TLR4, diluído em solução salina estéril (0,9%). Administrado por via intratálâmica nas concentrações 50 e 500 μ g/ μ L (Muneoka *et al.*, 2019);

- d) N-(3-Metoxifenil)-4-clorocinamida (SB366791) (Sigma, EUA): antagonista do receptor TRPV₁, diluído em salina estéril (0,9%). Administrada por via intratálâmica nas concentrações 0,3 e 3pg/ μ L (Jurik *et al.*, 2014);
- e) Oxifenbutazona (SML0540) (Sigma, EUA): inibidor de p38, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 5 mg/mL e salina estéril (0,9%). Administrada por via intratálâmica nas concentrações de 0,5 e 5nmol/ μ L (Medeiros *et al.*, 2010);
- f) Ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) (Sigma, EUA): inibidor de NF κ B diluído em salina estéril (0,9%). Administrada por via intratálâmica nas concentrações de 10 e 100 μ Mol/ μ L (Fan *et al.*, 2019).

Cada substância foi injetada uma única vez via intratálâmica (hemisfério esquerdo do tálamo) por meio de uma microseringa de vidro (Companhia Hamilton, EUA) conectada a uma cânula de polietileno (PE-10) e a uma agulha gengival 30G (Injex Indústrias cirúrgicas, Brasil). Para a injeção, primeiramente os animais foram anestesiados com isoflurano a 2% (Cristália, Brasil) e O₂ (2 L/min), por meio de um vaporizador calibrado.

Logo em seguida, os animais foram posicionados adequadamente, o mandril cortado e a microseringa conectada a cânula-guia (como mostra a figura 11). O volume total injetado em cada concentração utilizada foi de 0.2 μ L/45s por injeção, no 14° dia após a cirurgia de indução da DN (item 4.5). As concentrações usadas no presente estudo (referenciadas no item 4.3.1) foram baseadas ou ligeiramente modificadas de estudos anteriores.

Figura 11 — Administração intratálâmica



Fonte: da autora.

Nota: Imagem representativa de um animal submetido a administração intratômica de substâncias.

4.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Abaixo estão descritos os métodos utilizados para as avaliações comportamentais:

4.5.1 Avaliação da alodinia mecânica

Os experimentos para a avaliação comportamental da alodinia mecânica foram efetuadas dentro do ciclo circadiano dos animais, respeitando o ciclo claro, dentre às 7h até às 16h horas. Inicialmente, os animais foram alocados em caixas individuais de vidro sobre uma grade de metal que dá acesso a pata e mantidos por 30 minutos a 1h para a aclimação ao ambiente e para que então fosse dado início ao experimento.

A avaliação da alodinia foi feita por meio do aparato von Frey filamentos (*Anesthesio*, Brasil), aplicados de forma perpendicular com força suficiente para curvÁ-los, sendo considerada uma resposta positiva o momento em que o camundongo retira e/ou lambe e/ou agita a pata avaliada.

O kit contém vários filamentos de diferentes espessuras, os quais cada espessura corresponde a uma pressão em gramas que será aplicada pelo experimentador na pata do animal (Oliveira *et al.*, 2020). Foram utilizados para o presente estudo sete filamentos aplicados de forma crescente, sendo eles: 0.008g, 0.02g, 0.04g, 0.07g, 0.16g, 0.4g, 0.6g, 1.0g, 1.4g e 2.0g. Cada filamento de von Frey foram aplicados por 3 vezes, iniciando sempre com o menor filamento e o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata foi registrado a cada resposta positiva por 3 vezes, sendo a média do valor das 3 medidas considerada como valor final para as análises estatísticas (FIGURA 12).

Figura 12 — Filamentos de von Frey e suporte



Fonte: da autora.

Nota: Imagem representativa do suporte, das caixas de vidro onde os animais permanecem em suas baias individuais durante o experimento e dos filamentos de Von Frey.

4.5.2 Avaliação da coordenação motora

A fim de investigar o efeito de cada substância injetada no tálamo sobre a coordenação motora dos animais, além de avaliar se esse efeito poderá interferir na resposta do limiar nociceptivo, foi utilizado o teste do Rota rod (*Bonther*, Brasil), como demonstrado pela figura 13. Para tal, os animais foram colocados sobre o cilindro rotatório de 25cm no sentido horário.

O aparelho foi ajustado a velocidade de 13 rotações por minuto (rpm) em um tempo total de 120s, sendo cada animal colocado em uma baia de 6 cm de largura. Os animais foram submetidos ao teste por três vezes com intervalo de tempo de 5 min entre as medidas e a média em que o animal permaneceu no aparelho sem cair foi registrado como a média final para as análises estatísticas (*Matarazzo et al.*, 2021).

Figura 13 — Aparelho Rota rod



Fonte: da autora.

Nota: Imagem representativa do aparelho de Rota rod o qual os animais são submetidos à avaliação da coordenação motora.

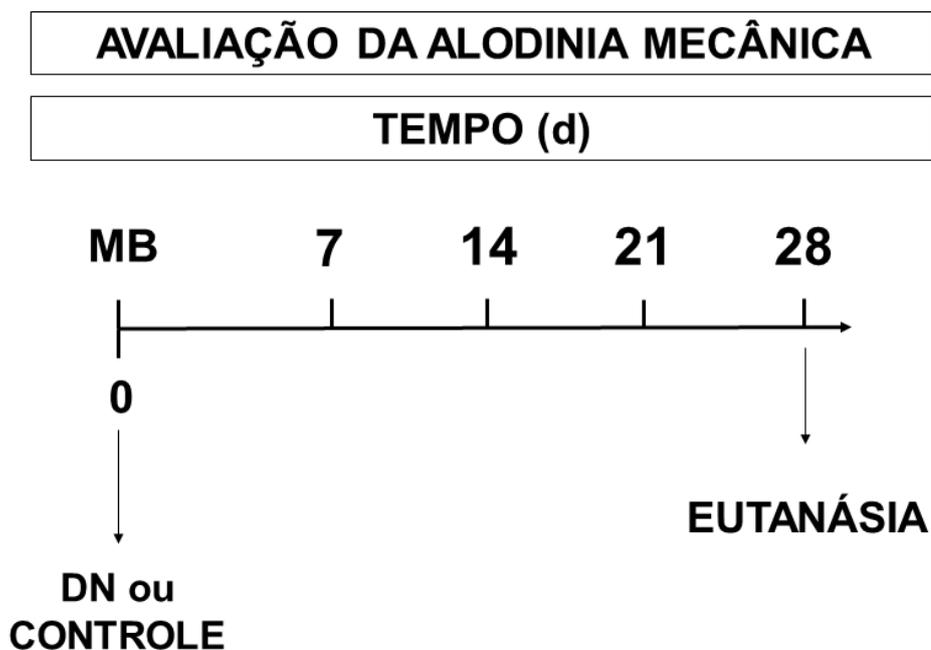
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente, um experimento foi realizado para confirmar a reprodutibilidade do modelo de CCI em induzir DN em nosso laboratório. Assim, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, contendo 6 animais em cada grupo, sendo eles:

- a) animais submetidos ao modelo de dor neuropática de injúria por constrição crônica (DN);
- b) animais falsos operados/controle (controle).

Nos grupos compostos por animais DN ou controle, inicialmente realizou-se uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo, seguida de outras avaliações após 7, 14, 21 e 28 dias após DN ou controle, como mostra o esquema abaixo (FIGURA 14). Ao final do 28º dia de avaliação os animais foram eutanasiados.

Figura 14 — Delineamento experimental da avaliação da alodinia mecânica durante a DN



Fonte: da autora.

Nota: Delineamento experimental da avaliação da alodinia mecânica de animais DN ou controle ao longo dos dias após injúria por constrição crônica. DN: dor neuropática; MB: medida basal.

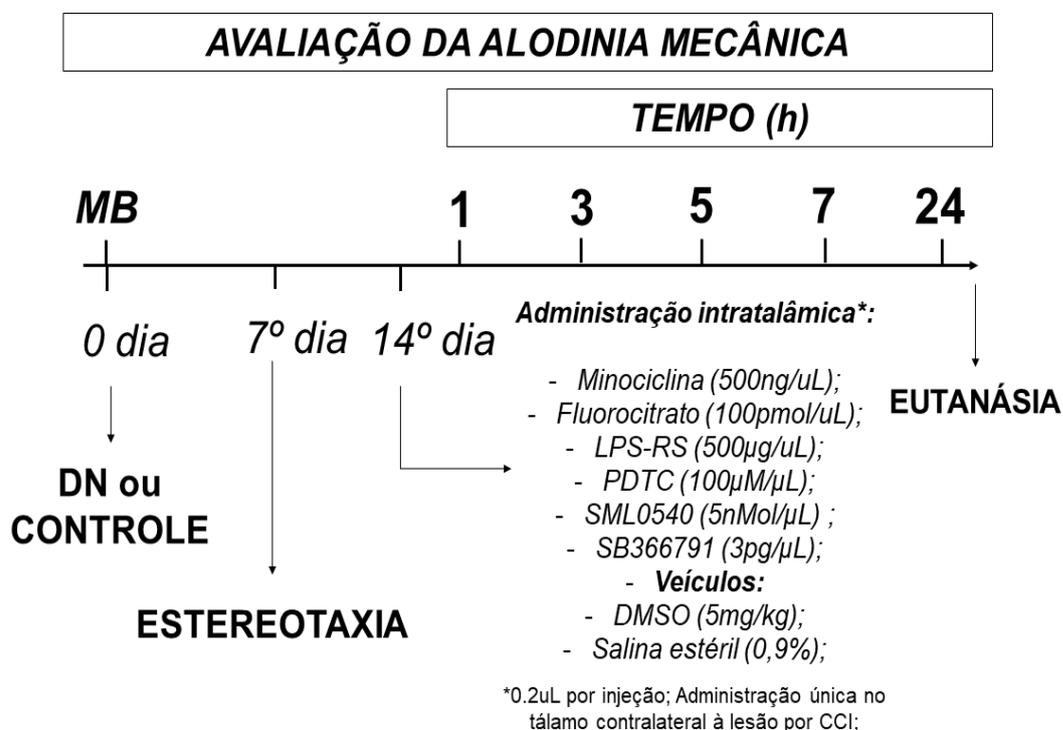
Após verificar se a injúria por constrição crônica do nervo era capaz de mimetizar sintoma de dor neuropática nos animais ao longo dos dias avaliados, o próximo passo analisar o envolvimento da micróglia, astrócitos, TLR4, TRPV₁ e da via MAPKp38/NFκB por meio da administração intratálâmica de inibidores ou antagonistas ou seus respectivos veículos. Para tal, foi realizada uma curva dose-resposta para cada diferente substância, sendo os grupos divididos (n=8) aleatoriamente da seguinte forma:

- a) Grupo DN + minociclina 50ng/μL; DN + minociclina 500ng/μL; Dor neuropática + veículo; Controle + minociclina 500ng/μL; Controle + veículo;
- b) Grupo DN + fluorocitrato 10pmol/μL; DN + fluorocitrato 100pmol/μL; DN + veículo; Controle + fluorocitrato 100pmol/μL; Controle + veículo;
- c) Grupo DN + LPS-RS 50μg/μL; DN + LPS-RS 500μg/μL; DN + veículo; Controle + LPS-RS 500μg/μL; Controle + veículo;

- d) Grupo DN + SB366791 0,3pg/ μ L; DN + SB366791 3pg/ μ L; DN + veículo; Controle + SB366791 3pg/ μ L; Controle + veículo;
- e) Grupo DN + SML0540 0,5 nMol/ μ L; DN + SML0540 5nMol/ μ L; DN + veículo; Controle + SML0540 5nMol/ μ L; Controle + veículo;
- f) Grupo DN + PDTTC 10 μ M/ μ L; DN + PDTTC 100 μ M/ μ L; DN + veículo; Controle + PDTTC 100 μ M/ μ L; Controle + veículo.

Os animais tiveram o limiar nociceptivo avaliado previamente por meio de uma medida basal no dia 0, seguida da cirurgia de estereotaxia (dia 7) e no 14^o dia após a CCI ou Sham foi realizada a administração intratálâmica dos inibidores ou antagonistas nas horas 1, 3, 5, 7 e 24 (FIGURA 15). Ao final da 24^a hora de avaliação os animais foram eutanasiados.

Figura 15 — Delineamento experimental das avaliações da alodinia mecânica de animais com DN após inibição farmacológica



Fonte: da autora.

Nota: Delineamento experimental de animais submetidos à CCI ou Sham (dia 0) seguida da cirurgia de estereotaxia (dia 7) e no 14^o dia de DN a avaliação da alodinia mecânica no período de 1, 3, 5, 7 e 24h após administração intratálâmica das diferentes substâncias no tálamo, frente aos diferentes grupos avaliados. MB: medida basal; CCI: do inglês *chronic constriction injury*; DN: dor neuropática; LPS-RS: Lipopolissacarídeo da *Rhodobacter Sphaeroides*; PDTTC: Ditiocarbamato de pirrolidina; SML0540: oxifenbutazona; SB366791: N-(3-Metoxifenil)-4-clorocinamida; DMSO: Dimetilsulfóxido.

Em seguida, os animais foram submetidos ao teste de rota rod com o intuito de avaliar se havia alteração da coordenação motora frente a cirurgia de estereotaxia (figura 16a). Para isso, em um novo experimento, os animais foram divididos aleatoriamente (n=5) em dois grupos:

- a) Estereotaxia, composto por animais submetidos à cirurgia de estereotaxia;
- b) Controle, composto por animais falso operados.

Novamente, em um novo experimento, os animais foram divididos aleatoriamente (n=8) em diferentes grupos, a fim de verificar a coordenação motora de animais após a microinjeção intratálâmica das diferentes substâncias como segue abaixo:

- a) Grupo DN + minociclina 500ng/ μ L;
- b) Grupo DN + fluorocitrato 100pmol/ μ L;
- c) Grupo DN + LPS-RS 500 μ g/ μ L;
- d) Grupo DN + SB366791 3pg/ μ L;
- e) Grupo DN + SML0540 5 nMol/ μ L;
- f) Grupo DN + PDTC 100 μ M/ μ L.

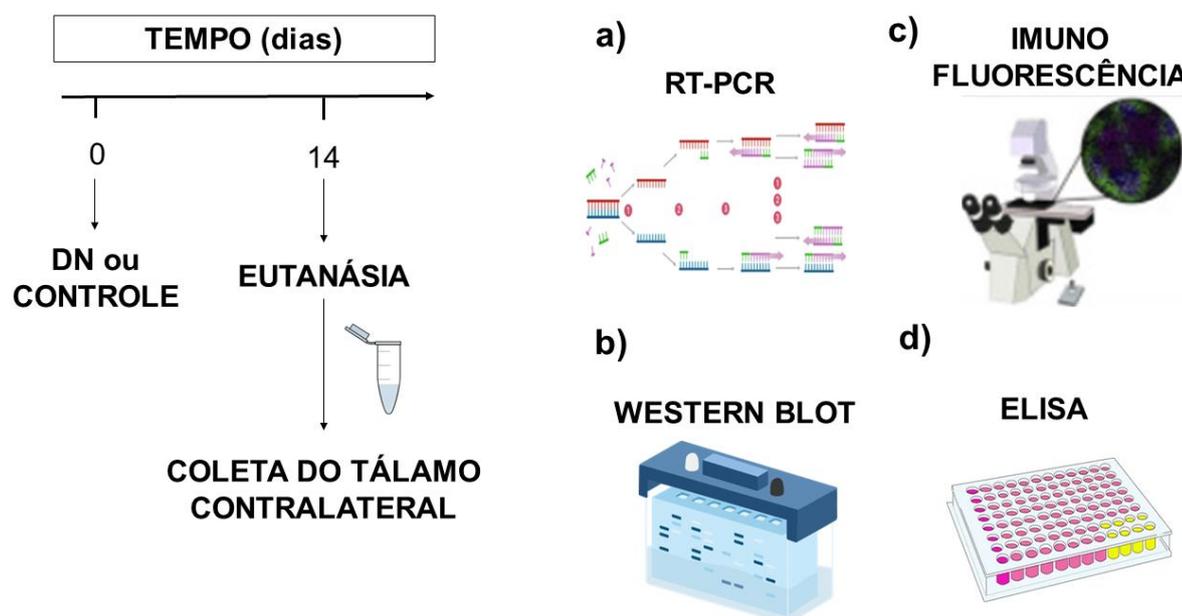
A avaliação da coordenação motora, objetivando verificar um possível efeito sedativo das substâncias, o qual influenciaria na antinocicepção encontrada, seguiu o mesmo protocolo de dias de cirurgia utilizado na avaliação do limiar nociceptivo, assim como foram considerados os maiores efeitos prévios de cada dose das diferentes substâncias administradas na avaliação da coordenação motora. O teste foi composto de uma medida basal, seguida da avaliação na 1^a e 3^a horas após a administração intratálâmica dos respectivos antagonistas/inibidores, como mostra a figura 16B. Logo em seguida, os animais foram eutanasiados.

MB: medida basal; LPS-RS: Lipopolissacarídeo da *Rhodobacter Sphaeroides*; PDTC: Ditiocarbamato de pirrolidina; SML0540: oxifenbutazona; SB366791: N-(3-Metoxifenil)-4-clorocinamida; DMSO: dimetilsulfóxido.

4.7 ENSAIOS MOLECULARES

Inicialmente, os animais foram submetidos à cirurgia de CCI ou controle e, no 14º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos à eutanásia, seguida da extração do tálamo contralateral à lesão, os tecidos retirados e armazenados em *biofreezer* a -80°C até o dia do experimento, como demonstra a figura 17A-D.

Figura 17 (A—D) — Delineamento experimental para a quantificação de genes, proteínas e citocinas no tálamo durante a DN



Fonte: da autora.

Nota: Delineamento experimental de animais submetidos à DN ou controle (dia 0) seguida da eutanásia e coleta do tálamo contralateral no 14º dia após a CCI para a realização dos experimentos moleculares de a) RT-PCR, b) Western Blot, c) imunofluorescência e d) ELISA. CCI: do inglês *chronic constriction injury*; DN: dor neuropática; RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa; ELISA: ensaio de imun absorção enzimática.

4.7.1 Quantificação de proteínas pela análise de Western Blot

A técnica de Western Blot foi utilizada para avaliação dos níveis proteicos de marcadores de micróglia e astrócitos, respectivamente, Iba1 e GFAP, de marcadores de proteínas para TLR4 e TRPV₁, além da fosforilação da MAPK p38 (proteína fosforilada MAPK p38). A coleta do tálamo do hemisfério cerebral esquerdo foi efetuada no 14º dia de neuropatia ou controle.

Os tecidos foram processados em homogeneizador específico de tecidos em solução contendo tampão RIPA (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) associado a inibidores de protease (10%) e fosfatase (1%) (*Sigma-Aldrich*, EUA). Foi utilizada a proporção de aproximadamente de 0,03 g de tecido do tálamo (região do VPM e VPL) para 150 µL de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante de cada amostra armazenados em *biofreezer* a -80°C para posterior utilização.

Foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Bradford para posterior diluição das amostras afim de alcançar 60 µg de proteína cada. Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glicerol, 1% SDS, 10% β-mercaptoetanol e Azul de Bromofenol) e fervidas em banho seco a 95°C por 5 minutos. Para o gel de separação, foi utilizado poliacrilamida em concentração de 8% para TLR4, 10% para GFAP e TRPV₁, 15% para Iba1 e 12% para P-p38.

A eletroforese foi conduzida por meio do aparato *Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-rad, EUA) com corrente de 80V para a passagem das proteínas no gel de entrada e 120V no gel de corrida. Após a conclusão da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, EUA) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (*Bio-rad*, EUA).

A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em solução TBS-*Tween* 20 (TBS-T 1x) até que a solução Ponceau fosse totalmente eliminada e colocada em solução de bloqueio (3% de soro de albumina bovina - BSA), por 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T (1x) por cinco minutos (por cinco vezes) e incubada durante a noite com o anticorpo primário específico.

No dia seguinte, ela foi lavada com TBS-T (1x) por 5 minutos (por 5 vezes) e incubada com o respectivo anticorpo secundário por 2 horas. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (cinco minutos por cinco vezes). Então, as bandas proteicas de interesse, foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio do kit ECL *Clarity* (*Bio-rad*, EUA), de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade e analisadas pelo *software ImageLab* (*Bio-rad*, EUA). A Tabela 1 contém as informações dos anticorpos utilizados e suas especificações.

Tabela 1 — Anticorpos utilizados para a quantificação de proteínas pela técnica de Western Blot

Anticorpo primário				Anticorpo secundário	
Código/Marca	Diluição	Alvo	Peso molecular	Código/Marca	Diluição
016-20001 Wako	1:500	Iba1	17 kDa	Sigma Aldrich sc-2004 anti-rabbit igG-HRP	1:2000
PA1239 Boster	1:1000	GFAP	49 kDa	Sigma Aldrich A9044 anti-mouse igG-HRP	1:2000
482300 Life Technologies	1:1000	TLR4	100 kDa	Sigma Aldrich sc-2004 anti-rabbit igG-HRP	1:2000
75-254 Origene	1:1000	TRPV ₁	100 KDa	Sigma Aldrich A9044 anti-mouse igG-HRP	1:2000
Cell Signalling 4511	1:1000	P-p38	43 KDa	Sigma Aldrich sc-2004 anti-rabbit igG-HRP	1:5000
Cell Signalling 9212	1:1000	P38 total	40KDa	Sigma Aldrich sc-2004 anti-rabbit igG-HRP	1:5000
A2228 Sigma Aldrich	1:25000	β -actina HRP	42 kDa	conjugado	1:25000

Fonte: da autora.

Nota: kDa: do inglês: kilodaltons; Iba1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; TLR4: receptor toll like 4; TRPV1: canal catiônico de potencial receptor transiente 1.

4.7.2 Quantificação da expressão gênica de RNAm pela técnica de RT-PCR

A análise da expressão gênica de alvos envolvidos na dor neuropática induzida pela cirurgia de constrição do nervo (CCI) ou sham, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). Avaliou-se um marcador para cada alvo, sendo eles: micróglia, astrócito, os receptores TLR4 e TRPV₁, além do gene constitutivo (SDHA). Um resumo das informações sobre os *primers* utilizados e seus respectivos genes-alvo pode ser encontrado na Tabela 2.

A porção do tálamo do hemisfério cerebral esquerdo foi coletada após eutanásia dos animais no 14º dia de neuropatia, armazenada em solução trizol a 80°C e submetida à extração de RNA total. A quantificação do RNA total foi avaliada por leitura espectrofotométrica usando o NanoDrop ND1000 (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, EUA). Em seguida, 1µg de RNA total foi incubado com DNase por 15 min em termociclador a 37°C para eliminar possível contaminação com DNA genômico.

Então, o RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *primers Oligo dT e SuperScript IV First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiro, o *primer Oligo dT*, a mistura de DNTP e o RNA total foram aquecidos a 65°C por 5 min. Em seguida, o tampão 5X RT, DTT, inibidor de ribonuclease e *SuperScript IV* transcriptase reversa foram adicionados ao RNA recozido e incubados a 55°C por 30 min e depois a 80°C por 10 min para promover a inativação da enzima.

A expressão de genes-alvo foi investigada usando o Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) no Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil). Todas as reações foram realizadas obtendo um volume final de 25 µL e os genes foram amplificados nas seguintes condições experimentais: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 s, seguido de anelamento a 60°C e extensão por 1 min (40 ciclos).

A normalização dos valores de expressão dos genes-alvo foi realizada por meio da expressão do gene constitutivo SDHA. O método $\Delta\Delta C_t$ com correção de eficiência foi empregado para calcular a expressão relativa de cada gene, e uma amostra de controle foi usada como calibrador (Pfaffl, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram medidos através do perfil de amplificação de cada amostra, utilizando o programa LinRegPCR, conforme recomendado por Ramakers e colaboradores (Ramakers *et al.*, 2003).

Tabela 2 — Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação pela PCR em tempo real

Gene	Sequência
<i>sdha</i>	F: 5'- GGAACACTCCAAAAACAGACCT-3' R: 5'- CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA-3'
<i>gfap</i>	F: 5'- TCGACATCGCCACCTACAG-3' R: 5'- GTCTGTACAGGAATGGTGATGC-3'
<i>tlr4</i>	F 5'- CCTGACACCAGGAAGCTTGAA-3' R 5'- TCTGATCCATGCATTGGTAGGT-3'
<i>trpv1</i>	F 5'- ACCACGGCTGCTTACTATCG-3' R 5'-CGGAAATAGTCCCCAACGGT-3'
<i>tmem119</i>	F: 5'- GTGTCTAACAGGCCCCAGAA-3' R: 5'- AGCCACGTGGTATCAAGGAG-3'

Fonte: da autora.

Nota: F = *forward primer*; R = *reverse primer*; pb = pares de base.

4.7.3 Co-localização de células da glia e de receptores TLR4 no tálamo durante a dor neuropática

Com a finalidade de localizar os receptores TLR4, astrócitos e micróglia no tálamo de animais com e sem dor neuropática, foi realizado o ensaio de imunofluorescência em secções da região do tálamo ventrobasal. Para tal procedimento, os animais foram inicialmente submetidos a cirurgia de CCI ou sham, como mostra a figura 17c. Após 14 dias da cirurgia esses mesmos animais foram anestesiados i.p. com um mix de ketamina e xilazina (nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, em um volume de 0,1 mL/kg) e perfundidos

transcardialmente com solução salina seguida por 4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4).

Os tálamos dos hemisférios esquerdos (contralateral) de animais CCI e sham foram removidos e pós-fixados durante 2h, em PFA a 4% e armazenados durante 48h em 30% de sacarose para crioproteção. A recuperação antigênica foi realizada com tampão TRIS-EDTA a 0,1 M em pH 9,0, durante 45 minutos, em banho de água a 70-80 °C. As lâminas foram, então, lavadas três vezes em água destilada durante 5 minutos em cada lavagem seguido de uma lavagem em metanol por mais 5 minutos e por fim lavadas em TBS a 0,1 M. A permeabilização foi feita incubando os cortes em TBS a 0,1 M com 0,1% de triton (TBS-T) durante 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram incubados com solução de bloqueio contendo BSA 2% por 60 minutos. Imediatamente após esse procedimento, os cortes foram incubados durante 24 horas em geladeira com os anticorpos primários anti-Iba1, anti-GFAP e anti-TLR4 diluídos em solução de bloqueio a 1%. Após o período de 24 horas de incubação, as lâminas foram lavadas em TBS a 0,1 M durante 15 minutos e, posteriormente, incubadas com os anticorpos secundários (*Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG*, 1:1000 e *Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG*, 1:1000) por 60 minutos, período no qual o material permaneceu no escuro (TABELA 3).

As lâminas foram novamente lavadas em TBS a 0,1 M por 15 minutos e, finalmente, montadas utilizando meio de montagem com DAPI (Anjos-Garcia; Coimbra, 2019). As lâminas contendo os cortes histológicos foram analisadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência e as imagens capturadas por uma câmera digital (Zeiss).

Tabela 3 — Anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência

(continua)

Anticorpos primários			Anticorpos secundários
Código/Marca	Diluição	Alvo	Código/Marca
016-20001	1:500	Iba1	<i>Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG</i> ,
Wako			1:1000

Tabela 3 — Anticorpos utilizados para a técnica de imunofluorescência
(conclusão)

Anticorpos primários			Anticorpos secundários
Código/Marca	Diluição	Alvo	Código/Marca
PA1239	1:500	GFAP	
Boster			<i>Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse</i>
482300			IgG, 1:1000
Life Technologies	1:500	TLR4	

Fonte: da autora.

Nota: Iba1: molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1; GFAP: proteína glial fibrilar ácida; TLR4: receptor toll like 4; IgG: imunoglobulina.

4.7.4 Quantificação dos níveis de citocinas pró inflamatórias no tálamo por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática

Para avaliar a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α no tálamo contralateral à lesão por constrição crônica do nervo (CCI) ou falso operados (sham), foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática. A extração do tálamo contralateral foi realizada de acordo com o protocolo de extração pré-estabelecido em laboratório após a eutanásia. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados e o homogenato foi centrifugado a 3,000rpm por 10 minutos em uma temperatura de 4°C e então os sobrenadantes foram retirados e armazenados em criotubos em um *biofreezer* a uma temperatura de -80°C até o momento da análise.

No dia da análise, os níveis talâmicos de IL-1 β e TNF- α foram dosados por meio de kits específicos (Peprotech, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise, microplacas com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura durante a noite e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de BSA por 2 horas.

Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubadas com o anticorpo de detecção, com a solução de avidina-peroxidase e posteriormente adicionada uma solução cromogênica para as leituras das reações colorimétricas, as quais foram realizadas a 405nm de comprimento em um leitor de microplacas (*Synergy H1*,

BioTek, EUA). Os cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras. Na figura 17d encontra-se o delineamento experimental do ensaio.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias para os testes comportamentais, seguido pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e para os ensaios moleculares, foi utilizado o teste T. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas e elaboração de gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5.0*.

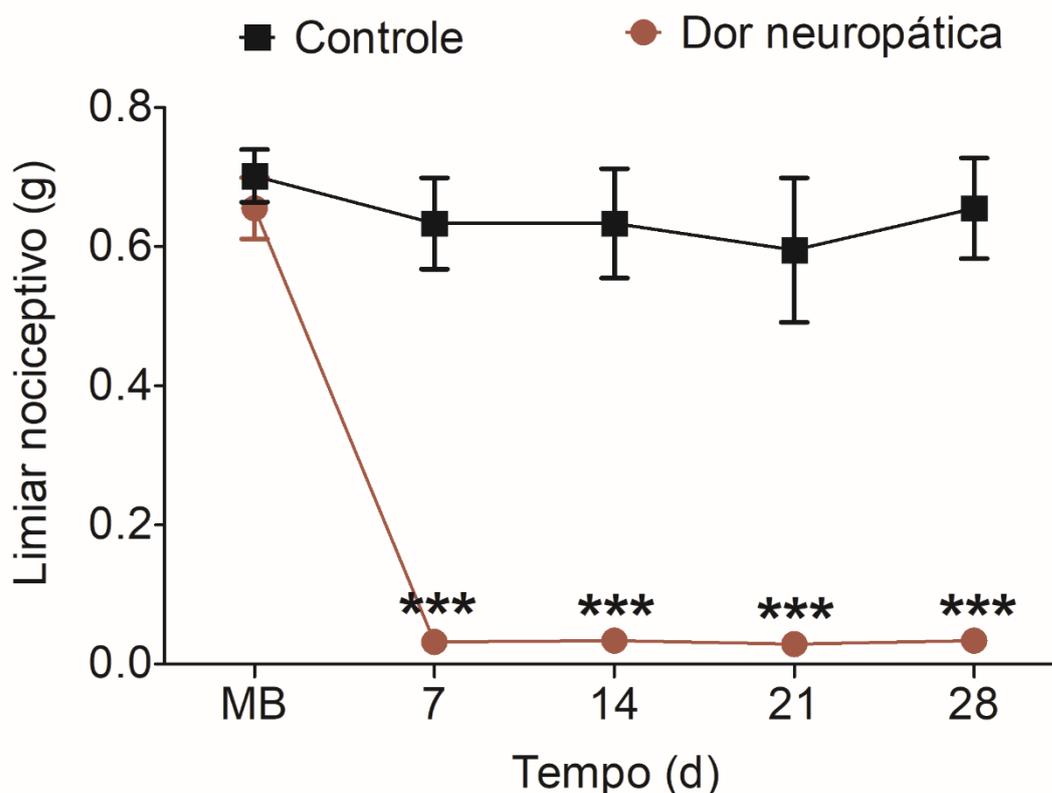
5 RESULTADOS

Abaixo estão descritos detalhadamente os resultados obtidos no presente estudo:

5.1 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO APÓS INDUÇÃO DE DOR NEUROPÁTICA

Já está bem descrito na literatura que a cirurgia de injúria por constrição crônica (CCI) reproduz alodinia mecânica em animais submetidos a ela. Em nossos resultados, encontramos uma redução significativa do limiar nociceptivo dos animais submetidos a CCI do 14^o ao 28^o dia de P.O ($P < 0,001$, $F_{1,10}=7.73$), quando comparado ao grupo controle, como demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 — Avaliação do limiar nociceptivo durante a dor neuropática



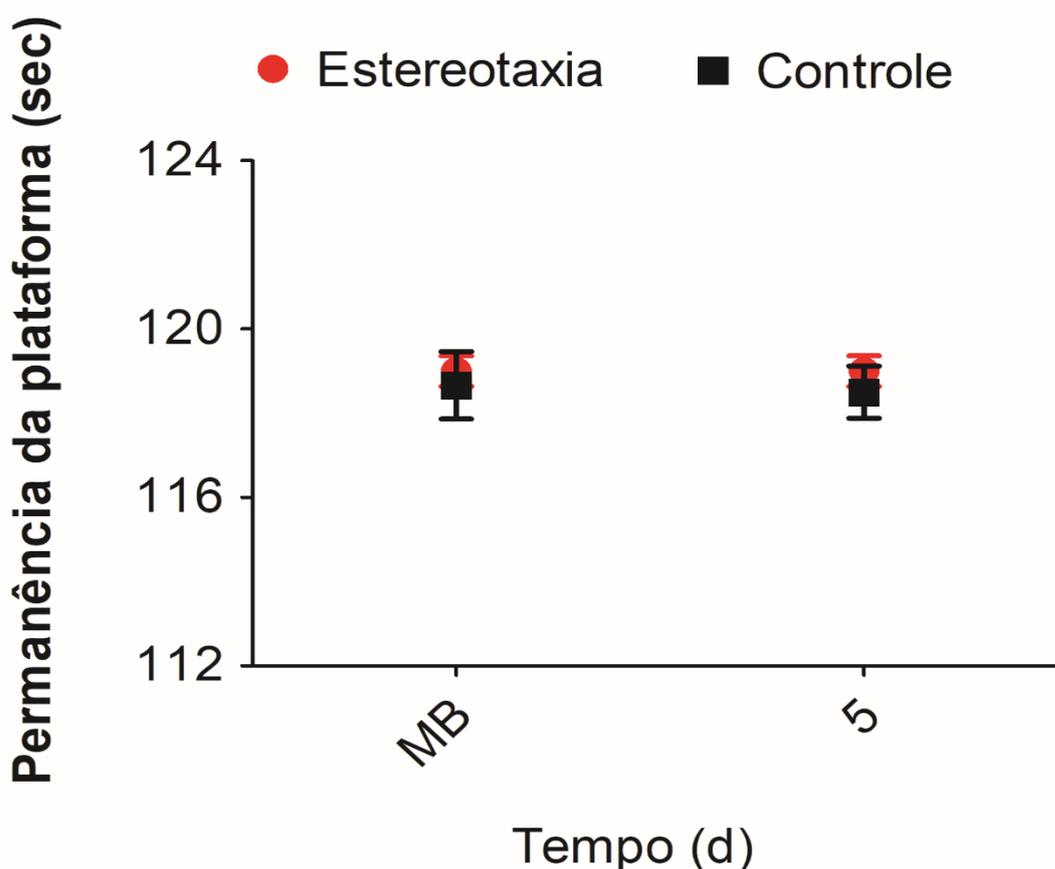
Fonte: da autora.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle. N=6 animais por grupo. DN: dor neuropática; MB: medida basal do limiar nociceptivo.

5.2 AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA APÓS ESTEREOTAXIA

Após verificar o sítio de injeção das diferentes substâncias na região do tálamo ventrobasal, nós avaliamos em um novo experimento se a cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia exerce influência na coordenação motora dos animais por meio do teste rota rod. Os animais foram avaliados 5 dias após a estereotaxia ou controle (ou seja, sem canulação). De acordo como gráfico 2, pode-se verificar que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

Gráfico 2 — Avaliação da coordenação motora após estereotaxia



Fonte: da autora.

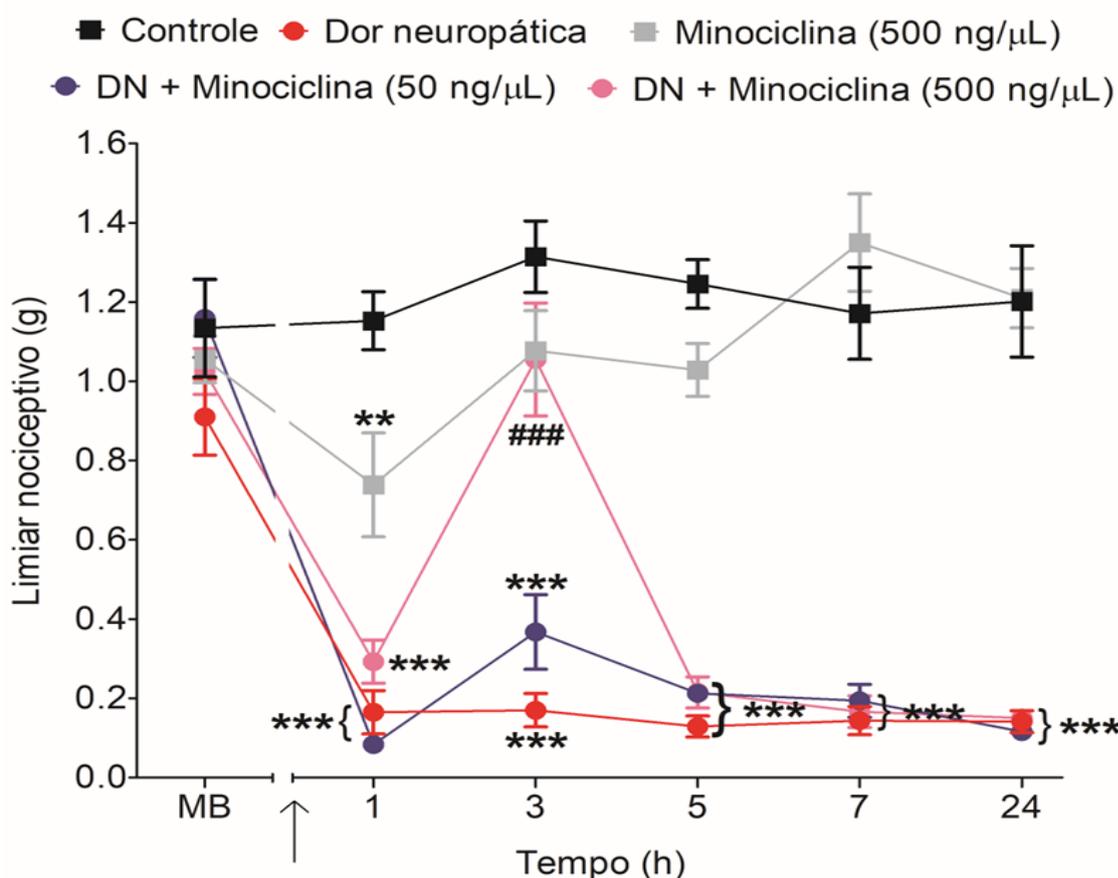
Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. do tempo em segundos (s). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; N amostral=6 animais por grupo. MB: medida basal.

5.3 ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DA GLIA NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Estudos prévios na literatura já demonstram que as células gliais, micróglia e astrócito, são um grupo de células que participa diretamente na sensibilização da dor, principalmente a nível espinhal. Ao serem ativadas, essas células podem liberar mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a hipernocicepção neuronal e manutenção do estado de sensibilização central (Milligan; Watkins, 2009). Apesar de o papel dessas células na sensibilização central ser bem estabelecido na literatura à nível espinhal, não se pode dizer o mesmo delas à nível talâmico. Sendo assim, nós verificamos a participação dessas células no tálamo ventrobasal após DN.

Para isso, foi administrada a minociclina, um inibidor de ativação da micróglia, por via intratalâmica, nas doses de 50 e 500 ng/ μ L. Os resultados demonstraram uma redução da alodinia mecânica na 3ª hora após a injeção de minociclina na dose de 500 ng/ μ L ($P < 0,001$, $F_{7,56}=13.60$), quando comparado ao grupo dor neuropática. Não foi observada nenhuma alteração da alodinia mecânica após a administração da minociclina na dose de 50 ng/ μ L, como demonstrado no gráfico 3.

Gráfico 3 — Avaliação da participação da micróglia talâmica na dor neuropática

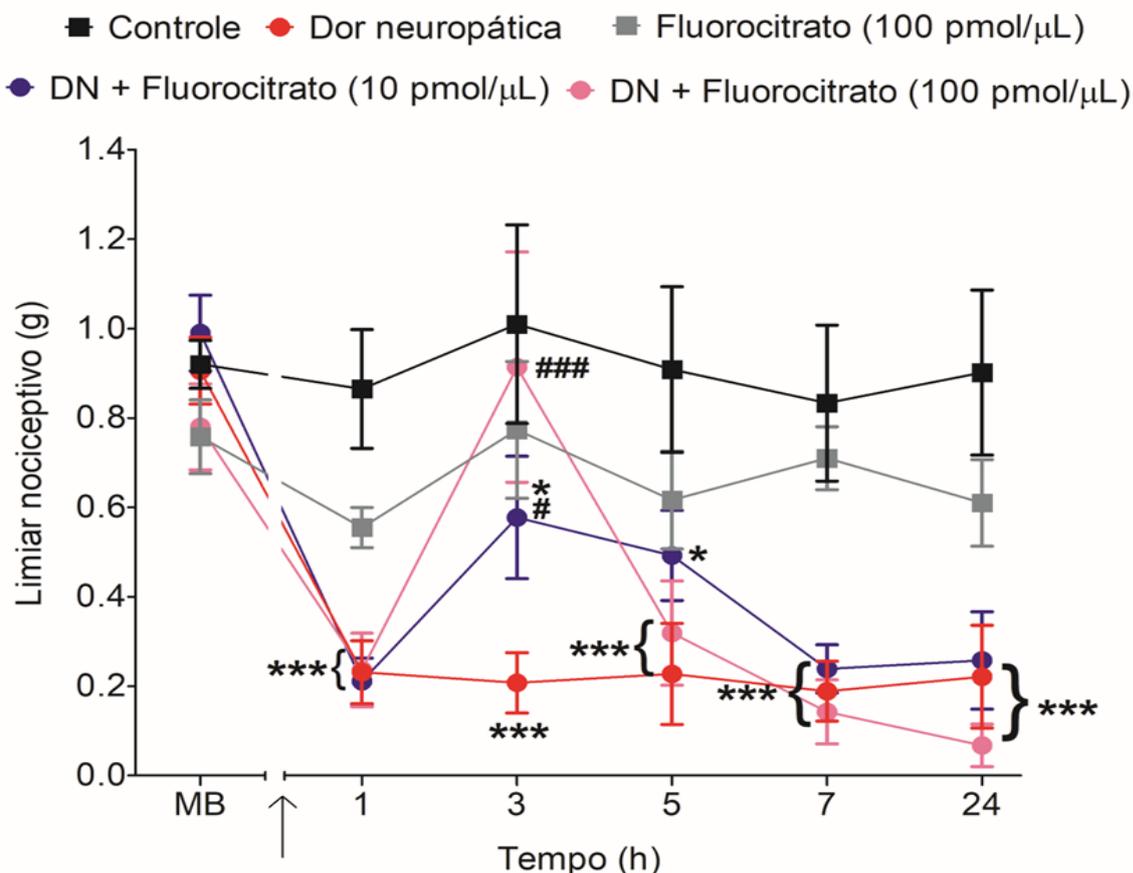


Fonte: da autora.

Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratalâmica de minociclina ou veículo nos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; ** indica significância estatística ($P < 0,01$) e *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle; ### indica significância estatística ($P < 0,001$ em relação grupo dor neuropática; N amostral=8 animais por grupo. DN: dor neuropática; MB: medida basal.

De maneira semelhante aos resultados acima, houve redução da alodinia mecânica nos animais que foram tratados com um inibidor de astrócitos, o fluorocitrato na 3h em ambas as doses administradas, sendo a maior dose mais significativa ($P < 0,001$, $F_{4,35}=13.60$) em relação ao grupo dor neuropática (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 — Avaliação da participação dos astrócitos talâmicos na dor neuropática



Fonte: da autora.

Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratálâmica de fluorocitrato ou veículo nos grupos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; * indica significância estatística ($P < 0,05$) e *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle; # indica significância estatística ($P < 0,05$) e ### indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo dor neuropática; N amostral = 8 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal.

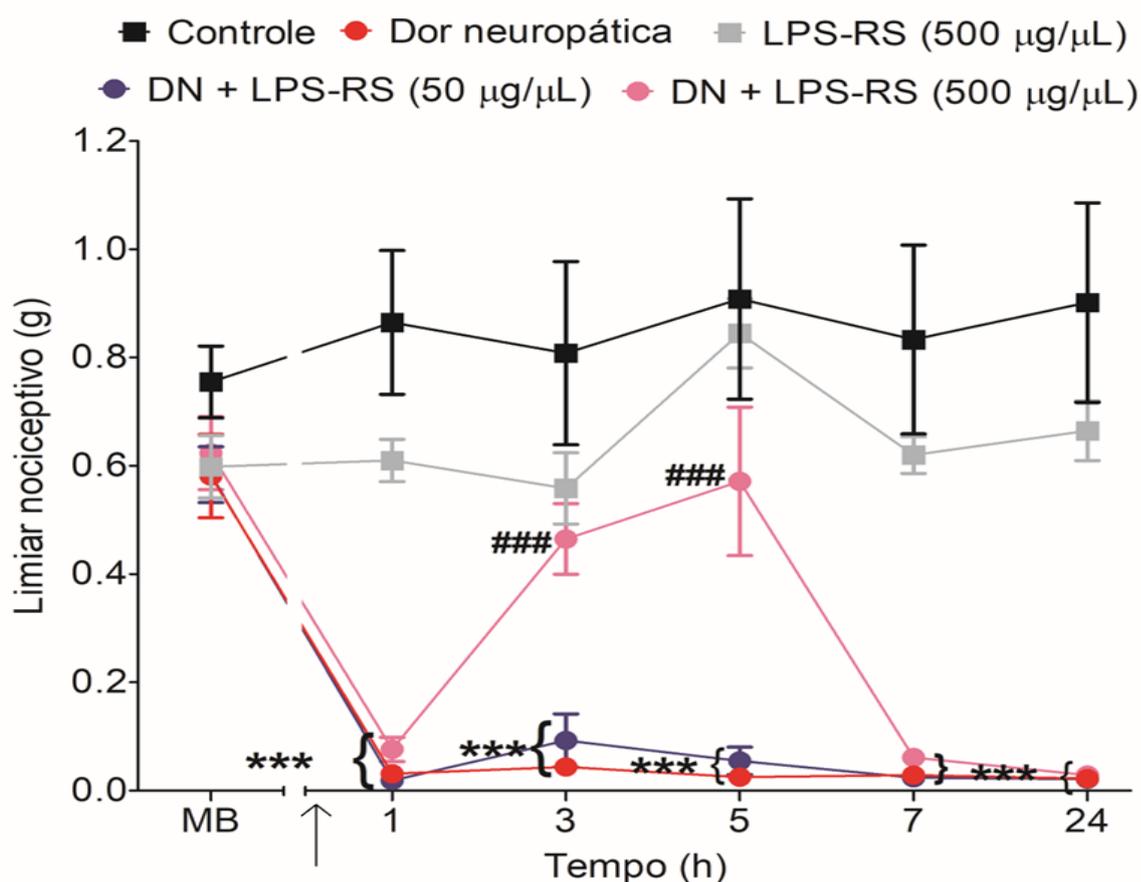
5.4 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TLR4 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

O receptor *Toll like 4* se destaca por ser um receptor de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano ou ao patógeno, o que faz dele um importante receptor desencadeador de respostas imunes e de defesa do organismo (Akira; Takeda, 2004; Krock et al., 2018).

A ativação de células da glia por meio do TLR4 na medula espinhal, após injúria do nervo ou de tecidos, tem sido relatada por pesquisas prévias (Elisei *et al.*, 2020; Malta *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2020). Porém, na região do tálamo ventrobasal, o qual também é importante na modulação da dor à nível supra-espinhal, há ainda, pouca evidência.

Portanto, a fim de avaliar a participação do TLR4 à nível talâmico em animais submetidos a DN (14^o dia), o tratamento com LPS-RS, um antagonista do TLR4 demonstrou uma redução da alodinia mecânica da 3^a até a 5^a hora na dose de 500µg/µL ($P < 0,001$ $F_{7,56}=13.60$) quando comparados ao grupo dor neuropática. Não houve diferença estatística no grupo tratado com a dose de 50 µg/µL (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 — Avaliação da participação do TLR4 talâmico durante a DN



Fonte: da autora.

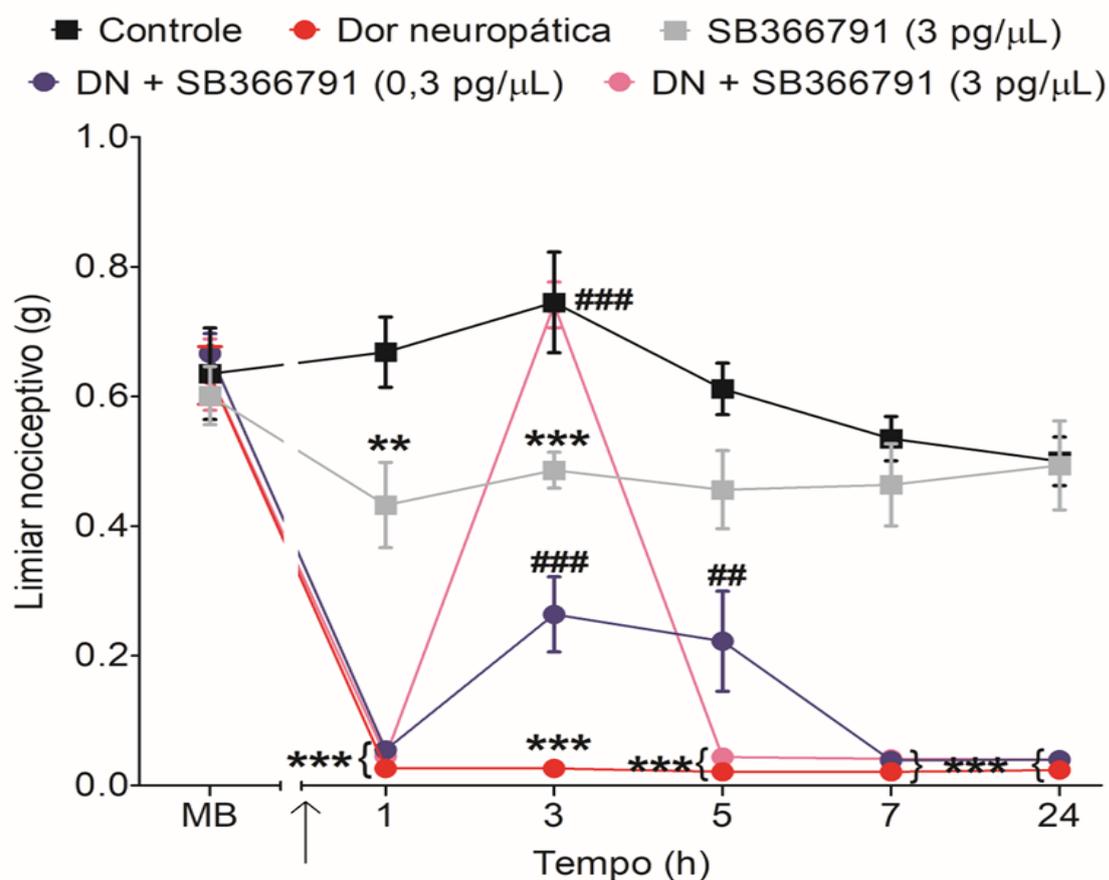
Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratálâmica de LPS-RS ou veículo nos grupos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle; ### indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo dor neuropática; N amostral=8 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal; LPS-RS: lipopolissacarídeo *Rodhobacter sphaeroides*.

5.5 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO TRPV₁ NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

O TRPV₁ é um importante integrador molecular de estímulos químicos e de calor nocivo no sistema nervoso periférico e central, determinando respostas nociceptivas. Já é sabido que ele também pode ser expresso em células gliais, como astrócitos e micróglia (Miyake *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019).

Baseado nessas evidências, avaliamos a participação do TRPV₁ no tálamo de animais com neuropatia por meio do tratamento único com SB366791, um inibidor de TRPV₁ nas doses de 0,3 e 3 pg/μL. Houve redução da alodinia mecânica na 3ª hora (P < 0,001 F_{7,56}=15.95) após a administração do inibidor na dose de 3 pg/μL, enquanto na menor dose essa redução foi observada da 3ª até a 5ª hora (P < 0,001 F_{7,56}=15.95) pós administração relação ao grupo dor neuropática, como mostra o gráfico 6.

Gráfico 6 — Avaliação da participação do TRPV₁ talâmico durante a DN



Fonte: da autora.

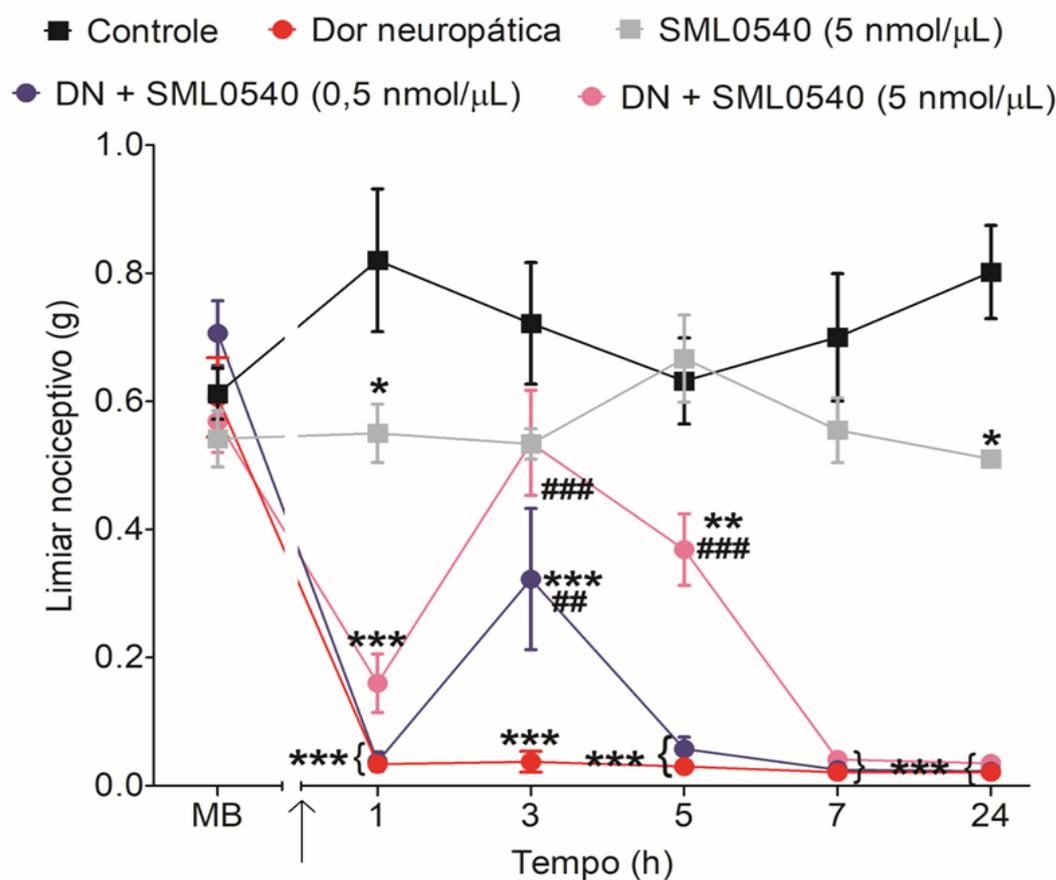
Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratálâmica de SB366791 ou veículo nos grupos diferentes grupos. Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; ** indica significância estatística (P < 0,01) e *** indica significância estatística (P < 0,001) em relação ao grupo controle; ## indica significância estatística (P < 0,01) e ### indica significância estatística (P < 0,001) em relação ao grupo dor neuropática; N amostral=8 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal; SB366791: inibidor do receptor transiente do potencial vanilóide 1 (TRPV₁).

5.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA MAPK P38 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Uma vez identificada a participação das células da glia, bem como dos receptores TLR4 e TRPV₁ no tálamo em animais com DN, hipotetizamos a participação da via da MAPK p38, visto que essa via é amplamente ativada em resposta a lesões/injúrias periféricas e/ou centrais. Ao passo que, ao ser ativada, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular seguida de produção e liberação de citocinas pró inflamatórias, como TNF α e IL1 β , potencializando sensibilização central da dor (Bachstetter; Eldik, 2010; Ji; Suter, 2007; Leblanc *et al.*, 2011; Mika *et al.*, 2013).

Portanto, para avaliar a participação da via da MAPK p38, os animais com CCI ou sham foram tratados com uma única injeção intratálâmica de SML0540, um inibidor de MAPK p38. Verificou-se uma redução da alodinia mecânica da 1^a hora até a 5^a hora ($P < 0,001$ $F_{7,56}=12.87$) no grupo tratado com a dose de 5 nmol/ μ L. Enquanto na dose de 0,5 nmol/ μ L, o grupo tratado com SML0540 exibiu uma diminuição da alodinia mecânica apenas na 3^a hora após a administração da substância ($P < 0,001$ $F_{7,56}=12.87$) em comparação ao grupo dor neuropática (GRÁFICO 7).

Gráfico 7 — Avaliação da participação da via MAPK p38 talâmica durante a DN



Fonte: da autora.

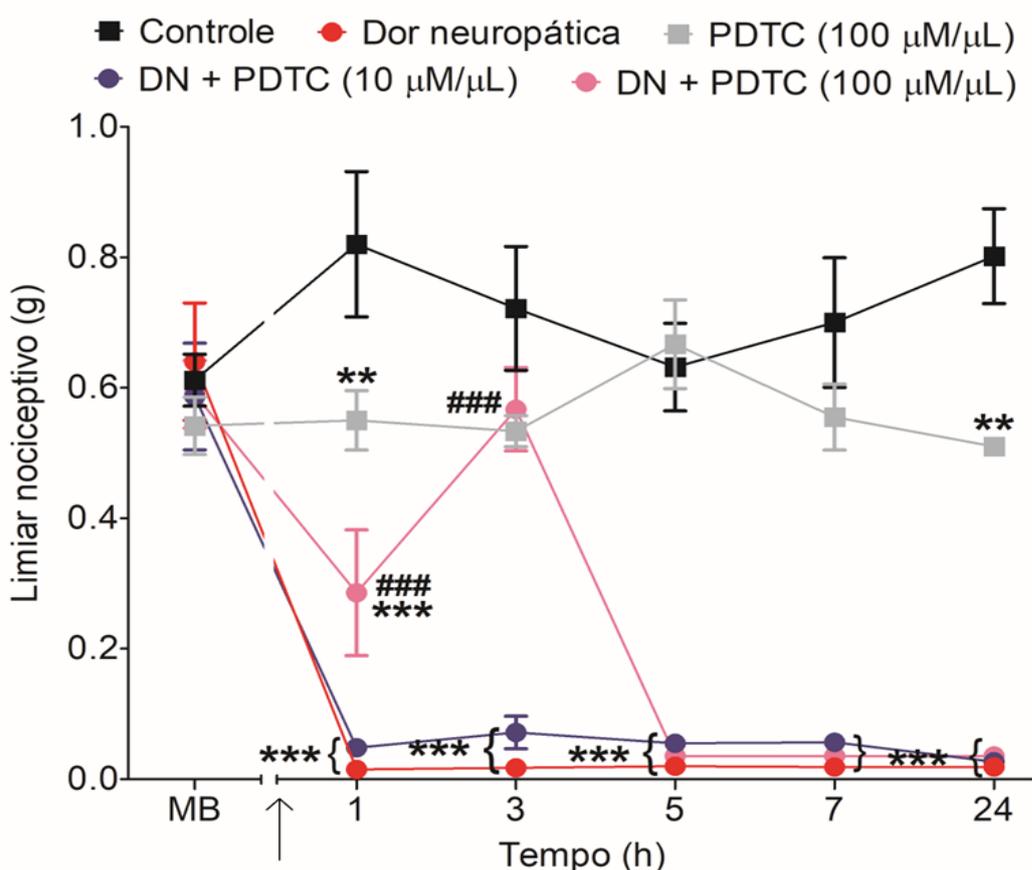
Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratálâmica de SML0540 ou veículo nos grupos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; * indica significância estatística ($P < 0,05$), * indica significância estatística ($P < 0,01$) e *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle; ## indica significância estatística ($P < 0,01$) e ### indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo dor neuropática; N amostral=8 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal; SML0540: inibidor da proteína quinase p38 ativada por mitógenos (MAPK p38).

5.7 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO NFκB NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

O fator de transcrição *kappa* B (NFκB), é um importante fator que controla diversas expressões gênicas relacionadas às respostas inflamatórias como ocorre, por exemplo, quando a via MAPK p38 é ativada (Ji; Suter, 2007).

Sendo assim, para tal comprovação, os animais foram previamente tratados com PDTC, um inibidor de NFκB, nas doses de 10 e 100 μM/μL. Os animais avaliados exibiram uma redução significativa na alodinia mecânica na dose de 100 μM/μL da 1ª hora após administração intratálâmica até a 3ª hora ($P < 0,001$ $F_{7,56}=13.19$) comparados ao grupo dor neuropática. Já na dose de 10 μM/μL essa redução não pode ser observada, como mostra o gráfico 8.

Gráfico 8 — Avaliação da participação do NFκB talâmico durante a DN



Fonte: da autora.

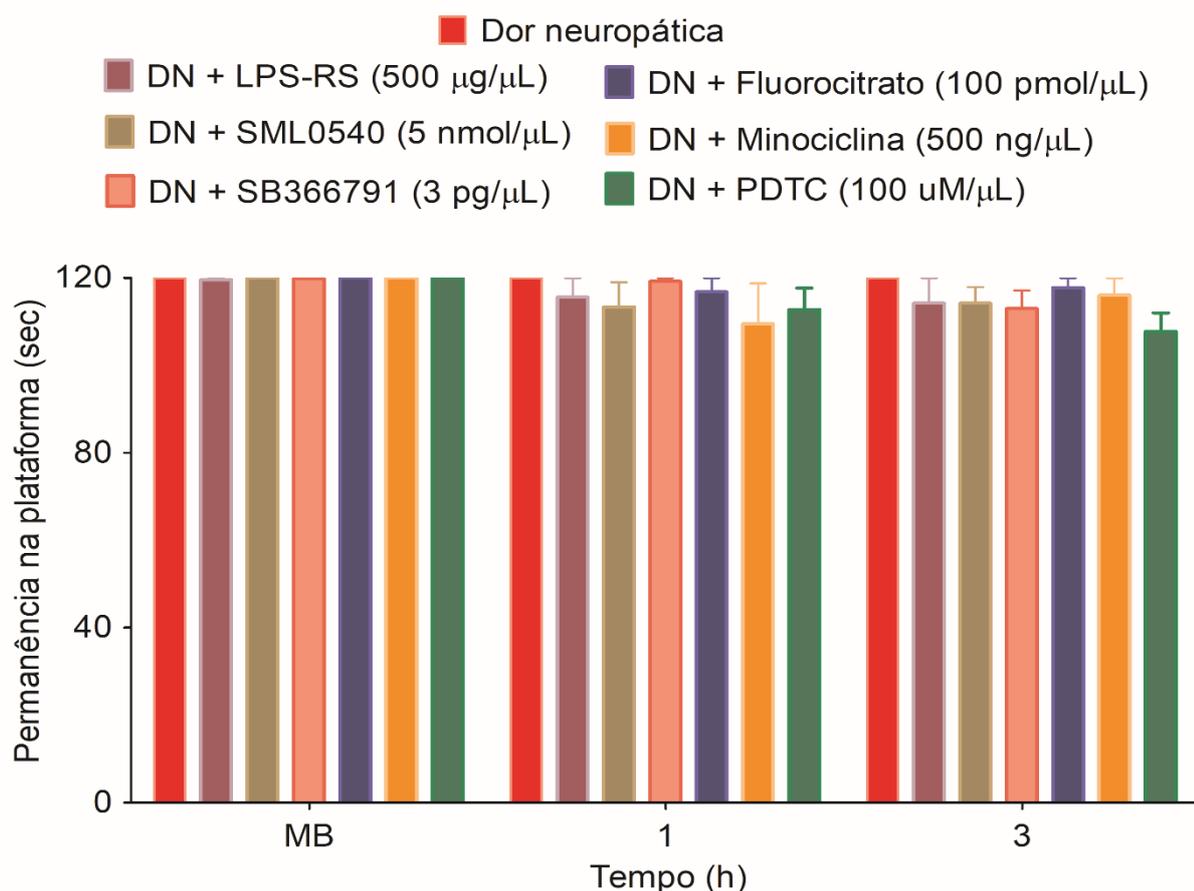
Nota: A seta indica o 14º dia de DN ou controle, período em que foi realizada a administração intratálâmica de PDTC ou veículo nos grupos diferentes grupos. Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; ** indica significância estatística ($P < 0,01$) e *** indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle; ## indica significância estatística ($P < 0,01$) e ### indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo dor neuropática; N amostral = 8 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal; PDTC: Ditiocarbamato de pirrolidina.

5.8 ANÁLISE DA COORDENAÇÃO MOTORA APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRATALÂMICA DE SUBSTÂNCIAS

Observadas as respostas antialodínicas após a administração dos inibidores/antagonistas em experimentos prévios, certificou-se a respeito da ação das substâncias injetadas no tálamo de animais com DN.

Para tal, nós avaliamos a coordenação motora dos animais após administração única das diferentes substâncias no 14º dia de DN e avaliamos por 1 e 3 horas após a administração delas. Como resultado, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos em nenhuma hora testada em comparação ao grupo dor neuropática, demonstrando que as doses utilizadas das diferentes substâncias não exerceram efeitos prejudiciais à coordenação motora dos animais, descartando assim o efeito sedativo das mesmas (GRÁFICO 9).

Gráfico 9 — Avaliação da coordenação motora de animais com DN após administração intratálâmica dos respectivos antagonistas ou inibidores



Fonte: da autora.

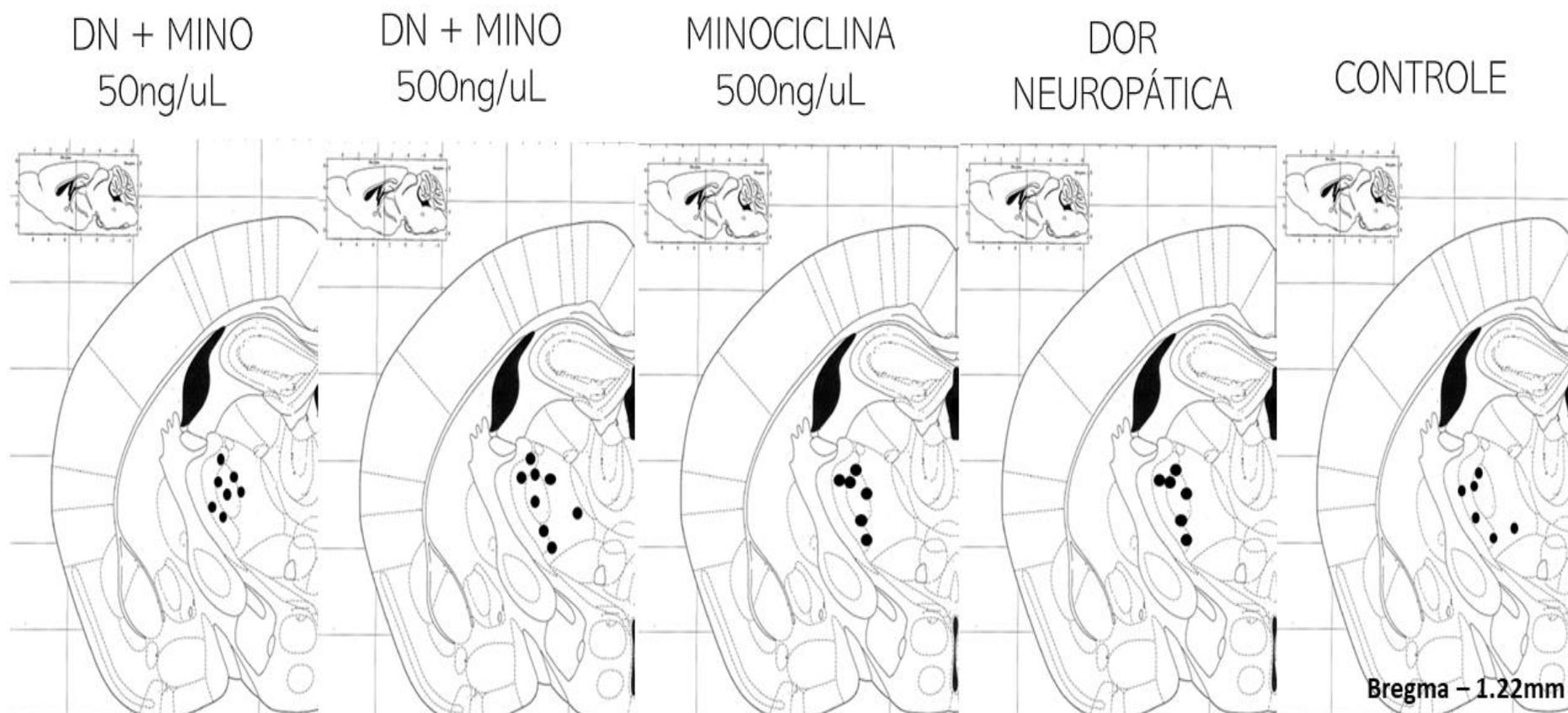
Nota: Avaliação da coordenação motora após tratamento com os respectivos inibidores ou antagonistas das células da glia, receptores TLR4 e TRPV₁, da via MAPKp38 e do NF κ B ou veículo, administrados no tálamo contralateral à lesão por constrição crônica. Os dados representam a média \pm E.P.M. do tempo (s). Os dados foram analisados utilizando *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; N amostral = 5 animais por grupo; DN: dor neuropática; MB: medida basal; LPS-RS: lipopolissacarídeo *Rodhobacter sphaeroides*; SML0540: oxifenbutazona; SB366791: N-(3-Metoxifenil)-4-clorocinamida; PDTC: Ditiocarbamato de pirrolidina.

5.9 ANÁLISE DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO TÁLAMO

Os locais de microinjeção intratálâmica foram histologicamente confirmados para a investigação dos efeitos antialodínicos dos inibidores e antagonistas de cada alvo, como mostra a figura 18A—G.

Figura 18 (A—G) — Sítios de microinjeção de substâncias no tálamo

a)



b)

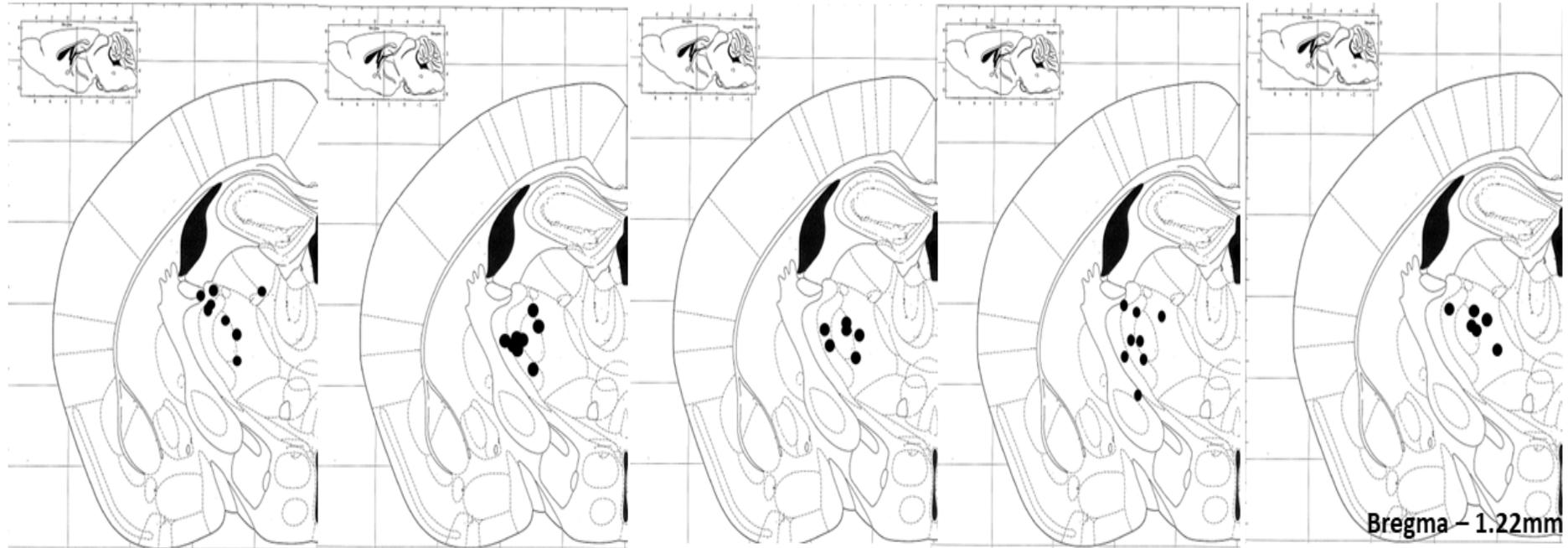
DN +
FLOROCITRATO
10pmol/uL

DN+
FLUOROCITRATO
100pmol/uL

FLUOROCITRATO
100pmol/uL

DOR
NEUROPÁTICA

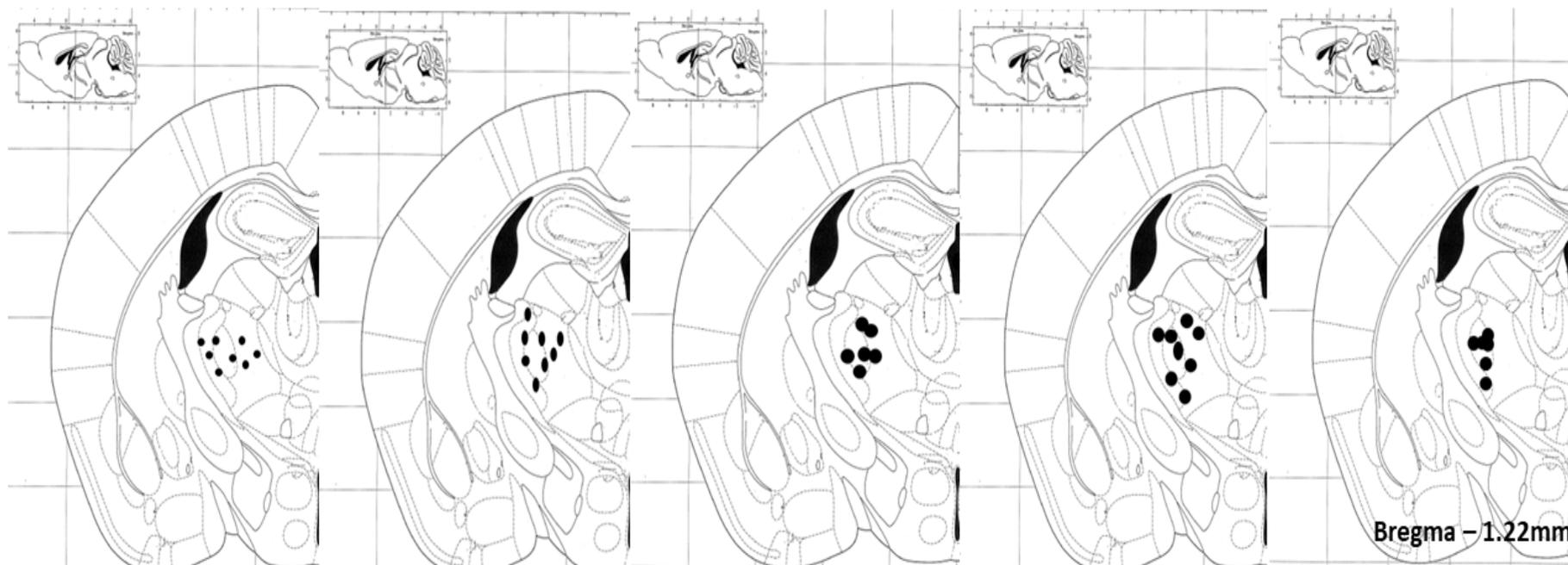
CONTROLE



c)

DN+ LPS-RS 500
ug/uLDN + LPS-RS 50
ug/uLLPS-RS
500ug/uLDOR
NEUROPÁTICA

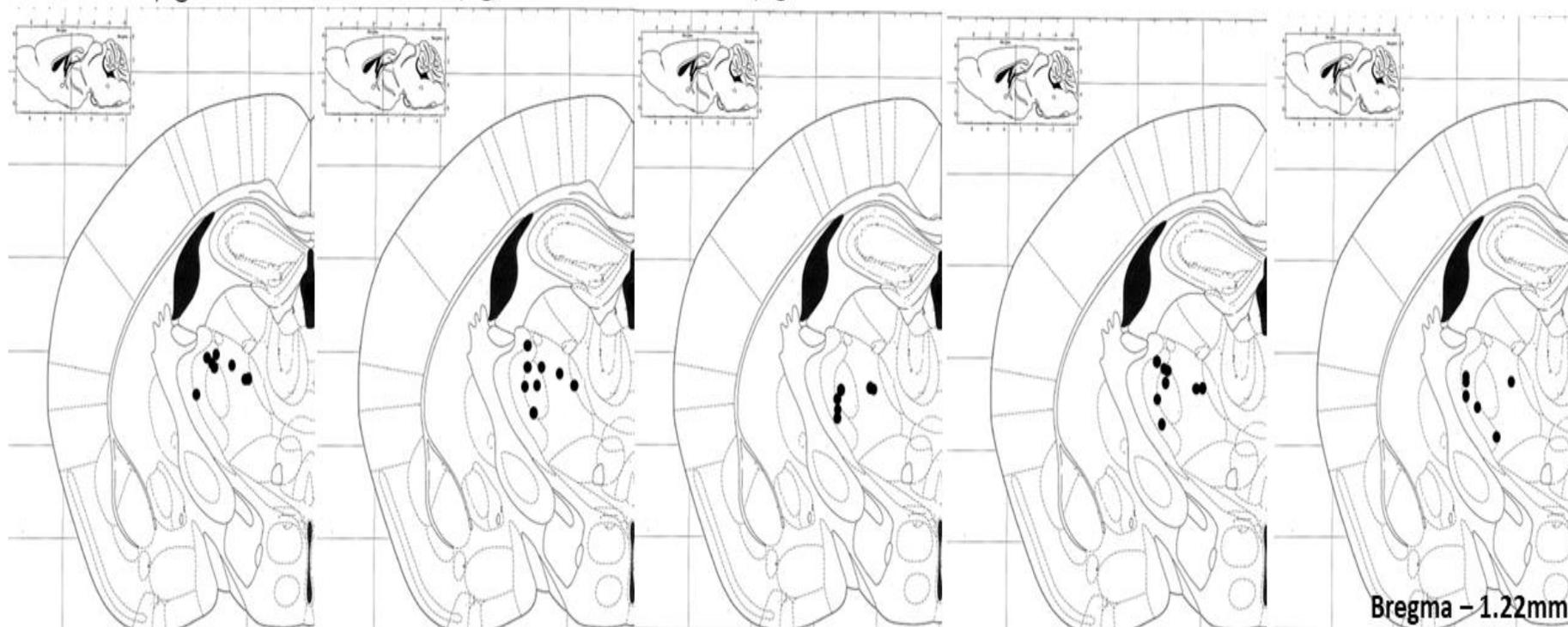
CONTROLE



d)

DN + SB366791
0,3pg/uLDN + SB366791
3 pg/uLSB366791 3
pg/uLDOR
NEUROPÁTICA

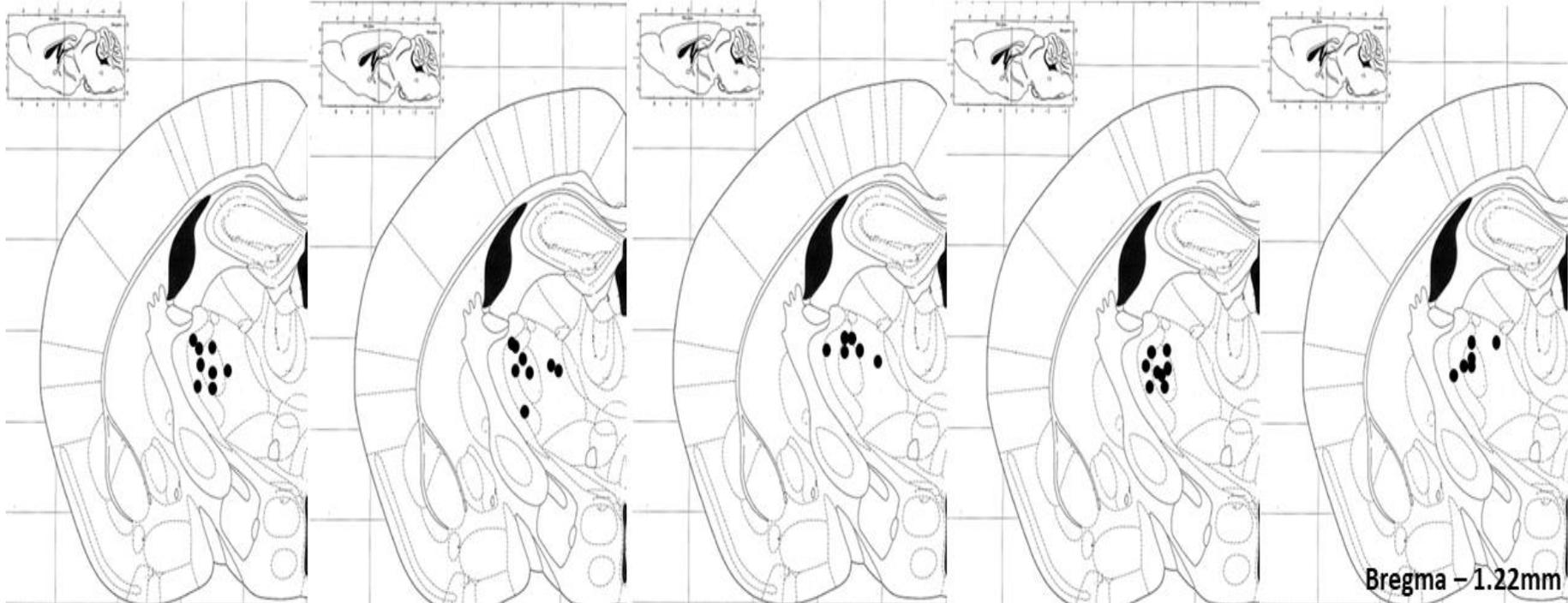
CONTROLE



e)

DN + SML0540
0,5 nmol/uLDN + SML0540
5 nmol/uLSML0540
5nmol/uLDOR
NEUROPÁTICA

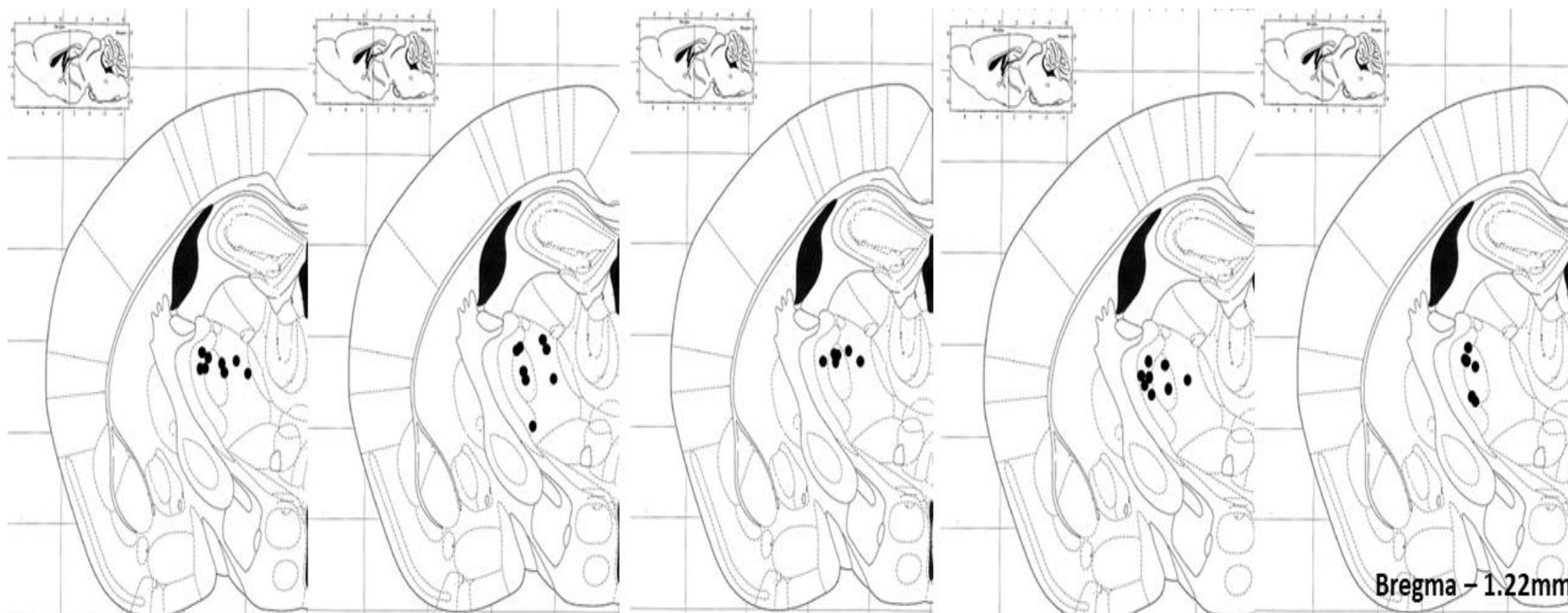
CONTROLE



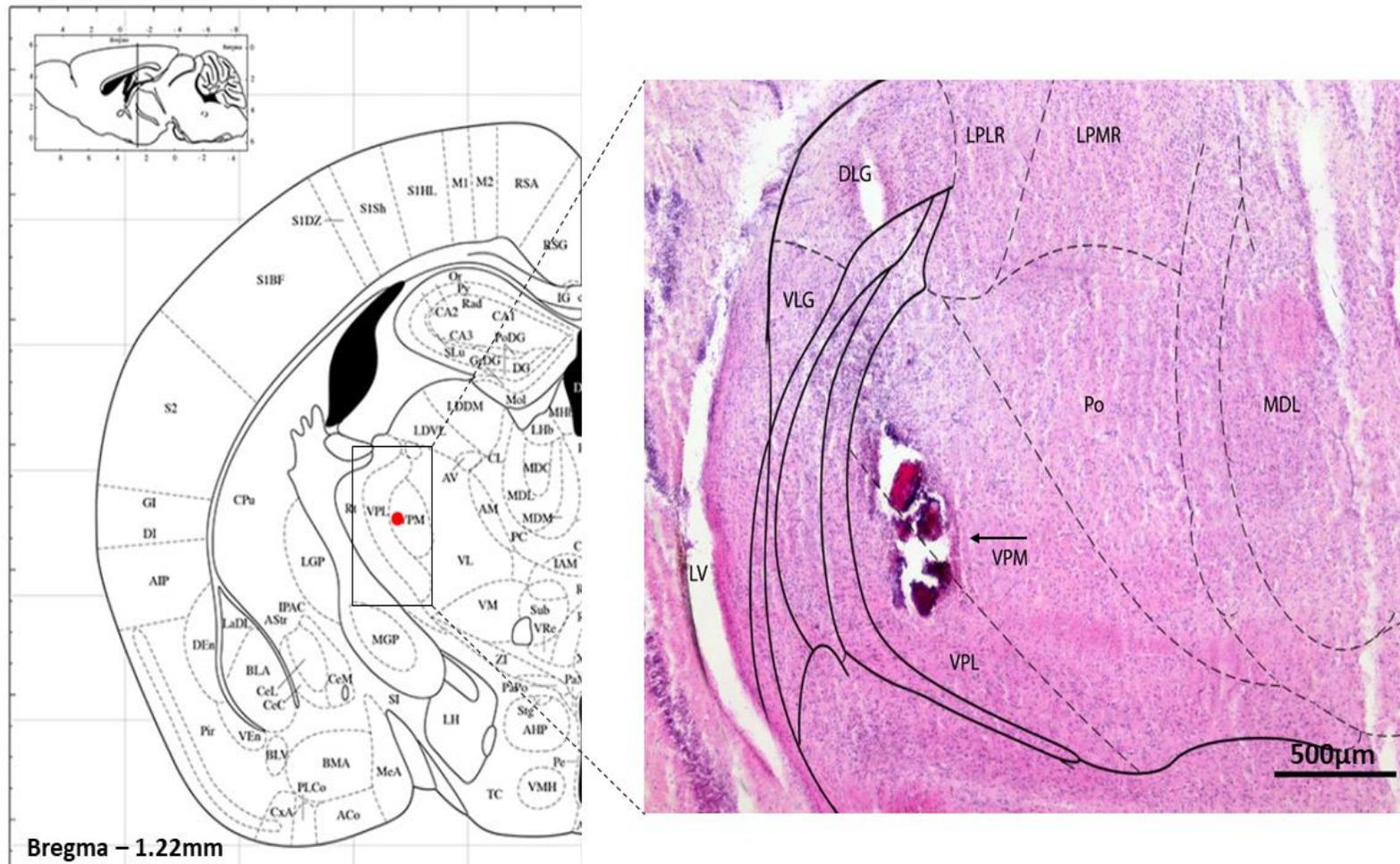
f)

DN + PDTC
10uM/uLDN+ PDTC
100uM/uLPDTC 100
uM/uLDOR
NEUROPÁTICA

CONTROLE



g)



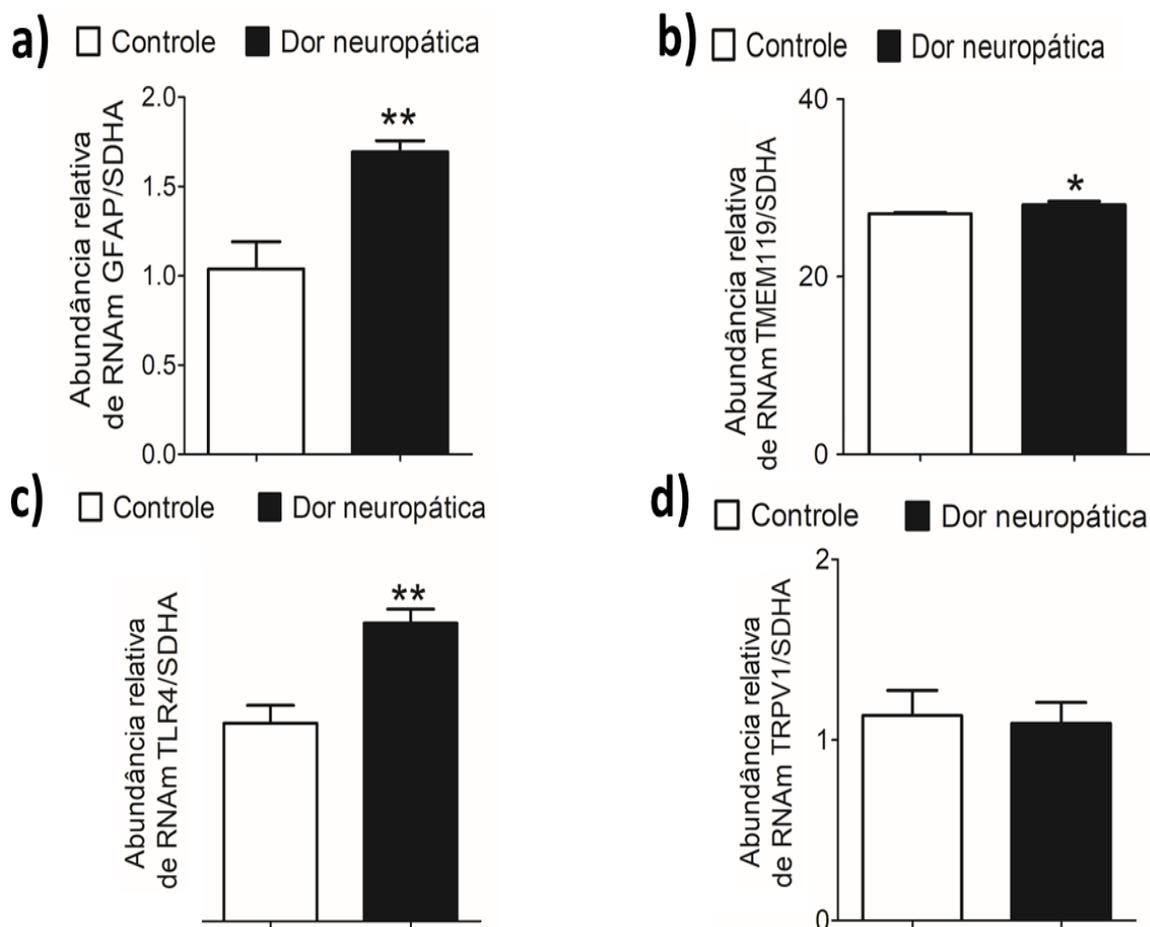
Fonte: da autora.

Nota: Representação esquemática de seções coronais do cérebro de camundongos de diferentes grupos com e sem dor neuropática ilustrando os locais da microinjeção no tálamo contralateral à lesão por CCI ou Sham de: a) minociclina; b) fluorocitrato; c) LPS-RS; d) SB366791; e) SML0540 e f) PDTC, além de seus respectivos veículos e 18g) imagem representativa de uma seção coronal histológica das microinjeções realizadas no tálamo. CCI: do inglês *injury chronic constriction*; mino: minociclina; LPS-RS: lipopolissacarídeo da *Rhodobacter Sphaeroides*; SB366791: N-(3-Metoxifenil)-4-clorocinamida; SML0540: Oxifenbutazona; PDTC: ditiocarbamato de pirrolidina.

5.10 ENVOLVIMENTO DE GENES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS DA GLIA, RECEPTORES TLR4 E TRPV₁ NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Nossos resultados até o momento indicam a participação das células da glia e do receptor TLR4 na neuromodulação da alodinia mecânica de animais com dor neuropática à nível talâmico. A fim de verificar se a produção de genes que codificam essas proteínas ocorria no 14^o dia de neuropatia, nós utilizamos a técnica de RT-PCR. E como resultado, podemos observar que houve aumento na expressão de genes para GFAP (gráfico 10A; $P < 0,01$), TMEM 119 (GRÁFICO 10B $P < 0,05$), e TLR4 (gráfico 10C; $P < 0,01$), enquanto o TRPV₁ não foi significativamente alterado (GRÁFICO 10D).

Gráfico 10 (A—D) — Avaliação da expressão gênica de células da glia e dos receptores TLR4 e TRPV₁ no tálamo durante a dor neuropática



Fonte: da autora.

Nota: Expressão gênica de a) TMEM119, b) GFAP, c) TLR4 e d) TRPV₁ no tálamo contralateral à lesão por CCI ou controle durante a dor neuropática (14^od). Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t student; ** P<0,01 indica significância estatística em relação ao grupo controle; n=5 por grupo. CCI: do inglês *chronic constriction injury*; RNAm: do inglês *ribonucleic acid messenger*; TLR4: do inglês *Toll like receptor 4*; TRPV₁: do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*; SDHA: do inglês *succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*.

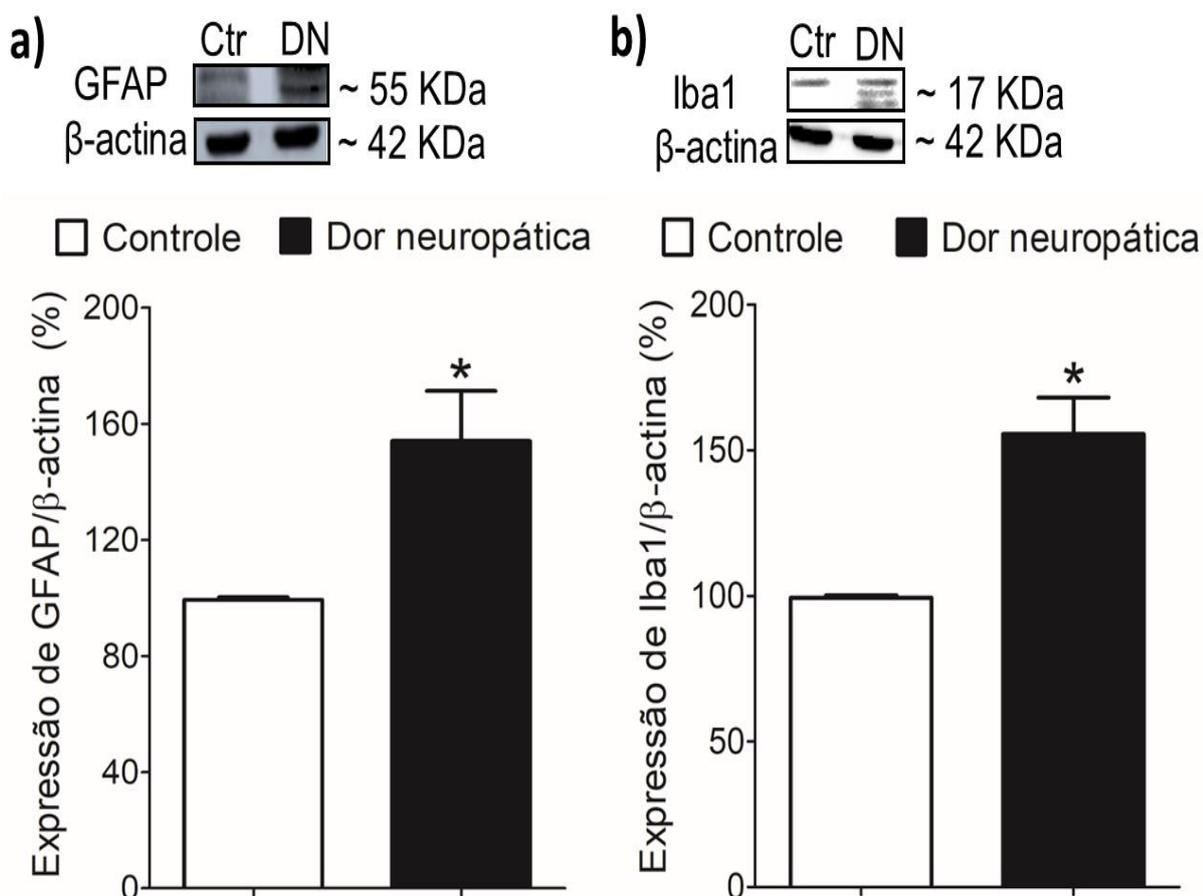
5.11 ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS GLIAIS NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Dados prévios de nossa pesquisa demonstraram que a inibição farmacológica intratálâmica de micróglia e astrócito, reduziram a alodinia mecânica causada pela

DN. Portanto, podemos inferir que essas células participam da alodinia mecânica a nível talâmico.

Sendo assim, a fim de verificar o aumento da expressão de proteínas gliais no tálamo de animais com neuropatia, utilizamos a técnica de Western Blot. Como resultado, obtivemos o aumento da expressão de marcadores gliais, como Iba1 ($P < 0,05$) e GFAP ($P < 0,05$) em animais neuropáticos, quando comparados ao grupo controle, como mostra o gráfico 11 (A e B).

Gráfico 11 (A e B) — Quantificação da expressão proteica glial no tálamo durante a DN



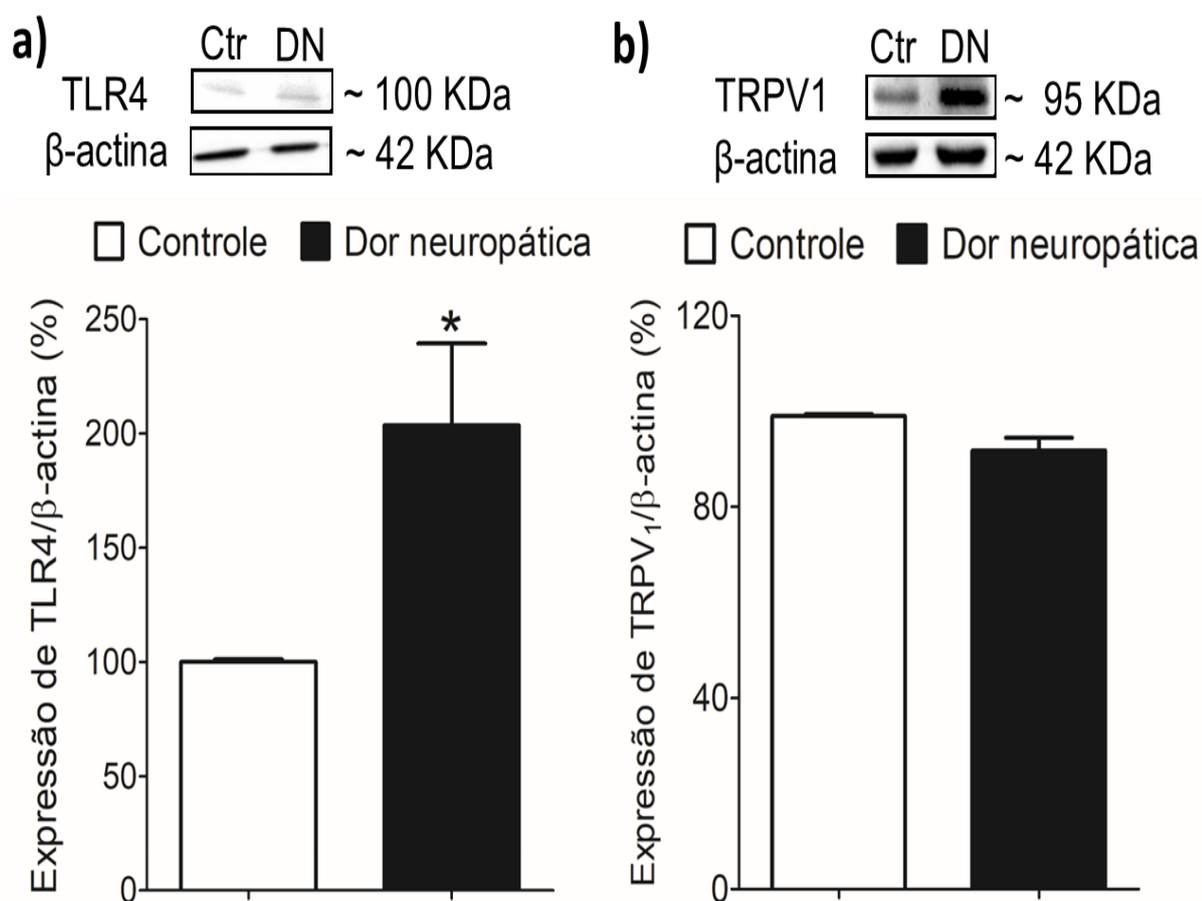
Fonte: da autora.

Nota: Expressão dos níveis proteicos de GFAP (a) e Iba1 (b) no tálamo contralateral à lesão por CCI ou controle durante a dor neuropática (14^od). Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t student, * $p < 0,05$ indica significância estatística em relação ao grupo controle; $n=4$ por grupo. CCI: do inglês *chronic constriction injury*; GFAP: do inglês *glial fibrillar acid protein*; Iba1: do inglês *ionized calcium-binding adapter molecule 1*; KDa: do inglês *kilodaltons*.

5.12 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TLR4 E TRPV₁ NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Uma vez verificada a participação talâmica dos receptores TLR4 e TRPV₁, na alodinia mecânica induzida pela CCI, por meio de inibição farmacológica, avaliamos a expressão de proteínas alvo para esses receptores. Houve aumento da expressão proteica para o TLR4, no 14^o dia de neuropatia (GRÁFICO 12A; $P < 0,001$), diferentemente do TRPV₁, onde não foi observado aumento significativo de sua expressão nesse mesmo dia avaliado quando comprado ao grupo controle (GRÁFICO 12B).

Gráfico 12 (A e B) — Quantificação dos níveis proteicos dos receptores TLR4 e TRPV₁ no tálamo durante a DN



Fonte: da autora.

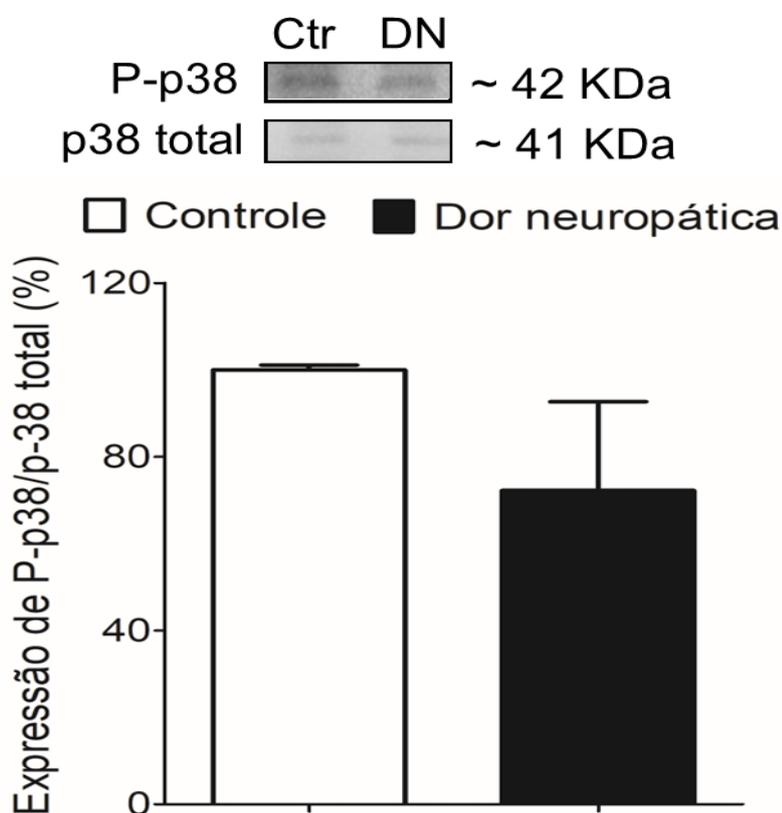
Nota: Expressão dos níveis proteicos de TLR4 (a) e TRPV₁ (b) no tálamo contralateral à lesão por DN ou controle (14^od). Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t student, ***

$p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle; $n=4$ por grupo. DN: dor neuropática; TLR4: do inglês *toll like receptor 4*; TRPV₁: do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*; KDa: do inglês *kilodaltons*.

5.13 ENVOLVIMENTO DA VIA MAPK P38 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Após verificada a participação da via MAPK p38 na alodinia mecânica causada pela CCI, objetivamos a investigar a expressão de proteínas dessa via no tálamo de animais neuropáticos (avaliação no 14^o dia após DN) e, como mostra o gráfico 12, não houve alteração significativa entre os grupos avaliados.

Gráfico 13 — Quantificação dos níveis proteicos da MAPK P-p38 no tálamo durante a DN



Fonte: da autora.

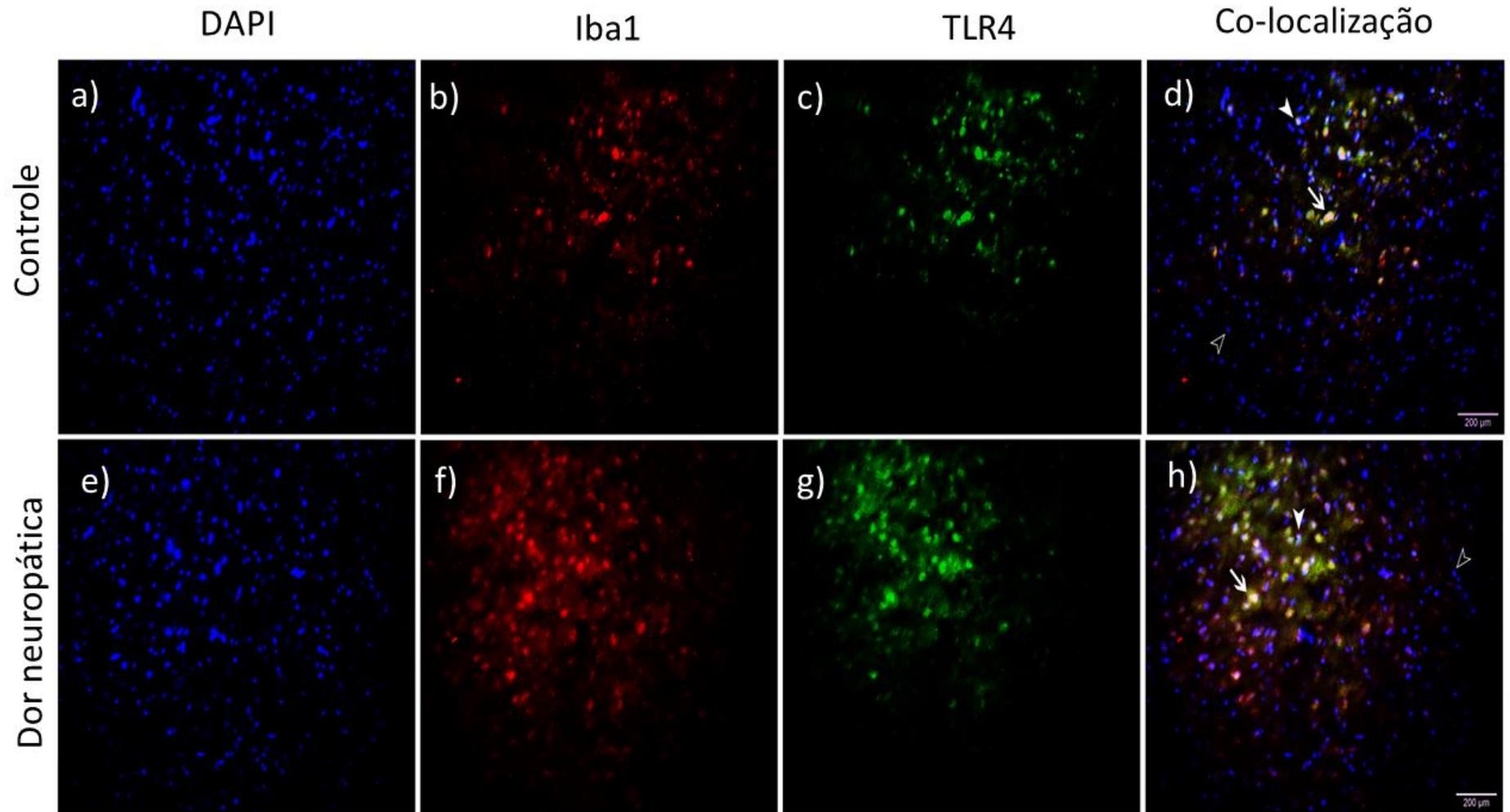
Nota: Expressão dos níveis proteicos de p38 fosforilada no tálamo contralateral à lesão por CCI ou controle (14^od). Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t student; $n=4$ por grupo; CCI: do inglês *chronic constriction injury*; KDa: do inglês *kilodaltons*; P-p38: p38 fosforilada.

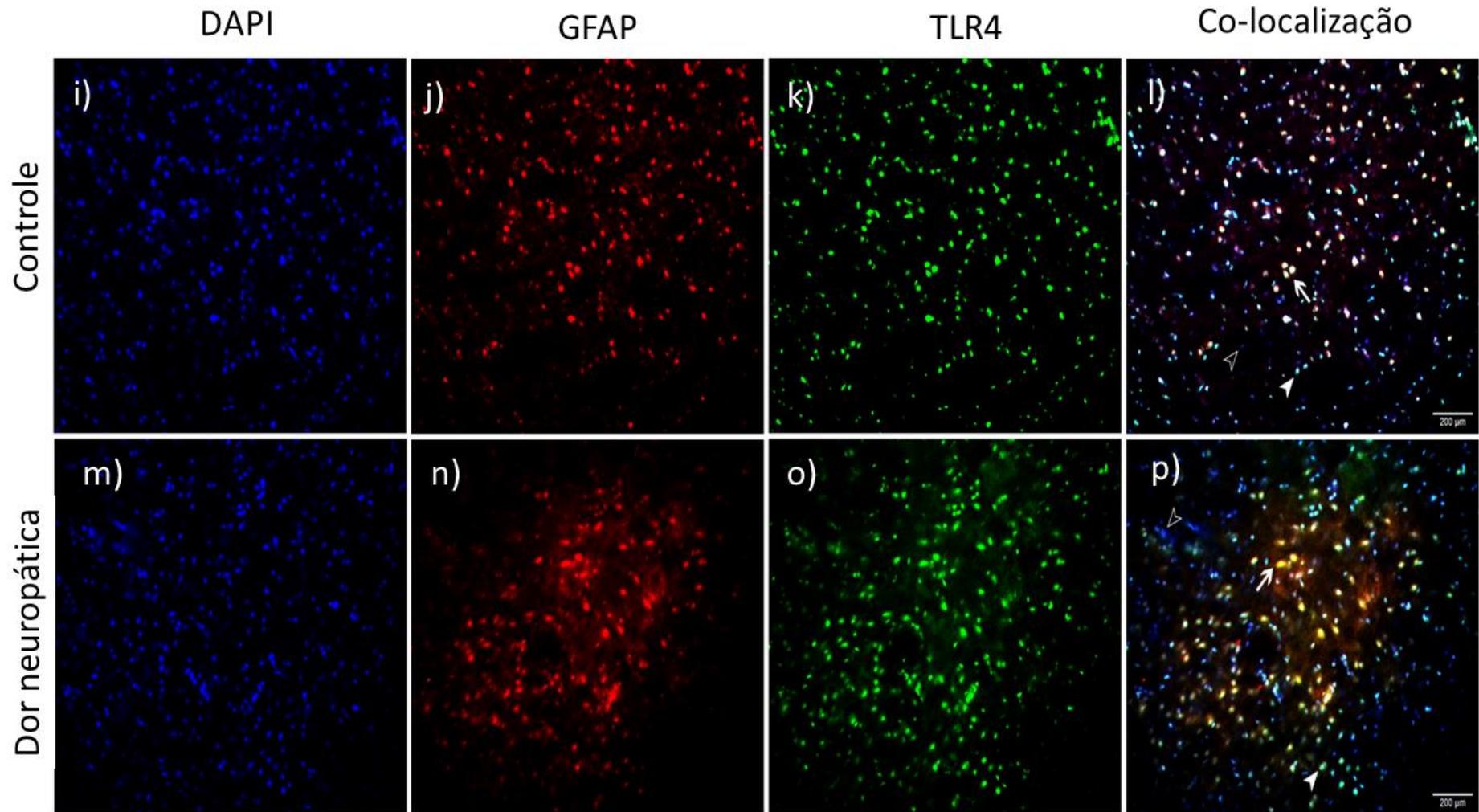
5.14 CO-LOCALIZAÇÃO DE CÉLULAS DA GLIA E DO TLR4 NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Uma vez elucidado o papel neuromodulador de células gliais e do receptor TLR4 durante a dor neuropática, assim como observado o aumento da expressão proteica dessas proteínas e ainda, o aumento na expressão gênica de astrócitos e TLR4, nós objetivamos verificar se havia aumento da densidade de proteínas para TLR4 e células da glia por meio da imunofluorescência.

Como resultado, o ensaio revelou haver aumento na densidade das proteínas gliais, sendo respectivamente, Iba1 (FIGURA 19F) e GFAP (FIGURA 19N), além de TLR4 (FIGURA 19G e O) no tálamo ventrobasal de animais com dor neuropática. Ainda, essas células foram co-localizadas com o receptor TLR4 (FIGURA 19H e P), como demonstra a figura 19A—P, indicando a participação tanto dessas células quanto do TLR4 na manutenção da DN à nível talâmico.

Figura 19 (A—P) — Imunomarcção de células gliais e TLR4 no tálamo ventrobasal durante a dor neuropática





Fonte: da autora.

Nota: Co-localização do receptor TLR4 com (19a-h) micróglia e (19i-p) astrócitos no tálamo ventrobasal durante a dor neuropática ou controle. Imunofluorescência representativa e micrografias confocais do receptor TLR4 e de células gliais no tálamo ventrobasal após 14 dias de dor neuropática induzida por CCI ou controle. As seções foram duplamente marcadas imunologicamente contra o receptor TLR4 (verde), GFAP (vermelho) e Iba1

(vermelho). Imagens com ampliação de 40x, barra de escala: 200 μm . n amostral = 4 animais por grupo; DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil-indol; GFAP: do inglês *glial fibrilar acid protein*; Iba1: do inglês *ionized calcium-binding adapter molecule 1*; TLR4: do inglês *Toll like receptor 4*.

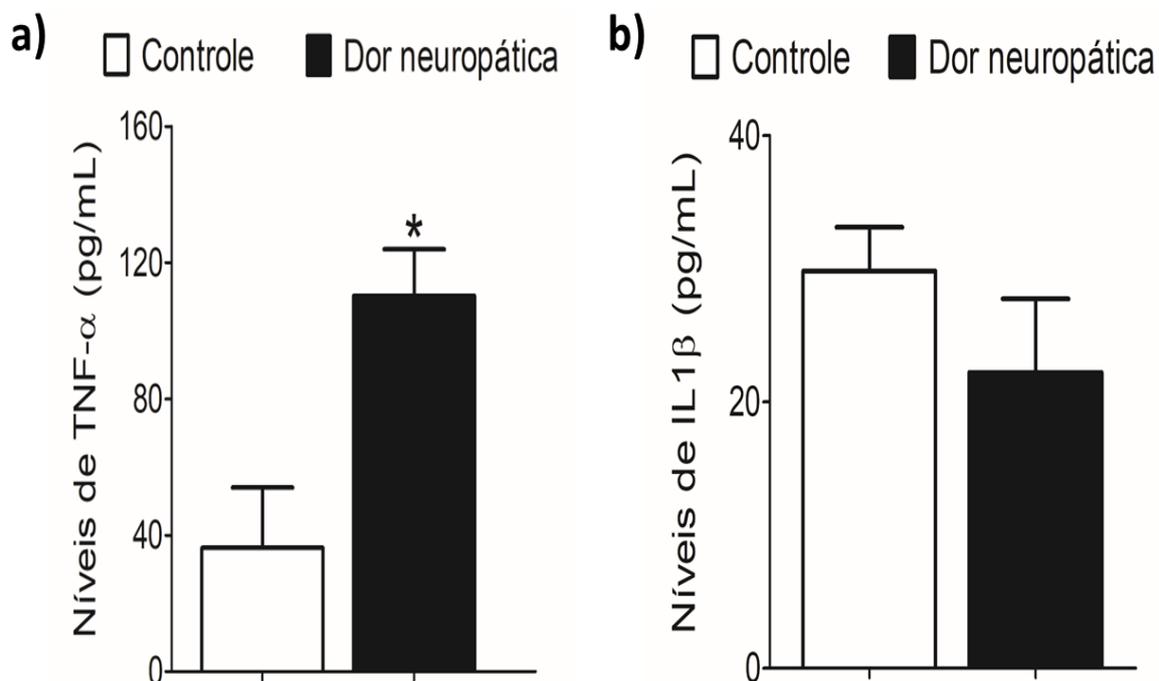
5.15 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO TÁLAMO DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Até o presente momento, nossos dados demonstraram haver uma relação entre a dor neuropática e a ativação do receptor TLR4 em células da glia no tálamo ventrobasal, uma vez que o aumento da expressão de proteínas desse receptor, bem como o de astrócitos e micróglia no tálamo de animais neuropáticos foi observada, além da inibição farmacológica dele melhorar a alodinia mecânica dos animais com dor neuropática.

Sabendo que o receptor TLR4 é ativado após injúria nervosa e que esse processo pode levar à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, a qual contribui para a alodinia mecânica e neuroinflamação do SNC (Grace *et al.*, 2014), nós verificamos se os níveis de TNF- α e a IL-1 β , poderiam estar aumentados à nível talâmico durante a neuropatia induzida pela CCI.

No gráfico 14A podemos observar o aumento significativo dos níveis da citocina TNF- α ($P < 0,05$) no tálamo de animais com 14 dias de neuropatia, enquanto para os níveis da citocina IL-1 β (GRÁFICO 14B) esse mesmo efeito não foi significativamente observado.

Gráfico 14 (A e B) — Avaliação dos níveis de citocinas pró inflamatórias no tálamo durante a dor neuropática



Fonte: da autora.

Nota: Expressão dos níveis de citocinas a) TNF α e b) IL1 β no tálamo durante a dor neuropática ou controle (14^odia). Os dados representam a média \pm E.P.M. teste t student; * P<0,05 indica significância estatística em relação ao grupo controle; n=5 por grupo. DN: dor neuropática; CCI: do inglês *chronic constriction injury*; IL-1 β : interleucina 1 beta; TNF- α : do inglês *tumoral necrosis factor alfa*.

6 DISCUSSÃO

Nossos achados com experimentos comportamentais demonstraram a diminuição da alodinia mecânica em camundongos tratados com inibidores de astrócitos e micróglia no tálamo ventrobasal após 14 dias de DN. Em adição, mostramos o envolvimento do receptor TLR4, TRPV₁, da via MAPK p38 e do NFκB após o tratamento intratálâmico com os respectivos antagonistas e inibidores, os quais também resultaram na diminuição da alodinia mecânica.

Além disso, não foi evidenciado nenhum déficit de coordenação motora nos animais que foram submetidos ao tratamento intratálâmico com as substâncias utilizadas no presente estudo, assim como na cirurgia de estereotaxia para implantação da cânula guia.

O aumento da expressão gênica de RNAm para GFAP e TLR4 em animais com dor neuropática foi observado. Análogo a esses achados, a suprarregulação de proteínas marcadoras para micróglia e astrócito, respectivamente Iba1 e GFAP foi encontrada no 14^o dia de DN, assim como para a proteína para TLR4. Também foi evidenciada a co-localização do receptor TLR4 e células da glia no tálamo ventrobasal, indicando a participação do TLR4 glial na modulação da alodinia mecânica de animais com DN no tálamo ventrobasal. Em adição, nossos dados mostraram um aumento no nível de TNFα no tálamo ventrobasal de animais com DN, indicando um papel neuroinflamatório na modulação da alodinia mecânica.

A DN é uma doença crônica que afeta cada vez mais pessoas e compromete a qualidade de vida dos indivíduos que a possuem (Finnerup; Jensen; Kuner, 2021; Somelar *et al.*, 2021), por isso traçar estratégias de entendimento e tratamento são de real importância.

Sabe-se que o circuito tálamo-cortical e sua regulação positiva desempenham papéis importantes no desenvolvimento da dor crônica seja de origem neuropática ou não (Calviño *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2023) e especificamente o tálamo ventrobasal é descrito como um importante centro de retransmissão do sinal da dor, o qual integra informações relacionadas à dor de regiões como medula espinhal e tronco encefálico (Lu; Yen, 2013; Wolff *et al.*, 2021).

Fischer e colegas (2009) demonstraram haver um aumento da hiperatividade e atividades espontâneas de neurônios dentro do VPL de animais com dor neuropática

induzida por estreptozotocina (Fischer; Tan; Waxman, 2009) e outros demonstraram que a atividade do glutamato é capaz de hiperexcitar neurônios talâmicos (Lei *et al.*, 2013). Já foi evidenciado também que níveis de BDNF estão aumentados no VPM e no VPL de animais com DN (Giardini *et al.*, 2017) Considerando esses fatos, podemos inferir que células da glia também são ativadas nesse processo, uma vez que elas expressam receptores para esses neurotransmissores, assim como já demonstrado por outros estudos (Blaszczyk *et al.*, 2018; Giardini *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2017).

Com esse embasamento prévio, os quais identificaram a participação da glia na redução do limiar nociceptivo dos animais neuropáticos nesse período de avaliação, o 14^o dia de DN foi escolhido para os experimentos seguintes. E ainda, esse período foi escolhido a fim de minimizar o sofrimento animal devido a eles serem obrigatoriamente submetidos a duas cirurgias ao longo do experimento.

A interação neurônio-glia tem sido estudada no contexto do entendimento de mecanismos envolvidos na nocicepção e estudos têm demonstrado o importante papel de micróglia e astrócitos na iniciação e manutenção da dor crônica em diferentes regiões do SNC responsáveis pelo processamento da dor, como a medula espinal, o tálamo ventrobasal e o córtex somatossensorial (Cobianchi; Mòdol; Navarro, 2014; Liang *et al.*, 2022; Milligan; Watkins, 2009; Taylor *et al.*, 2017).

Já é bem descrito na literatura o papel do TRPV₁ e do TLR4 em células da glia, participando da neuromodulação da dor neuropática à nível medular (Akira; Takeda, 2004; Chen; Valtschanoff; Willcockson, 2009; Marrone *et al.*, 2017), porém, o mesmo não pode ser dito desses receptores à nível talâmico.

Para determinar o papel de micróglia e astrócitos na manutenção da dor neuropática no tálamo ventrobasal, nós avaliamos o efeito da minociclina (inibidor de ativação microglial) e do fluorocitrato (inibidor de astrócitos) sobre o modelo proposto no presente estudo. Como esperado, ambas as microinjeções dos inibidores reduziram a alodinia mecânica de animais com DN. Em adição, ainda encontramos um aumento da expressão proteica de marcadores gliais, o que indica o envolvimento dessas células na manutenção da DN.

Esses achados são consistentes a um estudo prévio que mostrou a atenuação da alodinia mecânica e térmica após inibição da micróglia e astrócitos no tálamo ventrobasal (Hains; Zhao; Waxman, 2007). Contudo, esse estudo utilizou uma dose elevada (10mg/mL para minociclina e 1nM/1uL para fluorocitrato) em comparação ao

nosso protocolo e o período de avaliação da nocicepção, bem como o modelo neuropático proposto na pesquisa foi diferente do utilizado por nós.

LeBlanc e colaboradores (2017), verificaram a redução da hiperalgesia térmica de animais neuropáticos após inibição com minociclina no VPL do tálamo, porém esse efeito foi avaliado no 7º dia de dor neuropática, enquanto que em nosso estudo esse efeito foi observado no 14º dia de DN, o que demonstra um maior efeito neuromodulador da micróglia ao longo do tempo.

No estudo conduzido por Giardini e colaboradores (2017) foi demonstrado uma supraexpressão para Iba1 e GFAP, dois marcadores de ativação glial, no VPL de ratos com 14 dias de DN. Juntamente a esses achados, houve aumento de BDNF no VPL indicando uma neuroinflamação talâmica, a qual pode contribuir para a ativação de células da glia (Giardini *et al.*, 2017). Enquanto nos achados de Leblanc e colaboradores (2011) foi evidenciada a participação microglial com aumento de sua imunorreatividade e ativação da via MAPK p38 no 7º dia após DN.

Ainda que os estudos prévios acima citados mostrem a participação da glia frente a DN induzida por lesão periférica, ainda permanece indeterminado o papel dessas células na contribuição da modulação da dor à nível talâmico, pois não há relação evidente que aponte por qual receptor essas células desempenham esse papel.

Sendo assim, em uma nova linha de evidências, nós identificamos a redução da alodinia mecânica após a inibição farmacológica dos receptores TRPV₁ e TLR4, assim como o aumento do nível de RNAm para TLR4 seguido do aumento na expressão proteica de TLR4, indicando a produção e síntese proteica desse receptor no tálamo de animais com DN.

Hsiao e colaboradores (2022) demonstraram um aumento na expressão de TLR4 e TRPV₁ no tálamo, córtex somatossensorial, córtex pré-frontal e amígdala em animais com comportamentos de dor do tipo fibromiálgico. Eles relatam que a indução de dor fibromiálgica leva a ativação de TLR4 e TRPV₁ por meio da suprarregulação de DAMP's, como S100 β e HMGB1. Essa ativação culmina na sinalização de vias de intracelulares, como a PI3K/AKT/Mtor, ERK, p38 e JNK. É relatado ainda o aumento da expressão de NF κ B e associação desses achados a ativação de células da glia, sendo essas duas últimas, não avaliadas por eles (Hsiao; Lin, 2022).

Mesmo encontrando resultados semelhantes no que diz respeito a participação do receptor TLR4, TRPV₁ e da via p38/NF κ B, esse estudo utilizou um mecanismo de

diferente lesão em camundongos, além do tempo de avaliação, enquanto nós encontramos a participação da glia no tálamo ventrobasal de animais com neuropatia.

Com isso, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a participação do TRPV₁ e do TLR4 no tálamo no processo de dor neuropática e torna-se um complemento aos estudos previamente citados, uma vez que na literatura as evidências de ativação deles é pequena e envolvem outros mecanismos de indução da dor que não por lesões periféricas.

No presente estudo, apesar de encontrar evidências da participação do receptor TRPV₁ na alodinia mecânica de animais com dor neuropática, assim como encontramos o papel da via MAPK p38 nessa condição, o mesmo não pode ser observado em relação a supraexpressão dessas proteínas no tálamo ventrobasal, bem como nos níveis de RNAm avaliados.

LeBlanc e colaboradores (2017) encontraram a participação da via p38 em células da glia no tálamo de animais com 7 dias após CCI, o que diverge do resultado do presente estudo. Enquanto em outro estudo, o mesmo resultado encontrado no nosso estudo foi evidenciado, onde no 14^o dia de tratamento com inibidor da via p38 a alodinia mecânica de ratos com DN foi reduzida, porém, o aumento na expressão espinal dessa proteína na forma fosforilada não foi observada (Moraes *et al.*, 2020).

Em consonância a esses achados prévios, Wang e colaboradores (2022) encontraram a redução da expressão de P-p38 espinal em animais com alodinia mecânica por compressão devido a hérnia discal lombar após 14 dias de neuropatia (Wang *et al.*, 2020).

Essa divergência demonstra que a via MAPK p38 é ativada em um período mais agudo da dor neuropática, justificando o fato de não ter havido aumento da fosforilação dessa proteína no ensaio molecular do presente estudo. Análogo a esse raciocínio, tanto o TRPV₁ quanto a MAPK p38 possuem uma expressão basal, como demonstrado por nós por meio de inibição farmacológica e nos ensaios moleculares. Com isso, o tratamento intratálamico com seus respectivos inibidores foi capaz de inibir a expressão constitutiva tanto da via p38 quanto do TRPV₁ a ponto de reduzir a alodinia mecânica dos animais.

O TRPV₁ é um canal iônico e, portanto, ele se abre e se fecha rapidamente de acordo com a mudança do potencial de membrana das células que o expressam. Sendo assim, possivelmente quando o tálamo de animais neuropáticos foi coletado essa expressão era pequena e não foi detectada pelos ensaios moleculares.

Estudos farmacológicos *in vivo* podem divergir de estudos moleculares *ex vivo*, pois o funcionamento do organismo dentro das condições naturais é melhor aplicado que no organismo fora dela, mesmo que em ambiente extremamente controlado. Aliás, nos experimentos *in vivo* tanto o TRPV₁ quanto a via MAPK p38 também pode ter sido ativada por outros mecanismos paralelos ao sugerido no presente estudo que ainda são desconhecidos.

Além do mais, pode ter havido uma ativação do TRPV₁ por meio do aumento na expressão do receptor TLR4, pois estudos já demonstram essa interação entre os receptores em células imunes de animais com prurido (Min *et al.*, 2018), além da co-localização desses receptores em neurônios do GRD de ratos com dor por pulpíte aguda (Lin *et al.*, 2015).

Na presente pesquisa o receptor TLR4 foi imunomarcado com Iba1 e GFAP no tálamo ventrobasal de animais com DN. Outros estudos, em mecanismos diferentes de dor (Hsiao; Lin, 2022; Huang *et al.*, 2021), identificaram a participação desse receptor no tálamo, entretanto, nós somos os primeiros a identificar esse receptor em modelo de DN.

O TLR4 é um importante receptor responsável por desencadear respostas pró-inflamatórias em células imunes e outros (Bruno *et al.*, 2018; Deleo, 2005; Akira; Takeda, 2004; Deleo; Mcmenemy; Tanga, 2005; Sun *et al.*, 2015). Dado o fato de termos identificado o aumento na produção de TNF α , sugerimos que essa liberação seja via TLR4 glial e que esse processo contribua diretamente para a neuromodulação da dor à nível talâmico.

O NF κ B é um fator nuclear importante nas respostas celulares inflamatórias em dores crônicas em geral, incluindo a de origem neuropática (Liu *et al.*, 2017). Em nossos achados identificamos que a inibição do NF κ B reduziu a alodinia mecânica de animais com DN. Associado a isso, os níveis de TNF α foram aumentados, indicando a possível participação desse fator nuclear na transcrição de genes para essa citocina pró inflamatória. Uma vez não identificada a fosforilação da via MAPK p38 no tálamo de animais com DN, podemos inferir que o NF κ B permite a transcrição, produção e liberação de TNF α por meio de outras vias de ativação nas células gliais, as quais não foram abordadas nessa pesquisa (Empl *et al.*, 2001; Hanisch, 2002).

Existe uma gama de evidências entre a relação de comportamento da dor neuropática em roedores associado à reorganização do processamento nociceptivo

periférico e da medula espinhal, aos quais originam a sensibilização central (Austin; Taylor, 2010; Salter; Woolf, 2000). A lesão nervosa gera degeneração waleriana em neurônios, além de ativação celular em células da glia, ao passo que essas células são sensibilizadas e, conseqüentemente, permitem a produção e liberação de citocinas, como TNF α e IL1 β (Austin; Taylor, 2010; Cohen; Oliveira; Portella, 2016).

As citocinas, ao serem secretadas, atuarão em outras células por meio de sua ligação em seus respectivos receptores de membrana superexpressos, culminando em um feedback positivo de ativação glial e neuronal, reverberando a produção de neurotransmissores excitatórios pelos neurônios aferentes e de citocinas pró-inflamatórias que irão aumentar a percepção da dor (Austin; Taylor, 2010; Cohen; Oliveira; Portella, 2016).

Ainda que demonstrado pelo presente estudo o aumento dos níveis talâmicos de TNF α no 14^o dia de DN, curiosamente não encontramos aumento dos níveis de IL1 β . A produção de IL1 β está relacionada a via NLRP do inflassoma, a qual é clivada em sua forma ativa pela caspase 1 (Martinon; Tschopp, 2007).

Em adição, em um outro estudo prévio, foi demonstrado que a clivagem de IL1 β pela metaloproteinase 9 contribuiu para a fase aguda do comportamento da dor neuropática, enquanto a clivagem de IL1 β pela metaloproteinase 2 manteve a dor neuropática associada a ativação de astrócitos em momentos crônicos da DN (Ren e Torres, 2009).

Além disso, a IL-1 β celular pode ser alojada em vesículas endolisossomais, as quais são alvo de degradação conforme um estímulo apropriado, sendo direcionada para o espaço extracelular. Dado que apenas uma pequena fração da IL1 β celular está localizada nas vesículas (Rubartelli *et al.*, 1990), esse mecanismo provavelmente será acionado quando a necessidade extracelular de IL1 β for baixa. Com essas evidências, a participação da IL1 β possivelmente ocorre por outras vias de ativação, as quais não foram avaliadas no presente estudo e estas não estavam ativas no momento avaliado, ou ainda os níveis aumentados dessa citocina ou até mesmo seu período de degradação já tenha ocorrido.

Vania e colegas (2007) revelaram que após lesão periférica por CCI os ratos não exibiram alterações significativas no limiar nociceptivo, bem como na expressão de IL1 β no tronco cerebral, tálamo e córtex pré-frontal. Enquanto os animais com lesão nervosa poupada (SNI) mostraram uma diminuição nos limiares táteis e aumento da expressão de IL1 β no tronco cerebral e córtex pré-frontal contralateral 10 dias após a

lesão. Em contrapartida, apenas um aumento modesto na expressão de IL1 β foi observada no tálamo/estriado no lado contralateral à lesão no 24^o dia após a lesão (Vania *et al.*, 2007) o que corrobora com nossos achados.

Guo e colaboradores (2007) encontraram aumento na expressão proteica de IL1 β e GFAP no 7^o dia após a indução de inflamação pelo completo adjuvante de Freund (CFA) e esse efeito foi reduzido a níveis basais no 14^o dia (Guo *et al.*, 2007). Essas evidências prévias da literatura demonstram haver uma divergência a depender do tempo-curso da neuropatia, do estímulo aplicado e da região avaliada a qual determina a participação de IL1 β .

Por fim, algumas substâncias podem agir no SNC e levar a comprometimentos de coordenação motora e neurotoxicidade (Daniel; Jacobson, 1975; Fanning; Gump; Sofferman, 1977; Leyden; Smith, 2005). Em nosso estudo, esse efeito não foi observado no teste rota rod, demonstrando que o efeito antinociceptivo perante as doses administradas no tálamo ventrobasal não era oriunda de déficits da coordenação motora e nem por efeito sedativo das drogas.

7 CONCLUSÃO

Sugerimos, a partir dos presentes resultados, que as células da glia têm determinante participação na neuromodulação da dor neuropática à nível talâmico por meio da ativação do receptor TLR4, sendo o NF κ B um fator nuclear responsável por transcrever genes e permitir às células gliais a produção de citocinas pró inflamatórias como a TNF α que contribui assim, para o estado persistente de dor. A fim de elucidar os mecanismos encontrados no presente trabalho, mais investigações serão necessárias para afirmar tais hipóteses.

REFERÊNCIAS

- AB AZIZ, C. B.; AHMAD, A. H. The role of the thalamus in modulating pain. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, Kelantan, v. 13, n. 2, p. 11–18, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3349479/pdf/mjms-13-2-011.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2022.
- AGHAZADEH, A. et al. Effects of Hyperthermia on TRPV1 and TRPV4 Channels Expression and Oxidative Markers in Mouse Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Tabriz, v. 41, n. 7, p. 1453–1465, 1 out. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-020-00909-z>. Acesso em: 19 out. 2022.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, Takayama, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1391>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- ALBE-FESSAR, D. et al. Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain Research Reviews*, Joyu em Joas, v. 9, n. 3, p. 217–296, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(85\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0165-0173(85)90013-X). Acesso em: 02 jan. 2020.
- ALLEN, N. J.; LYONS, D. A. Glia as Architects of Central Nervous System Formation and Function. *Science*, La Jolla, v. 362, n. 6411, p. 181, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>. Acesso em: 14 out. 2022.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. *Brain Research*, São Paulo, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>. Acesso em: 27 jun. 2020.
- ALONSO-CALVIÑO, E. et al. Increased responses in the somatosensory thalamus immediately after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, Toledo, v. 87, p. 39–49, 1, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2015.12.003>. Acesso em: 1 mar. 2020.
- ANJOS-GARCIA, T.; COIMBRA, N. C. Opposing roles of dorsomedial hypothalamic CB1 and TRPV1 receptors in anandamide signaling during the panic-like response elicited in mice by Brazilian rainbow Boidae snakes. *Psychopharmacology*, Ribeirão Preto, v. 236 (6), p. 1863–1874, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-019-5170-2>. Acesso em: 15 fev. 2023.
- ARTHUR, J. S. C.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, Dundee, v. 13, n. 9, p. 679–692, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3495>. Acesso em: 12 dez. 2019.
- ATTAL, N. et al. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain*, Boulogne-Billancourt, v. 152, n. 12, p. 2836–2843, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2011.09.014>. Acesso em: 30 nov. 2022.
- AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *Journal of Neuroimmunology*, Sydney, v. 229, n. 1–2, p. 26–50, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.013>. Acesso em: 14 ago.

2022.

BACHSTETTER, A. D.; VAN ELDIK, L. J. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS Aging and Disease. *Aging and Disease*, Limestone, v. 1, n. 3, p. 199-211, 2010. disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377763/>. Acesso em: 05 st. 2020.

BAI, H. et al. Paeoniflorin ameliorates neuropathic pain-induced depression-like behaviors in mice by inhibiting hippocampal neuroinflammation activated via TLR4/NF- κ B pathway. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, Yanji, v. 25, n. 3, p. 217–225, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4196/KJPP.2021.25.3.217>. Acesso em: 19 fev. 2023.

BANATI, R. B. et al. Long-term trans-synaptic glial responses in the human thalamus after peripheral nerve injury. *NeuroReport*, London, v. 12, n. 16, p. 3439–3442, 16, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00001756-200111160-00012>. Acesso em: 18 mai. 2021.

BANATI, R. B. Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitisation? *Journal of Physiology*, London, v. 96, p. 289–299, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rsa.20040>. Acesso em: 07 mai. 2019.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*, Kiel, v. 9, n. 8, p. 807–819, 2010. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70143-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70143-5). Acesso em: 30 nov. 2020.

BASBAUM, B. D. M.; SCHERRER J.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.*, San Francisco, v. 139, n. 2, p. 267–84, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>. Acesso em: 13 dez. 2021.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, Bethesda, v. 33, p. 87–107, 1988. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6). Acesso em: 21 jan. 2019.

BIELEWICZ, J. et al. Diagnosis and Management of Neuropathic Pain in Spine Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, Lublin, v. 12, n. 04, p. 1380, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JCM12041380>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BLASZCZYK, L. et al. Sequential alteration of microglia and astrocytes in the rat thalamus following spinal nerve ligation. *Journal of Neuroinflammation*, , Bordeaux, v. 15, n. 1, p. 1–23, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-018-1378-z>. Acesso em: 05 fev. 2020.

BRASIL, I. S. P. D. S.; PONDÉ, M. P. Sintomas ansiosos e depressivos e sua correlação com intensidade da dor em pacientes com neuropatia periférica. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, Salvador, v. 31, n. 1, p. 24–31, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-81082009000100007>. Acesso em: 31 abr. 2022.

BRODIN, E.; ERNBERG, M.; OLGART, L. Neurobiology: General considerations – from acute to chronic pain. *Nor Tannlegetoren Tid*, Stockholm, [s.v], n. 126, p. 28-33, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.56373/2016-1-6>. Acesso em: 22 mar. 2019.

BRUNO, K. et al. Targeting toll-like receptor-4 (TLR4) an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain*, La Jolla, v. 159, n. 10, p. 1908–1915, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001306>. Acesso em: 29 set. 2022.

CASTRO-ALAMANCOS, M. A. Properties of primary sensory (lemniscal) synapses in the ventrobasal thalamus and the relay of high-frequency sensory inputs. *Journal of Neurophysiology*, Montreal, v. 87, n. 2, p. 946–953, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.00426.2001>. Acesso em: 23 abr. 2023.

CHEN, Y.; ABDI, S. Basic Science: Pain Mechanisms and Pathways. *Anesthesiology In-Training Exam Review*, Houston, [s.v], [s.n], p. 185–189, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-87266-3_36. Acesso em: 09 jan. 2023.

CHEN, Y.; WILLCOCKSON, H. H.; VALTSCHANOFF, J. G. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Experimental neurology*, Chapel Hill, v. 220, n. 2, p. 383, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.030>. Acesso em: 02 mar. 2020.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. *Nature*, Baltimore, [s.n], v. 03, p. 1-20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>. Acesso em: 10 jun. 2019.

DE OLIVEIRA, H. U. et al. Investigation of the Involvement of the Endocannabinoid System in TENS-Induced Antinociception. *Journal of Pain*, Alfenas, v. 21, n. 7–8, p. 820–835, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.11.009>. Acesso em: 06 set. 2021.

DELMAS, P. et al. Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Front Cell Neurosci.*, Kyiv, v.14, p. 612480, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612480>. Acesso em: 17 fev. 2023.

DESANTANA, J. M. et al. Definition of pain revised after four decades. *Brazilian Journal Of Pain*, Aracaju, v. 3, n. 3, p. 197–198, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>. Acesso em: 09 nov. 2021.

DI CESARE MANNELLI, L. et al. Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. *Journal of Pain*, Florence, v. 14, n. 12, p. 1585–1600. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.08.002>. Acesso em: 1 dez. 2013.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of Pain. *Seminars in Pediatric Neurology*, Boston, v. 23, n. 3, p. 201–208, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2016.10.003>. Acesso em: 16 ago. 2019.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, San Diego, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI42843>. Acesso em: 12 out. 2019.

ELISEI, L. M. S. et al. Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. *Inflammopharmacology*, Alfenas, v. 28, n. 6, p. 1537–1551, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00756-w>. Acesso em: 15 out. 2021.

EMPL, M. et al. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*, Kingston, v. 56, n. 10, p. 1371–1377, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.56.10.1371>. Acesso em: 13 out. 2019.

FAN, Y. et al. Up-regulation of TREM2 accelerates the reduction of amyloid deposits and promotes neuronal regeneration in the hippocampus of amyloid beta1-42 injected mice. *Journal of chemical neuroanatomy*, Guangzhou, v. 97, p. 71–79. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2019.02.00>. Acesso em: 1 abr. 2019.

FANNING, W. L.; GUMP, D. W.; SOFFERMAN, R. A. Side effects of minocycline: a double blind study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Burlington, v. 11, n. 4, p. 712–717, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aac.11.4.712>. Acesso em: 26 set. 2019.

FINNERUP, N. B.; KUNER, R.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*, Aarhus, v. 101, n. 1, p. 259–301, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.11.4.712>. Acesso em: 05 ago. 2021.

FISCHER, T. Z.; TAN, A. M.; WAXMAN, S. G. Thalamic neuron hyperexcitability and enlarged receptive fields in the STZ model of diabetic pain. *Brain Research*, New Haven, v. 1268, p. 154–161, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.063>. Acesso em: 29 mar. 2023.

GARLAND, E. F.; HARTNELL, I. J.; BOCHE, D. Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans?. *Frontiers in Neuroscience*, Southampton, v. 16, p. 127, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/FNINS.2022.824888/BIBTEX>. Acesso em: 19 mai. 2023.

GIARDINI, A. C. et al. Neural Mobilization Treatment Decreases Glial Cells and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in the Central Nervous System in Rats with Neuropathic Pain Induced by CCI in Rats. *Pain Research and Management*, São Paulo, [s. v], [s. n], 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7429761>. Acesso em: 22 jun. 2020.

GOETTL, V. M. et al. Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. *Pain*, Columbus, v. 99, n. 1–2, p. 359–366, 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00209-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00209-9). Acesso em: 15 jul. 2020.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Reviews Immunology*, Boulder, v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3621>. Acesso em: 19 out. 2019.

GRANT, E.; HOERDER-SUABEDISSEN, A.; MOLNÁR, Z. Development of the corticothalamic projections. *Frontiers in Neuroscience*, Oxford, v. 06, p. 1–14, 2012. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2012.00053>. Acesso em: 02 nov. 2023.

GUILBAUD, G. et al. Modifications in the responsiveness of rat ventrobasal thalamic neurons at different stages of carrageenin-produced inflammation. *Brain research*, Paris, v. 385, n. 1, p. 86–98, 1986. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91550-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(86)91550-7). Acesso em: 11 jan. 2021.

GUILBAUD, G. et al. Thresholds and encoding of neuronal responses to mechanical stimuli in the ventro-basal thalamus during carrageenin-induced hyperalgesic

inflammation in the rat. *Experimental brain research*, Paris, v. 68, n. 2, p. 311–8, 1987. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00248797>. Acesso em: 14 abr. 2019.

GUILBAUD, G. et al. Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Journal of Neurophysiology*, Paris, v. 64, n. 5, p. 1537–1554, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.5.1537>. Acesso em: 27 out. 2020.

GUO, W. et al. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *Journal of Neuroscience*, Baltimore, v. 27, n. 22, p. 6006–6018, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0176-07.2007>. Acesso em: 06 mai. 2020.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, Berlin-Buch, v. 40, n. 2, p. 140–155, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10161>. Acesso em: 15 jul. 2021.

HIRAGA, S. I. et al. Microglial depletion under thalamic hemorrhage ameliorates mechanical allodynia and suppresses aberrant axonal sprouting. *JCI Insight*, Osaka, v. 5, n. 3, [s.p], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131801>. Acesso em: 22 fev. 2021.

HO, K. W.; WARD, N. J.; CALKINS, D. J. TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, Nashville, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC22737633/?tool=EBI>. Acesso em: 19 mai. 2019.

HSIAO, I. H.; LIN, Y. W. Electroacupuncture Reduces Fibromyalgia Pain by Attenuating the HMGB1, S100B, and TRPV1 Signalling Pathways in the Mouse Brain. *Taichung*, [s.v, s.n, s.p], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/2242074>. Acesso em: 15 jan. 2023.

HUANG, T. et al. Dexmedetomidine attenuates haemorrhage-induced thalamic pain by inhibiting the TLR4/NF- κ B/ERK1/2 pathway in mice. *Inflammopharmacology*, Yangzhou, v. 29, p. 1751–1760, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00877-w>. Acesso em: 30 mar. 2022.

HUANG, T. et al. Fgr contributes to hemorrhage-induced thalamic pain by activating NF- κ B/ERK1/2 pathways. *JCI insight*, Newark, v. 5, n. 20, [s.p], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139987>. Acesso em: 15 set. 2021.

INFANTINO, R. et al. MED1/BDNF/TrkB pathway is involved in thalamic hemorrhage-induced pain and depression by regulating microglia. *Neurobiology of Disease*, Naples, v. 164, [s.n], p. 105611, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105611>. Acesso em: 19 fev. 2023.

JACOBSON, J. A.; DANIEL, B. Vestibular reactions associated with minocycline. *Antimicrob. Agents chemother.*, Atlanta, v. 8, n. 4, p. 453–456, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.8.4.453>. Acesso em: 14 abr. 2019.

JENSEN, T. S. et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*, Norrebrogade, v. 152, n. 10, p. 2204–2205, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.017>. Acesso em: 18 jun. 2020.

Jl, R. R. et al. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev.*, Boston, v. 60, n. 1, p. 135–148, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2008.12.011>. Acesso em: 05 out. 2022.

Jl, R.R.; SUTER, M. R. Molecular Pain p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Pain*. Boston, v.03, p. 1-9, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-3-33>. Acesso em: 06 out. 2022.

JIN, Y. et al. Thalamocortical circuits drive remifentanil-induced postoperative hyperalgesia. *The Journal of Clinical Investigation*, Hefei, v. 132, n. 24, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.8.4.453>. Acesso em: 07 nov. 2022.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413:6852, San Francisco, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35093019>. Acesso em: 14 dez. 2019.

KROCK, E. et al. Low back pain and disc degeneration are decreased following chronic toll-like receptor 4 inhibition in a mouse model. *Osteoarthritis and Cartilage*, Montreal, v. 26, n. 9, p. 1236–1246, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.06.002>. Acesso em: 12 mar. 2021.

LACAGNINA, M. J.; WATKINS, L. R.; GRACE, P. M. Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacology and Therapeutics*. Houston, v. 184, [s.n], p.145-158, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.006>. Acesso em: 27 set. 2019.

LEBLANC, B. W. et al. Minocycline injection in the ventral posterolateral thalamus reverses microglial reactivity and thermal hyperalgesia secondary to sciatic neuropathy. *Neuroscience Letters*, Providence, v. 498, n. 2, p. 138–142, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.04.077>. Acesso em: 31 abr. 2019.

LEHNARDT, S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, Berlin, v. 58, n. 3, p. 253–263, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.20928>. Acesso em: 03 fev. 2020.

LEI, J. et al. Specific thalamic nuclei function as novel ‘nociceptive discriminators’ in the endogenous control of nociception in rats. *Neuroscience*. Xi'an, v. 232, p. 53–63, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.021>. Acesso em: 09 out. 2020.

LIANG, T. et al. Secondary damage and neuroinflammation in the spinal dorsal horn mediate post-thalamic hemorrhagic stroke pain hypersensitivity: SDF1-CXCR4 signaling mediation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Xi'an, v. 15, n. August, p. 1–19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.911476>. Acesso em: 17 set. 2022.

LIN, J. J. et al. Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats. *Scientific Reports*, Xi'an, v. 5, [s.n], p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep12549>. Acesso em: 01 jun. 2020.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Houston, v. 2, n. April, p. 2, e17023, 2017. Disponível em: <https://doi.org/>

10.1038/sigtrans.2017.23. Acesso em: 23 ago. 2022.

LIU, X. et al. Toll-like receptors and their role in neuropathic pain and migraine. *Molecular Brain*, Lanzhou, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13041-022-00960-5>. Acesso em: 16. Out. 2022.

LÓPEZ-BENDITO, G. Development of the Thalamocortical Interactions: Past, Present and Future. *Neuroscience*, Sant Joan d'Alacant, v. 385, p. 67–74, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.020>. 09 jan. 2019.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: Diagnosis and treatment. *Practical Neurology*, Verona, v. 13, n. 5, p. 292–307, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/practneurol-2013-000536>. Acesso em: 15 jun. 2019.

MAI, L. et al. p38 mitogen-activated protein kinase and pain. *Life Sciences*, Guangzhou, v. 256, p. 117885, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.117885>. Acesso em: 18 out. 2022.

MALTA, I. et al. Investigation of the effects of therapeutic ultrasound or photobiomodulation and the role of spinal glial cells in osteoarthritis-induced nociception in mice. *Lasers in Medical Science*, Alfenas, v. 37, n. 3, p. 1687–1698, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03418-7>. Acesso em: 07 jun. 2022.

MANNARI, T. et al. Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. *Glia*, Sakyoku, v. 61, n. 6, p. 957–971, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/GLIA.22488>. Acesso em: 14 out. 2019.

MARRONE, M. C. et al. TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nature Communications*, Roma, v. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms15292>. Acesso em: 19 nov. 2019.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, Epalinges, v. 14, n. 1, p. 10–22, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/GLIA.22488>. Acesso em: 16 jan. 2021.

MATARAZZO, A. P. et al. Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Alfenas, v. 159, n. January, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105698>. Acesso em: 01 set. 2022.

MEACHAM, K. et al. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Current Pain and Headache Reports*, St. Louis, v. 21, p.28, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0629-5>. Acesso em: 04 abr. 2020.

MEDEIROS, R. et al. The role of TNF- α signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by β -amyloid peptide. *Behavioural Brain Research*, Santa Catarina, v. 209, n. 1, p. 165–173, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.040>. Acesso em: 03 mar. 2021.

MESSIER, C.; ÉMOND, S.; ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Ottawa, v. 63, n. 2, p. 313–318, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0091->

3057(98)00247-0. Acesso em: 09 jul. 2019.

MIKA, J. et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, Krakow, v. 716, n. 1–3, p. 106–119, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.072>. Acesso em: 13 mai. 2020.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, Paris, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3). Acesso em: 10 ago. 2019.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, Albuquerque, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2533>. Acesso em: 02 set. 2019.

MIN, H. et al. Association of TRPV1 and TLR4 through the TIR domain potentiates TRPV1 activity by blocking activation-induced desensitization. *Molecular Pain*, Seoul, v. 14, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1744806918812636>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MIYAKE, T. et al. Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*, Kyoto, v. 63, n. 10, p. 1870–1882, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.22854>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MÒDOL, L.; COBIANCHI, S.; NAVARRO, X. Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, Bellaterra, v. 155, n. 8, p. 1577–1590, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.05.004>. Acesso em: 03 fev. 2020.

MORAES, T. R. et al. Participation of CXCL1 in the glial cells during neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, Alfenas, v. 875, p. 173039, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173039>.

MUNEOKA, S. et al. TLR4 in circumventricular neural stem cells is a negative regulator for thermogenic pathways in the mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, Sakyo-ku, v. 331, p. 58–73, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.04.017>. Acesso em: 16 jul. 2020.

MURNION, B. P. Neuropathic pain: Current definition and review of drug treatment. *Australian Prescriber*, Sydney, v. 41, n. 3, p. 60–63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18773/austprescr.2018.022>. Acesso em: 22 nov. 2020.

NAKAJIMA, M.; HALASSA, M. M. Thalamic control of functional cortical connectivity. *Current Opinion in Neurobiology*, New York, v. 44, p. 127–131, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.001>. Acesso em: 20 nov. 2019.

OLIVEIRA, J. J. O.; PORTELLA, J. C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Revista Dor*, São Paulo, v. 17, n. Suppl 1, p. 35–42, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1806-0013.20160045>. Acesso em: 12 jan. 2020.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Current opinion in supportive and palliative care*, Tucson, v. 8, n. 2, p. 143–51, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/SPC.000000000000055>. Acesso em: 09 mar. 2020.

PAULONI DE FREITAS, A. P.; TADA, A.; ANTIORIO, F. B. Vias de administração de substâncias. *Serviço de Apoio Veterinário Especializado Unicamp*, São Paulo, 2020. Disponível em: ib.unicamp.br/comissoes/system/files/2021-09/VIAS%20DE%20ADMINISTRAÇÃO%20SUBSTÂNCIAS_2020.pdf. Acesso em: 29 mai 2023.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 4. ed. [s.n,s.v,s.p] Academic Press, 2012. Acesso em: 20 dez 2020.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. Munich, v. 29, n. 9, p.e45, 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>. Acesso em: 12 dez. 2019.

POOBALAN, A. S. et al. Chronic pain and quality of life following open inguinal hernia repair. *British Journal of Surgery*, Aberdeen, v. 88, n. 8, p. 1122–1126, 2001. Disponível em: <http://doi.org/10.1046/j.0007-1323.2001.01828.x>. Acesso em: 14 set. 2020.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges and compromises. Baltimore, [s.v,s.n,s.p], 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>. Acesso em: 13 jan. 2021.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, Meibergdreef. v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4). Acesso em: 07 abr. 2020.

RUBARTELLI, A. et al. A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO Journal*, Genova, v. 9, n. 5, p. 1503–1510, 1990. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08268.x>. Acesso em: 30 mai. 2020.

SALT, T. E. et al. Neuropharmacology Function of mGlu1 receptors in the modulation of nociceptive processing in the thalamus. *Neuropharmacology*, London, v. 79, p. 405–411, 2014. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.12.016>. Acesso em: 12 mar. 2020.

SCHILLING, T.; EDER, C. Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *Journal of Neuroimmunology*, London, v. 216, n. 1–2, p. 118–121, 2009. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.07.008>. Acesso em: 05 jul. 2020.

SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Current Pain and Headache Reports*, Dundee, v. 16, n. 3, p. 191–198, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s11916-012-0256-0>. Acesso em: 07 out. 2020.

SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clinical therapeutics*, Rockaway, v. 27, n. 9, p. 1329–1342, 2005. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2005.09.005>. Acesso em: 14 jul. 2021.

SOMELAR, K. et al. Development of depression-like behavior and altered hippocampal neurogenesis in a mouse model of chronic neuropathic pain. *Brain*

- Research, Tartu, v. 1758, p. 147329, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147329>. Acesso em: 09 dez. 2022.
- ST. JOHN SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of Neurology*, Cambridge, v. 265, n. 2, p. 231–238, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00415-017-8641-6>. Acesso em: 12 out. 2020.
- SUN, Y. et al. The over-production of TNF- α via Toll-like receptor 4 in spinal dorsal horn contributes to the chronic postsurgical pain in rat. *Journal of Anesthesia*, Urumqi, v. 29, n. 5, p. 734–740, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00540-015-2011-2>. Acesso em: 19 abr. 2020.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, Suita, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>. Acesso em: 02 ago 2019.
- TANGA, F. Y.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J. A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dartmouth, v. 102, n. 16, p. 5856–61, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501634102>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- TAYLOR A. M. N. et al. Topography of microglial activation in sensory and affect related brain regions in chronic pain. *Physiology & behavior*, Los Angeles, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jnr.23883>. Acesso em: 28 nov. 2019.
- TORRES, K. R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev.*, Baltimore, v. 60, n. 1, p. 57–64, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- TU, T. H. et al. Visfatin Triggers Anorexia and Body Weight Loss through Regulating the Inflammatory Response in the Hypothalamic Microglia. *Mediators of Inflammation*, Incheon, v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/1958947>. Acesso em: 02 ago. 2020.
- UDALL, M. et al. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. *Journal of Pain Research*, New York, v. 12, p. 243–253, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/JPR.S160504>. Acesso em: 16 set. 2019.
- VANIA, A. A. et al. Expression of IL-1 β in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosciences Letters*, Chicago, v. 407, n. 2, p. 176–181, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.034>. Acesso em: 15 mai. 2020.
- WANG, X. et al. TRPV1 translocated to astrocytic membrane to promote migration and inflammatory infiltration thus promotes epilepsy after hypoxic ischemia in immature brain. *Journal of Neuroinflammation*, Wuhan, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12974-019-1618-X>. Acesso em: 04 fev. 2020.
- WANG, Y. M. et al. Activation of p38MAPK in spinal microglia contributes to autologous nucleus pulposus-induced mechanical hyperalgesia in a modified rat model of lumbar disk herniation. *Brain Research*, Guangzhou, v. 1742, n. July, p. 146881, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146881>. Acesso em: 13 set. 2022.

WATKINS L.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.*, Boulder, v. 24, n. 8, p. 450–5, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01854-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01854-3). Acesso em: 16 mar. 2021.

WELKER, W. I. Principles of organization of the ventrobasal complex in mammals. *Brain, Behavior and Evolution*, Madison, v. 7, n. 4, p. 253–336, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000124417>. Acesso em: 30 jan. 2019.

WOLF, M. et al. A thalamic bridge from sensory perception to cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Bordeaux, v. 120, n. October 2020, p. 222–235, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.013>. Acesso em: 15 fev. 2022.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, Charlestown, v. 55, n. 3, p. 353–364, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>. Acesso em: 17 out. 2019.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science*, Charlestown, [s.n, s.v, s.p], 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1765>. Acesso em: 14 jan. 2019.

WU, D. et al. Reciprocal interactions between the human thalamus and periaqueductal gray may be important for pain perception. *Experimental Brain Research*, Oxford, v. 232, n. 2, p. 527–534, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3761-4>. Acesso em: 23 mar. 2020.

WU, L. et al. Toll-Like Receptor 4: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Mediators of inflammation*, Shijiazhuang, [s.n], v. 2022, p. 7924199, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/7924199>. Acesso em: 18 abr. 2023.

YAM, M. F. et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, Serdang, v. 19, n. 8, p. 2164, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS19082164>. Acesso em: 12 jun. 2019.

YANG, F. et al. SDF1-CXCR4 signaling maintains central post-stroke pain through mediation of glial-neuronal interactions. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, Xi'an, [s.n], v. 10, p. 226, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00226>. Acesso em: 29 out. 2020.

YANG, S.; CHANG, M. C. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. *International Journal of Molecular Sciences*, Seoul, v. 20, n. 13, [s.p], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS20133130>. Acesso em: 13 set. 2020.

YEN, C. T.; LU, P. L. Thalamus and pain. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, Taipei, v. 51, n. 2, p. 73-80, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aat.2013.06.011>. Acesso em: 09 jun. 2022.

YU, J. M. et al. Up-regulation of HCN2 channels in a thalamocortical circuit mediates allodynia in mice. *National Science Review*, Hefei, v. 10, n. 2, [s.p], 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NSR/NWAC275>. Acesso em: 27 out. 2023.

ZHANG, H. Y. et al. A1 astrocytes contribute to murine depression-like behavior and cognitive dysfunction, which can be alleviated by IL-10 or fluorocitrate treatment.

Journal of Neuroinflammation, Beijing, v. 17, n. 1, p. 200, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01871-9>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ZHAO, P.; WAXMAN, S. G.; HAINS, B. C. Sodium channel expression in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus after peripheral nerve injury. *Molecular Pain*, New Haven, [s.n], v. 2, p. 27, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-2-27>. Acesso em: 04 mar. 2022.

ZHAO, P.; WAXMAN, S. G.; HAINS, B. C. Modulation of thalamic nociceptive processing after spinal cord injury through remote activation of thalamic microglia by cysteine-cysteine chemokine ligand 21. *Journal of Neuroscience*, Connecticut, v. 27, n. 33, p. 8893–8902, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2209-07.2007>. Acesso em: 19 out. 2021.

ZHAO, S. et al. Effects of nanoparticle-encapsulated curcumin on HIV-gp120-associated neuropathic pain induced by the P2X3 receptor in dorsal root ganglia. *Brain Research Bulletin*, Jiangxi, v. 135, n. May, p. 53–61, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.09.011>. 09 out. 2022.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, Germany, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201). 07 jan. 2019.