



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

MARIO ROBERTO PONTES LISBOA

BLOQUEIO DA VIA DA FRACTALCINA REDUZ A HIPERALGESIA E IMPEDE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS GLIAIS: DIFERENÇAS ENTRE AS DORES OROFACIAIS INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA EM RATOS.

FORTALEZA

2019

MARIO ROBERTO PONTES LISBOA

BLOQUEIO DA VIA DA FRACTALCINA REDUZ A HIPERALGESIA E IMPEDE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS GLIAIS: DIFERENÇAS ENTRE AS DORES OROFACIAIS INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA EM RATOS.

Tese de Doutorado (Qualificação) apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Lima Vale

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L749b Lisboa, Mario Roberto Pontes.

Bloqueio da via da fractalcina reduz a hiperalgesia e impede alterações morfológicas gliais : diferenças entre as dores orofaciais inflamatória e neuropática em ratos / Mario Roberto Pontes Lisboa. – 2019.

76 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.

1. Neuralgia do Trigêmeo. 2. Transtornos da Articulação Temporomandibular. 3. Quimiocina CX3CL1. 4. Neuroglia. 5. Microglia. I. Título.

CDD 610

---

MARIO ROBERTO PONTES LISBOA

BLOQUEIO DA VIA DA FRACTALCINA REDUZ A HIPERALGESIA E IMPEDE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS GLIAIS - DIFERENÇAS ENTRE AS DORES OROFACIAIS INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA EM RATOS.

Tese de Doutorado (Qualificação) apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais

Data de aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Lima Vale (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Geanne Matos de Andrade

Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lívia Maria Sales Pinto Fiamengui

Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Antoniella Souza Gomes Duarte

Universidade Federal do Ceará

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Rolim Campos Barros

Universidade de Fortaleza

*À minha família, meu porto seguro e  
minha fonte de inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

Profiro os mais profundos agradecimentos à minha orientadora, professora **Mariana Vale**, por todo o empenho e a paciência de propagar seu conhecimento e de me ajudar, não somente nesta pesquisa, mas em tudo que fosse necessário. Óbvio que vieram momentos complicados e de correria, mas o engrandecimento advindo dessas situações foi ímpar, insubstituível. Obrigado por proporcionar essa incrível experiência no Doutorado (e desde o Mestrado) e por ser uma das principais responsáveis pelo processo de amadurecimento (científico, profissional e pessoal) vivido por mim nesses últimos anos.

À professora **Delane Gondim**, minha co-orientadora e apoiadora. Agradeço por insistir nas orientações e pelos vários ensinamentos que seguem desde 2012. Sou eternamente grato por tê-la como parte da minha vida acadêmica. Você é uma das melhores professoras que já conheci.

À professora **Mônica Studart**, minha mãe odontológica. Muito obrigado pelo suporte emocional, clínico e científico, mas principalmente pelo incentivo e estímulo que sempre me foi dado desde a graduação até hoje.

À professora **Flávia Furlaneto**, quem me iniciou na carreira de pesquisador, pela qual me apaixonei. Sempre serei grato por todos os seus ensinamentos.

À professora **Daniele Gaspar**, pelas valorosas contribuições sugeridas durante o processo de qualificação.

À **Anamaria Falcão**, por ter sido a minha principal fonte de apoio dentro do laboratório e por estar sempre disposta a ajudar. Foram muitos experimentos nossos (e de outras pessoas) e foi melhor porque estávamos trabalhando juntos. Muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos e colegas de Doutorado do laboratório, **Bruno Freitas, Fábio Bezerra, Rafael Santana, Sarah Sanders, Ricardo Lima e Kalina Oliveira**, pela ajuda em todos os procedimentos laboratoriais.

Aos alunos de Iniciação Científica **Clertiani Alves, Cristiane Maria, Diego Bernarde e Everton Cavalcante** pelo auxílio e trabalho árduo na execução deste projeto.

À **Vandinha**, técnica do laboratório LAFICA, pelo tempo cedido e pela valerosa ajuda.

A **todos os membros do laboratório LAFICA**, pelos momentos científicos e de descontração.

À Central Analítica da UFC, na pessoa da **Rosemayre Freire** pela realização das fotos de microscopia confocal.

Ao **Programa em Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais**, por oferecer suporte técnico e científico durante o curso de Doutorado.

À **CAPES e à FUNCAP**, pelo auxílio financeiro para execução de parte deste projeto.

À **Universidade Federal do Ceará**, por ter sido minha casa nos últimos 12 anos e pela oportunidade de aqui concluir todos os graus acadêmicos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos **meus pais**, por prestarem todo o apoio e toda a assistência, por terem se empenhado em me proporcionar tudo que teve aos seus alcances. Sou e sempre serei completa e eternamente grato a vocês.

Às minhas irmãs, **Lia e Roberta**, por estarem constantemente me encorajando em todos os aspectos.

Ao **Pietro**, pelo companheirismo e pelo apoio nos últimos dez anos. Sua presença faz tudo ser mais leve.

À **Camila Carvalho**, minha companheira de trabalho, amiga e confidente. Muito obrigado por estar presente até quando a guardas estão altas.

Aos **meus amigos**, por sempre se fazerem presentes, até nos momentos de extrema correria em que eu não pude estar presente para eles.

Aos **meus alunos**, por me estimularem a seguir a carreira acadêmica e por me fazerem sentir-me cada dia mais realizado com ela. Um destaque ainda mais especial aos integrantes do **NUFID**, a quem tenho um apreço totalmente diferenciado.

## RESUMO

As dores orofaciais, inflamatórias ou neuropáticas, afetam até 90% da população. Recentemente, as células da glia têm ganhado um grande foco no processo de desenvolvimento das dores. A via da fractalcina (FKN) é um mecanismo de comunicação entre neurônios e células gliais que parece estar fortemente relacionado a estados de dor. Esta via envolve a ativação do receptor purinérgico  $P_2X_7$ , a liberação de catepsina S (CatS) e a produção de citocinas através da ativação da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p-38 MAPK). O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de inibidores da via da FKN na hiperalgesia/alodinia nas dores orofaciais inflamatórias e neuropáticas em ratos, focando nas alterações morfológicas de micróglias e células satélites gliais (CSGs) e nas diferenças entre os modelos experimentais de artrite da articulação temporomandibular induzida por zimosan e de ligadura do nervo infraorbital. Setenta ratos macho foram submetidos à artrite da articulação temporomandibular induzida por zimosan ou à constrição do nervo infraorbital e foram tratados com infusão intratecal de um antagonista do receptor  $P_2X_7$  (BBG), um inibidor da CatS (LHVS) ou um inibidor da p38 MAPK. A hiperalgesia/alodinia mecânica foi avaliada 4h e 6h após a indução da artrite ou 7 e 14 dias após a ligadura do nervo infraorbital. A expressão do receptor de FKN ( $CX_3CR_1$ ), de p38 MAPK fosforilada (fosfo-p-38 MAPK), da molécula adaptador ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1; marcador de micróglias), e de glutamina sintetase (marcador de CSGs), bem como as diferenças morfológicas em micróglias e CSGs, foram avaliadas por imunofluorescência e microscopia confocal. Os dois modelos experimentais foram capazes de reduzir o limiar nociceptivo e aumentar a expressão de  $CX_3CR_1$  ( $p < 0,05$ ). Em ambos os modelos inflamatório e neuropático, animais não tratados desenvolveram hiperalgesia e aumento da expressão de fosfo-p-38 MAPK, evento prevenido por todos os fármacos inibidores da via da FKN ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o modelo de dor neuropática induziu um aumento mais proeminente que o observado na dor inflamatória na fosforilação da p38 MAPK ( $p < 0,05$ ). O número de processos microglioais e o tamanho total de processos celulares de micróglia estavam significativamente reduzidos nos animais não tratados, sendo essa alteração diferentes entre os modelos experimentais ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a marcação total de Iba-1 estava aumentada somente nos animais neuropáticos não tratados ( $p < 0,05$ ). Foi observado um aumento da área

média de CSGs por neurônio somente no modelo de dor inflamatória ( $p < 0,05$ ) e não no modelo de dor neuropática. Todas as alterações morfológicas foram, pelo menos parcialmente, revertidas pela modulação farmacológica da via da FKN ( $p < 0,05$ ). Pode-se concluir que o bloqueio da via da FKN pode ser uma estratégia terapêutica para as dores orofaciais inflamatórias agudas e neuropáticas, reduzindo a hiperalgesia mecânica pelo impedimento da fosforilação da p-38 MAPK e revertendo alterações morfológicas nas micróglias e nas CSGs no complexo trigeminal.

**Palavras-chave:** Neuralgia do Trigêmeo, Transtornos da Articulação Temporomandibular, Quimiocina CX3CL1, Neuroglia, Microglia.

## ABSTRACT

Orofacial pain, either inflammatory or neuropathic, affect up to 90% of the general population. Recently, glial cells have gained an increasing focus in the process of pain development. The fractalkine (FKN) pathway is a mechanism of crosstalk between neurons and glial cells which seems to be related to painful states. This pathway involves the activation of the purinergic receptor  $P_2X_7$ , secretion of cathepsin S e production of cytokines through the phosphorylation of the p-38 mitogen-activated kinase proteins (p-38 MAPK). The aim of this study was to evaluate the effects of inhibitors of the FKN pathway in hyperalgesia/allodynia in inflammatory and neuropathic orofacial pain in rats, focusing on the morphological changes in microglia and satellite glial cells (SGCs) and the differences among the experimental models of zymosan-induced temporomandibular joint arthritis and infraorbital nerve constriction. Seventy male rats were submitted to either zymosan-induced arthritis of the temporomandibular joint or infraorbital nerve constriction, and treated with intrathecal infusion of a purinergic  $P_2X_7$  antagonist (BBG), a cathepsin S inhibitor (LHVS) or a p-38 MAPK inhibitor (SB203580). Mechanical hyperalgesia was evaluated 4h and 6h after arthritis induction or 7 and 14 days following nerve ligation. The expression of the FKN receptor ( $CX_3CR_1$ ), phosphorylated p-38 MAPK (phospho-p-38 MAPK), ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1; microglial marker) and glutamine synthetase (SGCs marker) and the morphological changes in microglia and SGCs were evaluated by immunofluorescence and confocal microscopy. Both experimental models were capable of increasing the expression of  $CX_3CR_1$  ( $p < 0.05$ ), indicating that the FKN signaling might be important in the development of painful conditions in the orofacial complex. In both inflammatory and neuropathic models, untreated animals developed hyperalgesia and up-regulation of phospho-p-38 MAPK, which was prevented by all drugs ( $p < 0.05$ ). However, the model of neuropathic pain induced a more outstanding increase in p-38 MAPK phosphorylation, when compared to the inflammatory model ( $p < 0.05$ ). The number of microglial processes endpoints and total branch length were remarkably low in the untreated animals, but the overall immunolabeling of Iba-1 was only altered by neuropathic pain ( $p < 0.05$ ). The mean area of SGCs per neuron was significantly altered only in the inflammatory model ( $p < 0.05$ ) and not in the animals with neuropathic pain. All morphological alterations

were, at least partially, reverted by the pharmacological modulation of the FKN pathway ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the blockage of the FRK pathway could be a possible therapeutic strategy for inflammatory and neuropathic orofacial pain, reducing mechanical hyperalgesia by the impairment of the phosphorylation of p-38 MAPK and reverting morphological alterations in microglia and SGCs of the trigeminal complex.

**Key Words:** Trigeminal Neuralgia; Temporomandibular Joint Disorders; Chemokine CX3CL1; Neuroglia; Microglia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATM: Articulação temporo-mandibular

BBG: *Brilliant Blue G*

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

CatS: Catepsina S

CGRP-1: Receptor do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina-1

CSGs: Células satélite gliais

DTM: Disfunção da articulação temporo-mandibular

FKN: Fractalcina

GT: Gânglio trigeminal

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IL: Interleucina

LHVS: *morpholinurea-leucine-homopenylalanine-vinylsulfone phenyl*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

NT: Neuralgia trigeminal

p-38 MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno p-38

SB: SB203580

SC-V: Subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo

Sp5c: *subnucleus caudalis of the trigeminal spinal tract*

TG: *trigeminal ganglion*

TMJ: *temporomandibular joint*

TN: *trigeminal neuralgia*

TNF: Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1. <i>Dores orofaciais</i>	14
1.2. <i>Via trigeminal de condução da dor</i>	15
1.3. <i>Células da glia e dor</i>	16
1.4. <i>Via da fractalcina</i>	17
1.5. <i>Via da fractalcina e dor orofacial</i>	19
2. PROPOSIÇÃO	20
3. DESENVOLVIMENTO	21
3.1. <i>Blockage of the fractalkine pathway reduces hyperalgesia and prevents morphological glial alterations – comparison between inflammatory and neuropathic orofacial pain in rats</i>	
	<i>Lisboa, M.R.P.; Vale, M.L.</i> 22
4. CONCLUSÕES GERAIS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO 1	74
ANEXO 2	75

