

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FERNANDA SANTOS ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE UMA NANOPARTÍCULA DA DONEPEZILA
SOBRE A DOR NEUROPÁTICA VIA RECEPTORES COLINÉRGICOS ESPINHAIS
EM CAMUNDONGOS**

ALFENAS/MG

2024

FERNANDA SANTOS ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE UMA NANOPARTÍCULA DA DONEPEZILA
SOBRE A DOR NEUROPÁTICA VIA RECEPTORES COLINÉRGICOS ESPINHAIS
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia e farmacologia da dor.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Unidade Educacional Santa Clara

Rocha, Fernanda Santos.

Investigação do efeito de uma nanopartícula da donepezila sobre a dor neuropática via receptores colinérgicos espinhais em camundongos /
Fernanda Santos Rocha. - Alfenas, MG, 2024.

99 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Dor neuropática. 2. Donepezila. 3. Receptores colinérgicos. 4.
Micróglia. 5. Dor. I. Souza, Giovane Galdino de, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

FERNANDA SANTOS ROCHA

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE UMA NANOPARTÍCULA DA DONEPEZILA
SOBRE A DOR NEUROPÁTICA VIA RECEPTORES COLINÉRGICOS
ESPINHAIS EM CAMUNDONGOS

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 15 de abril de 2024.

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Talita Aparecida de Moraes Vrechi

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

UNICAMP

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia

Instituição: Universidade federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 16/04/2024, às 14:56, 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 **Fernanda Santos Rocha, Usuário Externo**, em 16/04/2024, às 16:19, 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 **1232784** e o código CRC **074AB91F**.

Ao meu amado filho, Joaquim Miguel Rocha Becker.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial ao meu filho, Joaquim, por ceder nosso precioso tempo juntos, por ser a força que me impulsiona a seguir em frente e por ser essa criança que transborda amor e me completa.

Agradeço aos meus pais, Danilo e Magna, por dedicarem suas vidas aos cuidados, sustento, carinho e educação da nossa família.

Ao Danilo Henrique, pelos momentos de amizade e alegria. E à minha madrinha, Mara, por todo o apoio e cuidado, principalmente com o Joaquim.

Agradeço ao Rodrigo por ser um grande companheiro, que sempre acredita em minha capacidade, me incentiva e me compreende em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos do laboratório, por grandes conhecimentos e momentos compartilhados, vocês tornaram o caminho mais leve e feliz. Em especial à Gabriela, que me apoiou de todas as maneiras possíveis, sua amizade foi meu grande presente do mestrado

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, por me proporcionar a oportunidade de iniciar um caminho que foi tão desejado e por toda a sua dedicação e empenho ao laboratório, proporcionando ótimas condições para a pesquisa, expresso aqui o meu reconhecimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Flavio Protasio Veras, pelos ensinamentos e contribuições para o estudo. Agradeço também à Prof. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira por nos fornecer o CLN-donepezila.

E também aos demais professores e funcionários que contribuíram de várias formas para o estudo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

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

“Um passo a frente e você já não está no mesmo lugar.”

(Chico Science, 1996)

RESUMO

A dor neuropática é proveniente de uma injúria no sistema somatossensorial, que pode ocorrer por doença ou outro tipo de lesão. Essa dor pode se manifestar através de vários sintomas, entre eles hiperalgesia e alodínia, prejudicando a qualidade de vida, e podendo até causar a incapacidade dos indivíduos acometidos. Desse modo, inúmeros estudos têm investigado diferentes estratégias de tratamento para a dor neuropática. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração nasal de um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) carregado com donepezila, o qual é um anticolinesterásico, sobre a dor neuropática; bem como, avaliar o envolvimento dos receptores muscarínicos do tipo 2 (mAChR M2) e nicotínicos do tipo $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$), e de micróglia neste processo. Para isso, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, submetidos ao modelo de constrição do nervo ciático (CCI). O limiar nociceptivo foi avaliado pelos testes de von Frey filamentos, no 21º dia pós CCI. Para verificar a influência do tratamento com CLN-donepezila na atividade motora foi realizado o teste do rotarod também no 21º dia pós CCI. A participação dos receptores mAChR M2 e nAChR $\alpha 7$ a nível espinal foi investigada por meio da administração intratecal (i.t.) dos respectivos antagonistas específicos dimetindeno e metilcaconitina, 10 minutos antes da administração nasal de CLN-donepezila. A expressão de mRNA referente a nAChR $\alpha 7$ e mAChR M2 e de micróglia foram avaliadas na medula espinal e no tálamo pela técnica de RT-PCR. E os níveis das citocinas IL-10, IL-1 β e TNF- α foram avaliados, tanto na medula espinal quanto no tálamo, utilizando a técnica de ELISA. A administração de CLN-donepezila reverteu a alodínia mecânica no 21º dia pós CCI e não influenciou a atividade motora dos animais. As administrações i.t. dos antagonistas preveniram o efeito antialodínico de CLN-donepezila. Foi verificado o aumento da expressão gênica do nAChR $\alpha 7$ no tálamo, mas não em medula. A expressão gênica do marcador microglial, TMEM119, encontrou-se aumentada na medula espinal somente no grupo CCI tratado com CLN-donepezila, e no tálamo nos grupos CCI não tratados e CCI tratados com CLN-donepezila. Por fim, foram avaliados pela técnica de ELISA os níveis das citocinas IL-10, IL-1 β e TNF- α , e não houve diferença dos níveis das citocinas na medula espinal entre os grupos, e no tálamo os níveis de TNF- α se mostrou mais elevado no grupo CCI, no grupo CCI tratado com CLN-donepezila esses níveis estavam reduzidos. Com base nesses resultados concluímos que CLN-donepezila é eficaz em reduzir a

alodínia mecânica induzida por CCI, e que os mecanismos desse efeito podem envolver os receptores nAChR $\alpha 7$ e mAChR M2 e a regulação de TNF- α a nível talâmico.

Palavras-chave: Dor neuropática; Donepezila; Receptores colinérgicos; Micróglia.

ABSTRACT

Neuropathic pain comes from an injury to the somatosensory system, which can occur due to illness or another type of injury. This pain can manifest itself through various symptoms, including hyperalgesia and allodynia, impairing the quality of life, and may even cause disability in the affected individuals. Therefore, numerous studies have investigated different treatment strategies for neuropathic pain. The present study aimed to evaluate the effect of nasal administration of a nanostructured lipid carrier (CLN) loaded with donepezil, which is an anticholinesterase, on neuropathic pain; as well as evaluating the involvement of type 2 muscarinic receptors (mAChR M2) and type $\alpha 7$ nicotinic receptors ($\alpha 7$ nAChR), and microglia in this process. For this, male mice of the C57BL/6 lineage were used, subjected to the sciatic nerve constriction (CCI) model. The nociceptive threshold was assessed by von Frey filament tests, on the 21st day after CCI. To verify the influence of treatment with CLN-donepezil on motor activity, the rotarod test was also performed on the 21st day after CCI. The involvement of mAChR M2 and nAChR $\alpha 7$ receptors at the spinal level was investigated through intrathecal (i.t.) administration of the respective specific antagonists dimetindene and methylaconitine, 10 minutes before nasal administration of CLN-donepezil. The expression of mRNA referring to nAChR $\alpha 7$ and mAChR M2 and microglia were evaluated in the spinal cord and thalamus using the RT-PCR technique. And the levels of the cytokines IL-10, IL-1 β and TNF- α were evaluated, both in the spinal cord and in the thalamus, using the ELISA technique. The administration of CLN-donepezil reversed mechanical allodynia on the 21st day after CCI and did not influence the animals' motor activity. The i.t. administrations of the antagonists prevented the antiallodynic effect of CLN-donepezil. An increase in gene expression of the $\alpha 7$ nAChR was observed in the thalamus, but not in the spinal cord. The gene expression of the microglial marker, TMEM119, was increased in the spinal cord only in the CCI group treated with CLN-donepezil, and in the thalamus in the untreated CCI and CCI groups treated with CLN-donepezil. Finally, the levels of the cytokines IL-10, IL-1 β and TNF- α were evaluated using the ELISA technique, and there was no difference in the levels of cytokines in the spinal cord between the groups, and in the thalamus, the levels of TNF- α were shown to be higher in the CCI group, in the CCI group treated with CLN-donepezil these levels were reduced. Based

on these results, we conclude that CLN-donepezil is effective in reducing mechanical allodynia induced by CCI, and that the mechanisms of this effect may involve the nAChR $\alpha 7$ and mAChR M2 receptors and the regulation of TNF- α at the thalamic level.

Key-words: Neuropathic pain; Donepezil; Cholinergic receptors; Microglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Imagem representativa da via nociceptiva.....	22
Figura 2 –	Sensibilização central.....	28
Figura 3 –	Interação entre células da glia e neurônios na sensibilização.....	30
Figura 4 –	Neurotransmissão colinérgica.....	38
Figura 5 –	Esquema ilustrativo de nAChRs homoméricos e heteroméricos....	40
Figura 6 –	Estrutura dos receptores muscarínicos de acetilcolina.....	43
Figura 7 –	Via de administração nasal.....	46
Figura 8 –	Passos da cirurgia de constrição do nervo ciático.....	51
Figura 9 –	Administração intratecal.....	54
Figura 10 –	Administração nasal.....	55
Figura 11 –	Teste de von Frey.....	57
Figura 12 –	Aparelho de rotarod.....	58
Figura 13 –	Esquema representativo do delineamento das avaliações do limiar nociceptivo e da função motora.....	64
Figura 14 –	Esquema representativo do delineamento da coleta de amostras para os testes biomoleculares.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1A – Avaliação do efeito da donepezila e CLN-donepezila no limiar nociceptivo.....	68
Gráfico 1B – Avaliação do efeito dos veículos da donepezila e CLN-donepezila no limiar nociceptivo.....	69
Gráfico 2 – Avaliação da coordenação motora de animais com DN após administração de donepezila e CLN-donepezila.....	66
Gráfico 3 – Participação dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 no efeito antinociceptivo do CLN-donepezila.....	67
Gráfico 4 – Expressão gênica dos receptores nACh 7 (A), e mACh M2(B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 21 ^o dia após CCI.....	68
Gráfico 5 – Expressão gênica de micróglia nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 21 ^o dia após CCI.....	69
Gráfico 6 – Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) na medula no 21 ^o dia após CCI.....	70
Gráfico 7 – Expressão gênica dos receptores nACh $\alpha 7$ (A), e mACh M2(B) talâmicos no 21 ^o dia após CCI.....	71
Gráfico 8 – Expressão gênica de micróglia no tálamo contralateral a lesão no 21 ^o dia após CCI.....	72
Gráfico 9 – Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) no tálamo contralateral a lesão 21 ^o dia após CCI.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Bradicinina
BchE	Butilcolinesterase
BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
Ca ²⁺	Íon cálcio
CB1	Receptor canabinóide do tipo 1
CB2	Receptor canabinóide do tipo 2
CCI	Lesão de constrição crônica do nervo ciático
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChAT	Colina acetiltransferase
CID	Classificação internacional de doenças
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
CLR	Receptor similar ao receptor de calcitonina
DAG	Diacilglicerol
DIM	Dimetindeno
DN	Dor neuropática
DPZ	Donepezila
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
E.P.M	Erro padrão da média
FR	Formação reticular
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GRD	Gânglio da raiz dorsal

GTP	Guanosina trifosfato
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
i.t.	Intratecal
LC	Locus coeruleus
mAChR	Receptor muscarínico para acetilcolina
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógeno
mGluR	Receptores metabotrópicos para glutamato
MTL	Metilcaconitina
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NK1	Receptor de neurocinina 1
PAMs	Modulador alostérico positivo
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3	Fosfatidilinositol 3
PLC	Fosfolipase C
RIPA	Tampão de ensaio radioimunoprecipitador
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RVM	Bulbo rostral ventromedial
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SNAP-25	proteína 25 associada ao sinaptossomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
Sub P	Substância P
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral
VACht	Transportador vesicular de acetilcolina
VN	Via nasal
VO	Via oral
VPL	Núcleo ventral posterolateral do tálamo
VPM	Núcleo ventral posteromedial do tálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	DOR E NOCICEPÇÃO	20
2.2	DOR NEUROPÁTICA.....	24
2.3	CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA	29
2.4	MODULAÇÃO SUPRAESPINHAL DA DOR.....	30
2.5	TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA	33
2.6	SISTEMA COLINÉRGICO E DOR.....	35
2.7	RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 7$	39
2.8	RECEPTOR MUSCARÍNICO M2	42
2.9	DONEPEZILA PARA O TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA	44
3	JUSTIFICATIVA	48
4	OBJETIVOS	49
4.1	OBJETIVO GERAL	49
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
5	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1	ANIMAIS	50
5.2	CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO (CCI)	50
5.3	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO ESTUDO.....	52
5.4	PREPARO DOS CLN-DONEPEZILA.....	53
5.5	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	53
5.5.1	Via de administração intratecal	53
5.5.2	Via de administração oral	53
5.5.3	Via de administração nasal	55
5.6	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	55
5.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA.....	58
5.8	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR-RT.....	59
5.9	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	60
5.10	GRUPOS EXPERIMENTAIS	61
5.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	63
5.11.1	Delineamento da avaliação do limiar nociceptivo, e da avaliação da função motora	63

5.11.2	Delineamento dos testes biomoleculares	65
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
6	RESULTADOS	67
6.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DONEPEZILA E CLN-DONEPEZILA NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE ANIMAIS COM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR CCI.....	67
6.2	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZILA E CLN-DONEPEZILA.....	69
6.3	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR nACh $\alpha 7$ e mACh M2 DA MEDULA ESPINAL NA ANTINOCEPÇÃO INDUZIDA POR CLN-DONEPEZILA	70
6.4	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NA EXPRESSÃO GÊNICA ESPINAL DOS RECEPTORES nACh $\alpha 7$ E mACh M2 E DA MICRÓGLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA.....	72
6.5	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA	73
6.6	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN – DONEPEZILA NA EXPRESSÃO GÊNICA TALÂMICA DOS RECEPTORES nACh $\alpha 7$ E mACh M2 E DA MICRÓGLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA	75
6.7	INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN–DONEPEZILA NOS NÍVEIS TALÂMICOS DE CITOCINAS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA.....	77
7	DISCUSSÃO	79
8	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO A – Certificado do Comitê de ética em pesquisa e uso animal..	99

1 INTRODUÇÃO

A dor é um componente vital do comportamento de autopreservação, mas devido a alterações na via nociceptiva e a combinação de fatores físicos, emocionais, psicológicos e sociais, podem ocorrer adaptações prejudiciais, levando a condições patológicas que tendem a tornar-se persistentes. Quando a dor perde seu papel fisiológico de proteção e reparo e se prolonga, ela compromete a qualidade de vida, o que é comum para indivíduos que sofrem de dor neuropática (Milligan; Watkins, 2009).

No Brasil, é estimado que 28,1% da população sofre de dor crônica (Leão Ferreira *et al.*, 2016); sendo que, 14,5% são de origem neuropática (Udall *et al.*, 2016). A dor neuropática (DN) é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- International Association for the Study of Pain) como uma dor causada por lesão ou doença no sistema somatossensorial (IASP, 2017). A lesão no nervo resulta em ativação da cascata inflamatória, e as células imunológicas liberam mediadores, que intensificam o processo inflamatório e contribui para a sensibilização dos neurônios (Sholz; Woolf, 2007). A nível central, mudanças nos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) desencadeiam uma cascata de eventos que amplificam o processo nociceptivo, e as células da glia, como os astrócitos e a micróglia, desempenham um papel crucial na sensibilização central (Latremliere; Woolf, 2009, Milligan; Watkins, 2009).

Após lesões nos nervos periféricos, estudos em animais observaram um aumento na atividade e proliferação de micróglia e astrócitos na região do corno dorsal da medula espinhal (Vallejo *et al.*, 2010). Essas células são ativadas por neurotransmissores liberados pelos neurônios nociceptivos primários e ativadas também através de interações diretas entre elas (Ren; Dubner, 2010), desencadeando a liberação de mediadores nociceptivos que sensibilizam os neurônios de segunda ordem, resultando em uma maior excitabilidade neuronal (Gosselin *et al.*, 2010). As células gliais contribuem para a intensificação dos sinais nociceptivos, mas em alguns casos elas podem modular negativamente essa resposta. A micróglia pode apresentar estados de polarização conhecidos como fenótipos M1 e M2. O fenótipo M1, quando ativado, libera fatores pró-inflamatórios, enquanto o fenótipo M2 é associado à produção de fatores anti-inflamatórios (Zhao *et al.*, 2017). A ativação da micróglia em direção ao fenótipo M2 pode ser uma

possibilidade terapêutica para a dor neuropática (Gui *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Yuan; Fei, 2022).

Os tratamentos disponíveis para a dor neuropática geralmente não proporcionam um alívio significativo. Além disso, os efeitos indesejáveis são frequentes e podem dificultar a adesão dos pacientes ao tratamento (Oliveira *et al.*, 2020). Diante esse cenário, estudos têm explorado o emprego de diferentes fármacos para o manejo da dor neuropática, dentre eles a donepezila.

Embora seja conhecida por tratar a doença de Alzheimer, a donepezila tem demonstrado eficácia contra a dor neuropática (Clayton *et al.*, 2007; Ferrier *et al.*, 2015; Selvy *et al.*, 2022). Atuando como um inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela quebra da acetilcolina (ACh), a donepezila aumenta as concentrações de ACh na fenda sináptica, o que permite maior ativação dos receptores de acetilcolina (Zeb *et al.*, 2017). Foi visto que o aumento da concentração de ACh na medula espinal é capaz de gerar antinocicepção (Matsumoto *et al.*, 2007). Os receptores colinérgicos estão sendo abordados no tratamento da dor (Naser; Kuner, 2018). Entre eles, os receptores muscarínicos do tipo M2 (mAChR M2) e os receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$), já foram relacionados com a nocicepção. Nesse estudo, investigamos esses receptores como alvos do efeito da donepezila sobre a dor neuropática. Pesquisas revelam a presença de receptores colinérgicos em células da glia (Gamage *et al.*, 2020). No entanto, até o momento, não houve investigações sobre a expressão desses receptores em células da glia espinal durante a nocicepção. Apesar da falta de estudos, as células da glia espinal podem representar um importante alvo na antinocicepção mediada pela donepezila durante a dor neuropática. Por isso, avaliamos o efeito da donepezila sobre a micróglia via receptores colinérgicos durante a dor neuropática em camundongos.

Apesar do efeito antinociceptivo promovido pela donepezila, observado em estudos com animais (Clayton *et al.*, 2007; Ferrier *et al.*, 2015; Selvy *et al.*, 2022), a administração oral de donepezila apresenta inconvenientes como diarreia, bradicardia, vômito, insônia e anorexia (Zhang *et al.*, 2019). Uma das tentativas para solucionar estes problemas é a administração nasal. Com o intuito de viabilizar a administração nasal de donepezila, foram empregados no presente trabalho carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carregados com donepezila (CLN-donepezila), previamente desenvolvidos. E foi avaliado o efeito antinociceptivo de

CLN-donepezila, em camundongos com dor neuropática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- International Association for the Study of Pain), define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada ao dano potencial ou real (Raja *et al.*, 2020). Dentro de condições ideais tal sensação desagradável, que é a dor, provoca um comportamento cauteloso diante possíveis ameaças a integridade do organismo, além de causar respostas reflexas frente a estímulos nocivos, funcionando assim como um mecanismo protetor (Milligan; Watkins, 2009). Para exemplificar a relevância da dor para a sobrevivência, podemos mencionar o fato de que indivíduos insensíveis a dor vivenciam graves alterações do estado de saúde ainda na infância, por não aprenderem comportamentos protetivos ou por não perceberem doenças, e ferimentos (Cox *et al.*, 2006).

A dor é uma experiência multidimensional, envolve condições sensoriais, assim como afetivas e cognitivas, e não pode ser compreendida meramente pela atividade dos neurônios sensoriais (Shahiri *et al.*, 2022). Mas essa atividade é essencial para que na presença de uma injúria ocorra a dor, pois de início é necessário um processamento fisiológico denominado nocicepção, termo que se refere a atividade neural que detecta, codifica e organiza os estímulos nocivos (Steeds, 2009). O estágio inicial da nocicepção é a transdução, que ocorre quando os estímulos (que podem ser mecânicos; térmicos ou químicos) provocam a ativação de diversos receptores presentes em terminações nervosas de neurônios aferentes, denominados nociceptores (McCleskey, Gold, 1999).

Muitos dos receptores localizados na membrana plasmática dos nociceptores são canais iônicos que diante de estímulos, como por exemplo variações de temperatura ou pH, presença de ligantes químicos ou pressão, sofrem uma alteração conformacional que gera uma abertura que permite o influxo de determinados cátions, essa entrada de carga positiva altera o potencial elétrico e se for suficiente para atingir o limiar de excitabilidade daquele neurônio, irá desencadear um potencial de ação (Mcentire *et al.*, 2016).

Os estímulos que são convertidos em impulsos nervosos nas terminações

nervosas livres, localizadas nos tecidos periféricos, são conduzido pelos axônios dos nociceptores (dos quais os corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD), ou gânglio trigeminal) até o corno dorsal da medula espinal ou ao tronco encefálico, onde há uma sinapse em que o nociceptor, como consequência do impulso nervoso, libera diversas substâncias excitando o neurônio aferente de segunda ordem (Yam *et al.*, 2018).

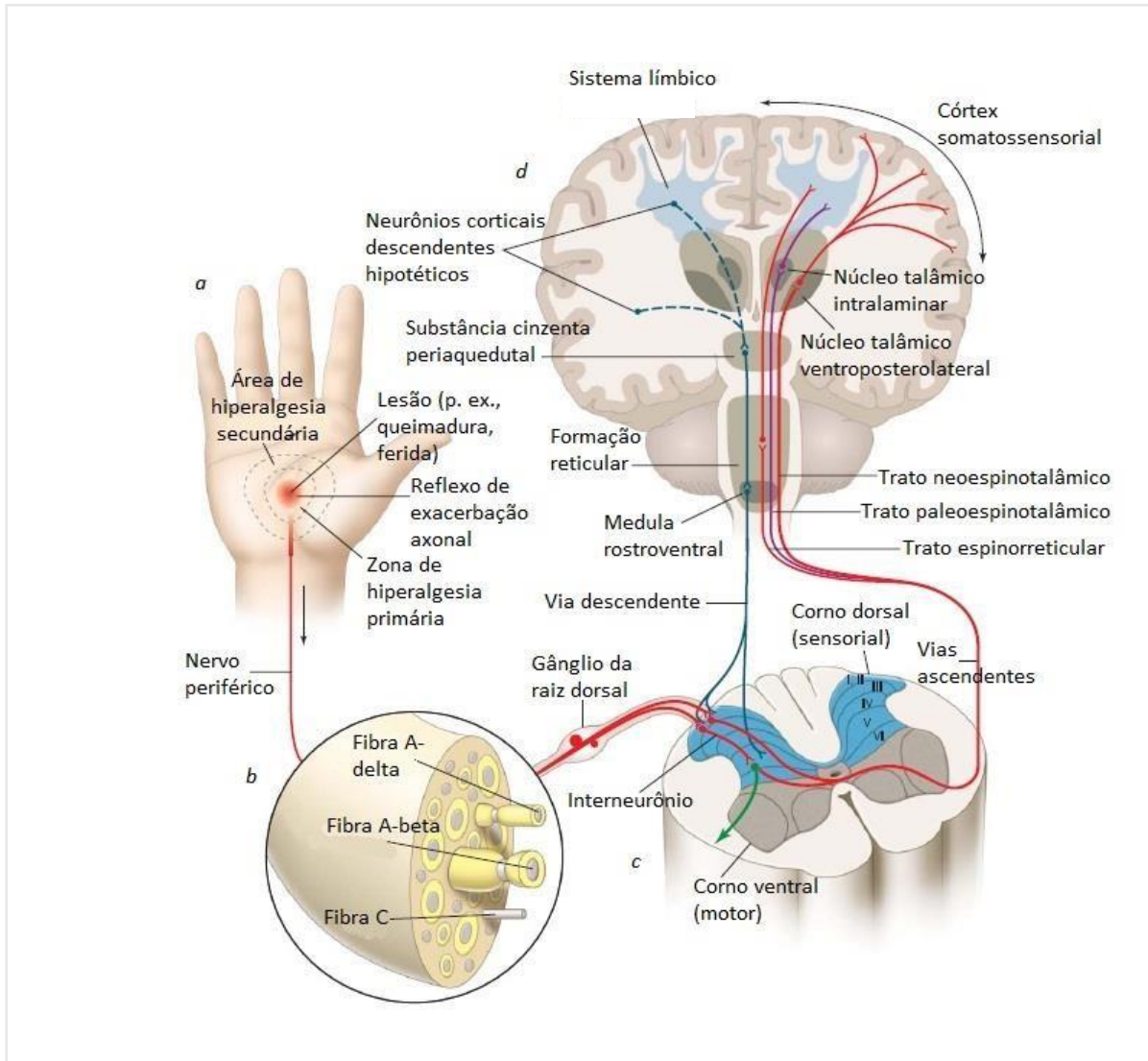
Os nociceptores são constituídos por diferentes tipos de fibra: fibras A δ que são mielinizadas e de calibre médio, possuem uma velocidade de condução média de impulsos mecânicos e térmicos, e nessa fibra o impulso provoca a liberação principalmente de neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato, na sinapse com o neurônio de segunda ordem. Já as fibras C não mielinizadas e de pequeno diâmetro, conduzem mais lentamente estímulos inócuos e também estímulos térmicos, químicos e mecânicos, liberam especialmente substância P (Sub P) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Existe ainda fibras A β que não contribuem com a nocicepção e sim com a transmissão de impulsos relacionados com tato, vibração e pressão (Julius; Basbaum, 2001).

O glutamato, ativa os receptores α -amino-3- hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato, e ao acionar esses receptores ionotrópicos, promove a abertura deles e o influxo de cátions no neurônio de segunda ordem, gerando a despolarização da membrana desse neurônio. A Sub P se liga ao receptor de neurocinina-1 (NK1) e o CGRP ao receptor similar ao receptor de calcitonina (CLR) que são receptores metabotrópicos do tipo acoplados à proteína G (GPCR), então a ativação desses receptores leva a sinalização de segundos mensageiros intracelulares, e como consequência uma série de eventos que contribuem também com a entrada de cátions e por fim a despolarização do neurônio (Russell *et al.*, 2014; Yam *et al.*, 2018).

Após a integração na medula espinal, prossegue a transmissão do sinal nociceptivo, através dos axônios dos neurônios de segunda ordem, que cruzam contralateralmente e ascendem para o tálamo, onde acontece a comunicação com neurônios de terceira ordem e esses por sua vez propagam o sinal até o córtex somatossensorial, ponto em que o sinal nociceptivo será integrado com aspectos cognitivos e afetivos, e interpretado desencadeando uma percepção individual da dor (Cohen; Mao, 2014). A representação da via nociceptiva pode ser observada na

Figura 1.

Figura 1- Imagem representativa da via nociceptiva.



Fonte: Adaptado de Oaklander, 2011.

Legenda: A transmissão nociceptiva se inicia com a transdução de estímulo prévio de origem química, elétrica ou mecânica nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários. O impulso transformado em potencial elétrico é transmitido em direção ao SNC. No corno dorsal da medula espinhal, há a sinapse com neurônios de segunda ordem que cruzam contralateralmente e ascendem para o tálamo (núcleo ventral posteromedial, posterolateral e intralaminar), onde ocorre a comunicação com neurônio aferente terciário, que transmitem o impulso até o córtex somatossensorial. Projeções neuronais descendentes modulam as vias ascendentes na medula espinhal.

Em seu trajeto o estímulo nociceptivo é modulado, ou seja, regulado positivamente ou negativamente por mecanismos modulatórios que são de grande valor, pois sensibilizam ou inibem a nocicepção em todos os seus estágios, e assim provocam uma adequação na resposta de dor. A modulação nos diversos níveis da via nociceptiva, ocorre de maneira ascendente e descendente (Woolf, 2011). A nível

medular a ativação de fibras mecânicas não nociceptivas A β , suprime o sinal nociceptivo através da estimulação de interneurônios inibitórios, estes interneurônios liberam neurotransmissores como o ácido γ -aminobutírico (GABA) causando hiperpolarização dos neurônios de segunda ordem, mecanismo chamado de “teoria do portão” (Melzack; Wall, 1965). A modulação também acontece através de opioides endógenos, como endorfina, dinorfina e encefalina que se ligam em seus receptores opioides encontrados na medula espinal (lâminas I e II) e substância cinzenta periaquedutal (SCP). Além da liberação de opioides endógenos, a SCP pode ativar regiões como, o bulbo rostral ventromedial (RVM), a formação reticular (FR) e locus coeruleus (LC) na ponte, que liberam neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina e GABA, essas regiões possuem fibras que se projetam para a medula espinal, local onde esses neurotransmissores irão modular a excitabilidade dos neurônios ascendentes, esse sistema inibitório descendente permanece inibido até que algum estímulo periférico e também fatores como exercício físico e estresse interrompem a inibição desse mecanismo, assim aumenta a liberação desses neurotransmissores que atuam na medula espinal inibindo a via nociceptiva seja ativando interneurônios inibitórios ou atuando diretamente no neurônio de segunda ordem (Kaye; Theaker, 2001; Lee; Neumeister, 2020).

A eficácia dos mecanismos modulatórios da dor são de extrema importância, um desajuste na modulação nociceptiva pode levar ao aumento da dor de forma anormal. Um exemplo disso é que a ineficiência da inibição descendente pode estar associada com a dor crônica (Ossipov; Morimura; Porreca, 2014). A dor crônica é assim classificada considerando seu aspecto temporal, já que ela pode durar meses ou anos, e é capaz de persistir mesmo não estando associada à lesão. Diferente da dor aguda que dura segundos, dias ou semanas, e normalmente é uma resposta a lesão tecidual que funciona como alerta, a dor crônica não tem propriedade adaptativa ou de alerta, a dor nesse caso deixa de ser um sintoma e passa a ser uma patologia (Schaible, 2007). Além de deficiência no sistema de inibição, os sistemas de transmissão e percepção da dor podem apresentar alterações que favorecem a cronificação da dor, de modo que vários mecanismos do sistema somatossensorial são acionados de maneira atípica, contribuindo para modificações da percepção da dor (Ossipov; Morimura; Porreca, 2014).

Vários fatores podem desencadear a transformação da dor aguda em dor

crônica, por exemplo a predisposição genética, a exposição repetida a determinada lesão e também fatores psicossociais como experiência de vida e apoio social (Helms; Barone, 2008; Marchand, 2008). Os fatores emocionais são relevantes, eles alteram a sensibilidade a dor, assim como a dor crônica traz prejuízos emocionais. Sendo assim, indivíduos acometidos com dor crônica podem sofrer alterações negativas no seu estado psicológico, e desenvolver ansiedade, depressão, distúrbios de humor, e outras condições que geram um grande impacto na qualidade de vida. A dor crônica é um importante problema de saúde pública, quem sofre dessa patologia além da condição dolorosa enfrenta também a grande dificuldade e limitações dos tratamentos propostos (Oliveira *et al.*, 2013; Millan, 1999; Who, 2006).

A classificação da dor em aguda e crônica é baseada na duração, mas podemos também classificar a dor considerando seus aspectos fisiopatológicos, desse modo ela pode ser: dor nociceptiva, dor neuropática, e dor nociplástica, podendo ser mista que quer dizer uma combinação complexa dos diferentes tipos de dor. Na dor mista a sobreposição dos mecanismos atua gerando dor em um mesmo local, tornando o tratamento muito difícil. A distinção entre os tipos de dor é de extrema importância, já que diferentes mecanismos necessitam de diferentes alvos de tratamento (IASP, 2020; Scholz *et al.*, 2019; Stensson *et al.*, 2020).

Quando ocorre uma ativação direta dos nociceptores (através de um estímulo físico, químico, mecânico ou elétrico) gerando dor, esta é considerada uma dor nociceptiva. Recentemente um novo termo de dor foi introduzido, denominada dor nociplástica, que se refere a uma dor proveniente de uma nocicepção alterada, mas sem indícios de ativação dos nociceptores por alguma injúria ou doença, trauma ou danos teciduais, um exemplo é a fibromialgia. E por fim, existe a dor neuropática que é iniciada por uma lesão no sistema nervoso somatossensorial, que altera a nocicepção e como consequência uma percepção alterada da dor. (Yam *et al.*, 2018)

2.2 DOR NEUROPÁTICA

Definida pela IASP como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (Scholz *et al.*, 2019), a dor neuropática afeta de 6,9% a 10% da população mundial (Van Hecke *et al.*, 2014). Essa prevalência tende a se elevar à medida que as exposições a fatores de risco, como obesidade,

envelhecimento da população e o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer que passaram por quimioterapia, estão em constante aumento (Moulin *et al.* 2014). O sistema somatossensorial possui nervos que surgem na periferia (na pele, músculos, articulações e fáscia), e são constituídos por neurônios chamados termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, e nociceptores, eles permitem a percepção da temperatura, toque, pressão, posição, vibração e dor. Esses neurônios enviam sinais a medula espinal e se comunicam com outros neurônios de segunda ordem, que levam o estímulo a centros superiores onde serão interpretados (Crawford; Caterina, 2020).

A origem das lesões que acometem o sistema somatossensorial e podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática é ampla. Alguns exemplos incluem as lesões diretas da medula espinal, infecções virais, diabetes mellitus, quimioterapia, tumores, e consumo excessivo de álcool, que podem afetar a integridade tanto do sistema nervoso periférico quanto do central (Campbell; Meyer, 2006; Scholz *et al.*, 2019). A classificação internacional das doenças (CID) em sua 11ª edição, diferencia a dor neuropática crônica com base em sua origem periférica ou central. Dentro da classificação, as de origem periférica incluem neuralgia do trigêmeo, dor neuropática crônica após a lesão do nervo periférico, polineuropatia dolorosa, neuralgia pós-herpética, e radiculopatia dolorosa. E as de origem central abrangem dor neuropática central crônica associada a lesão medular, dor neuropática crônica associada a lesão cerebral, dor crônica central pós-AVC, e dor neuropática central crônica associada a esclerose múltipla (Scholz *et al.*, 2019).

Quadro 1- Classificação da dor neuropática crônica na CID-11

Classificação da Dor Neuropática Crônica	
DN Crônica Periférica	DN Crônica Central
Neuralgia do trigêmeo	DN central crônica associada à lesão medular
DN após lesão de nervo periférico	DN central crônica associada à lesão cerebral
Polineuropatia dolorosa	Dor crônica central pós-AVC
Neuralgia pós-herpética	DN central crônica associada à EM
Radiculopatia dolorosa	

Fonte: elaborado pela autora de acordo com Scholz *et al.* (2019)

Legenda: DN= dor neuropática, AVC= acidente vascular cerebral, EM= esclerose múltipla.

Seja qual for a causa, o dano ao sistema somatossensorial é capaz de implicar

uma sintomatologia característica, por desencadear uma série de eventos. Nem todos esses eventos estão bem esclarecidos, e mesmo aqueles que já foram demonstrados não podem ser generalizados a todas as condições de dor neuropática. É provável que uma associação entre diferentes mecanismos ocorra em cada indivíduo que sofre com os sintomas da dor neuropática, devido a variação etiológica da dor neuropática e também a condições individuais, como questões genéticas (Bridges; Thompson; Rice, 2001). Propõe-se que esses mecanismos resultem em uma neuroplasticidade periférica e central, que mantém descargas ectópicas que geram os sintomas da dor neuropática. Isso significa que, após um dano que cause, por exemplo, compressão, infiltração, ou isquemia no tecido nervoso, os neurônios podem apresentar disparos espontâneos, mesmo que cesse o estímulo inicial (Campbell; Meyer, 2006; Ueda, 2006).

Disparos não evocados geram sinais e sintomas independentes de estímulos, tais como queimação e choque, classificados como espontâneos. Já os sintomas dependentes de estímulo podem ser hiperalgesia, que é o aumento da sensibilidade frente a um estímulo nocivo, e alodínia, que é dor devido a um estímulo normalmente inócua, além de outras sensações como parestesia, coceira e formigamento. Estes sintomas são frequentes nos indivíduos afetados pela dor neuropática, e podem ser incapacitantes (Gierthmühlen; Baron, 2016; Smith, 2018).

As causas das descargas ectópicas vêm sendo investigadas, sabe-se que uma lesão ao nervo gera uma cascata inflamatória e ativação das células imunológicas inatas. O recrutamento de células imunológicas se dá pela liberação de mediadores inflamatórios, dentre eles quimiocinas, pelo tecido lesado. Macrófagos residentes, e monócitos circulantes são ativados por quimiocinas que atuam em seus receptores CCR1, CCR2, CCR5. As células imunológicas ativadas liberam mediadores (como prostaglandinas, bradicinina, interleucinas, TNF- α , histamina) que por sua vez irão se ligar em receptores específicos, nos neurônios sensoriais periféricos contribuindo ainda mais para o processo inflamatório, já que substâncias como a bradicinina (BC) e a substância P promovem o aumento da permeabilidade e conseqüentemente aumento da resposta inflamatória, além disso os mediadores podem contribuir com alterações na sensibilidade dos neurônios aferentes (Sholz; Woolf, 2007; Yam *et al.*, 2018). Um exemplo é o das prostaglandinas que promovem a diminuição do limiar nociceptivo dos neurônios, tornando-os responsivos até mesmo a estímulos

anteriormente inócuos (Vanegas;Schuble, 2001; Yam *et al.*, 2018).

Esse processo de sensibilização periférica está relacionado a sinalização feita por mediadores, que ao ativar seus receptores nos neurônios sensitivos irão desencadear vias intracelulares que podem modificar canais iônicos, tornando estes mais sensíveis, assim como ativar a transcrição de receptores, e acoplamento deles a membrana, modificando a permeabilidade da membrana, e conseqüentemente o limiar de excitabilidade (Kraychete; Calosans; Valente, 2006).

A sensibilização também ocorre a nível central, para isso o gatilho inicial são mudanças que ocorrem em receptores NMDA (Latremoliere; Woolf, 2009), que é um dos receptores ionotrópicos do glutamato, em situações de repouso da membrana plasmática o NMDA possui um íon magnésio bloqueando seu poro. O íon Mg^{2+} é mantido ligado ao receptor NMDA devido à interação com resíduos de aminoácidos com carga negativa, como os ácidos aspártico e glutâmico, que atraem o íon Mg^{2+} devido à sua carga positiva. A interação eletrostática entre os resíduos do sítio de bloqueio do receptor NMDA e o íon Mg^{2+} mantém o bloqueio do poro do receptor NMDA (Mayer; Westbrook; Guthrie, 1984).

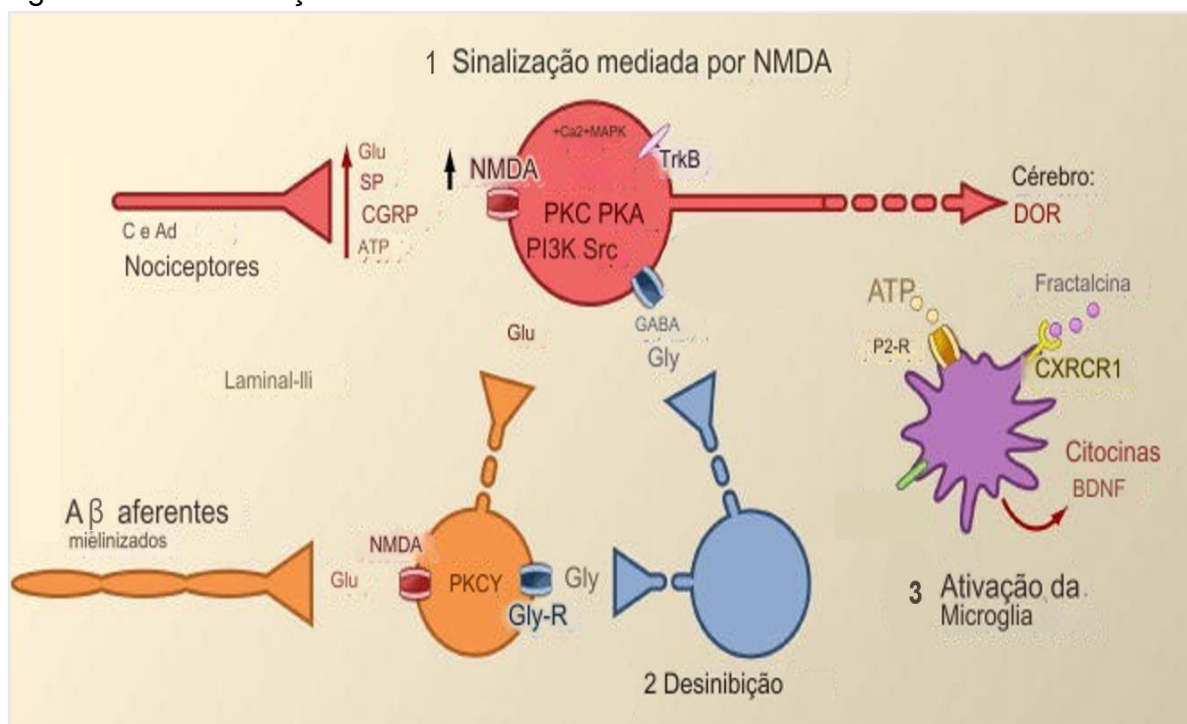
A medida que o nociceptor é estimulado ele libera neurotransmissores como a substância P, e CGRP, que atuam sobre receptores metabotrópicos que ativados desencadeia vias que facilitam a despolarização do neurônio pós-sináptico. Os nociceptores também liberam o glutamato que possui vários receptores, dentre eles receptores ionotrópicos AMPA e cainato, a ativação desses canais promove o rápido influxo de cátions na célula pós-sináptica, promovendo despolarização mais rápida do neurônio (Russell, 2014). Quando a despolarização da membrana atinge certo limiar o íon Mg^{2+} que bloqueia o poro do receptor NMDA se solta, pois, a despolarização muda o ambiente elétrico na vizinhança do receptor NMDA, o que reduz a atração do íon Mg^{2+} permitindo que ele se desloque, deixando um caminho livre para a entrada de Ca^{2+} no neurônio (Latremoliere; Woolf, 2009; Mayer; Westbrook; Guthrie, 1984).

O aumento de Ca^{2+} intracelular promove a ativação de muitas vias que irão manter a sensibilização. Ao longo do tempo pode haver excitotoxicidade induzida pelo NMDA, o que leva a apoptose de interneurônios inibitórios, e conseqüentemente a redução da inibição (estado chamado desinibição), que deixa os neurônios do corno dorsal facilitados e susceptíveis a serem ativados por estímulos vindos até mesmo de fibras A não nociceptivas (Scholz *et al.*, 2005). Fibras A β , não nociceptivas podem

também fazer conexão com neurônios envolvidos na nocicepção, pois a lesão no tecido nervoso, pode danificar a bainha de mielina o que gera uma deficiência no isolamento e contribui para a formação de comunicações atípicas, o que é denominado comunicação efática (Cohen; Mao, 2014).

A sensibilização central então basicamente converte neurônios específicos que normalmente não conduzem estímulos nociceptivos, em condutores de estímulos que causam dor, produzindo hipersensibilidade mesmo na ausência de lesão periférica (Latremoliere; Woolf, 2009). Um resumo dos mecanismos envolvidos na sensibilização central, pode ser visto na Figura 2.

Figura 2- Sensibilização central.



Fonte: Adaptado de Basbaum, et al. (2009).

Legenda: 1 Sensibilização mediada por NMDA: nociceptores liberam glutamato, Sub P, CGRP, ATP desencadeando correntes excitatórias nos neurônios pós-sinápticos. A despolarização dos neurônios pós-sinápticos ativa receptores NMDA. O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa vias de sinalização, como MAPK, PKA, PKC, PI3K e Src, que aumentam a excitabilidade dos neurônios de segunda ordem.

2 Desinibição: a desinibição pode permitir que fibras A β mielinizadas que normalmente não são nociceptivas interajam com o circuito de transmissão nociceptivo, de modo que estímulos antes inócuos sejam agora percebidos como dolorosos, um dos mecanismos para que isso ocorra é a desinibição de interneurônios excitatórios que expressam PKC γ .

3 Ativação da microglia: A ativação de receptores específicos na microglia resulta na liberação de BDNF. O BDNF interage com receptores expressos nos neurônios aumentando sua excitabilidade e, conseqüentemente, a microglia ativada também libera uma variedade de citocinas, como TNF α , IL-1 β e IL-6, que também contribuem para a sensibilização central.

2.3 CÉLULAS DA GLIA E DOR NEUROPÁTICA

As células da glia também chamadas de "células gliais" ou simplesmente "glia", tem um papel fundamental na sensibilização central. Elas compõem a maior parte das células do sistema nervoso, cerca de 70%, e estão fortemente envolvidas na manutenção do ambiente neural, exercendo um papel essencial no suporte, manutenção e proteção dos neurônios (Mika *et al.*, 2013). E diferente destes elas não conduzem impulsos nervosos, mas estão envolvidas na síntese, liberação e captação de neurotransmissores. Além disso, vem sendo explorado o papel das células gliais na sensibilização, a fim de obter uma compreensão da modulação neuroimune da dor (Milligan; Watkins, 2009).

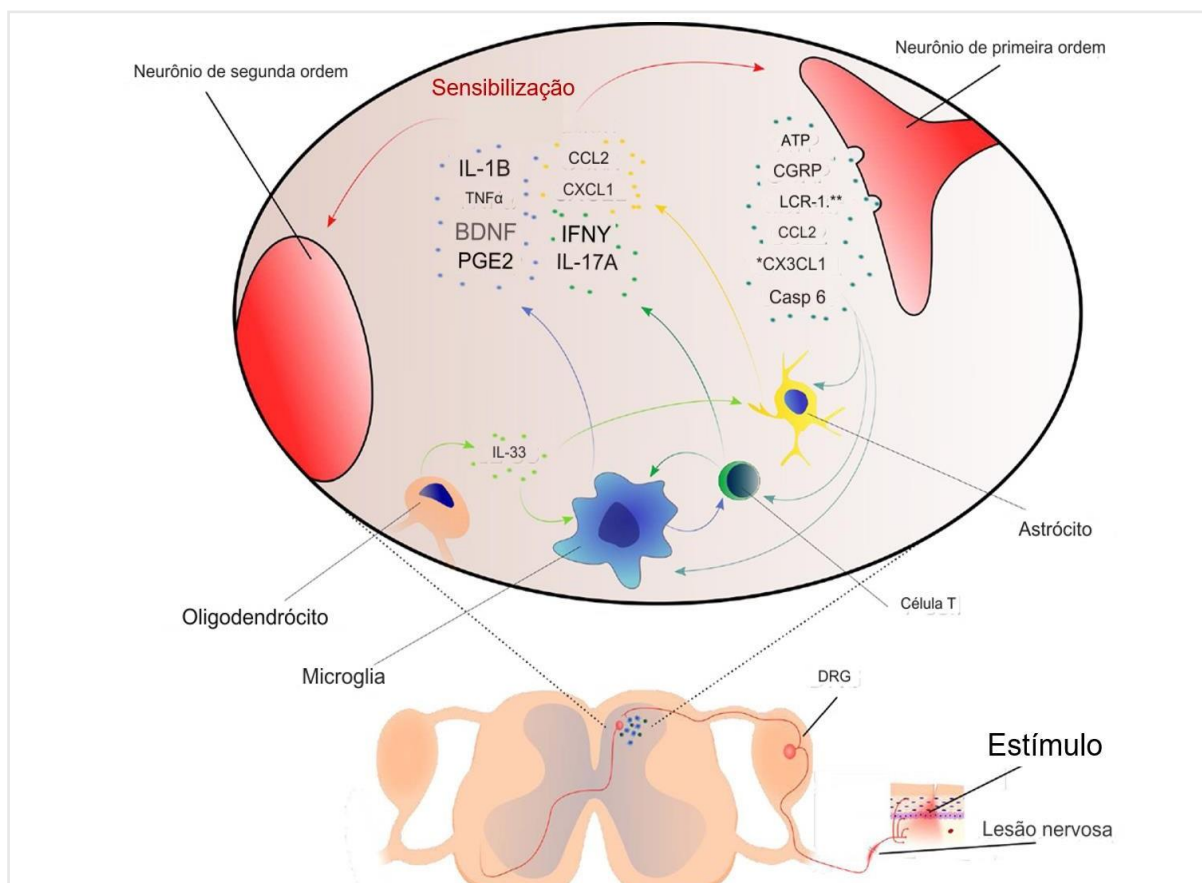
As células da glia expressam receptores para uma variedade de substâncias liberadas por elas mesmas e por neurônios. Sendo assim, quando há um estímulo proveniente de por exemplo lesões teciduais, inflamação ou neuropatia periférica, elas são ativadas e potencializam a resposta. Dentre as células da glia, os astrócitos e micróglia vem ganhando notoriedade em relação a modulação da dor (Watkins; Milligan; Maier, 2001).

A micróglia tem características funcionais semelhantes com as dos macrófagos periféricos, então, após a lesão as células microgliais são ativadas e formam aglomerados no corno dorsal da medula espinal, próximas dos terminais das fibras nervosas sensoriais lesionadas. Essa ativação é causada por vários mediadores que atuam nos receptores microgliais, por exemplo ATP, e quimiocinas, assim como a ativação de receptor *toll-like* que também está envolvido na ativação microglial. A ativação dos receptores desencadeia a fosforilação da p38 MAPK, isoformas 1 e 2 da ERK e quinases da família Src, de modo que a micróglia sai do seu estado de repouso, ou vigilância, onde expressa poucos receptores, para um estado ativo, sofrendo alterações morfológicas, como hipertrofia, proliferação e aumento de receptores. Quando ativada a micróglia, passa a apresentar um caráter inflamatório e inicia a liberação de mediadores pró-inflamatórios, que levam à ativação dos astrócitos, que por sua vez também passam a liberar substâncias pró-inflamatórias (Scholz, 2007).

Após a ativação da micróglia, várias substâncias encontram-se reguladas positivamente, entre elas citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e TGF- β . Tais substâncias atuam na manutenção da ativação das células da glia e também na estimulação dos nociceptores (Figura 3), aumentando assim a liberação de neurotransmissores como

o glutamato, oxido nítrico e prostaglandinas. Esse processo modula positivamente a atividade do neurônio de segunda ordem, o tornando hiperexcitável, sensibilizando a via nociceptiva e contribuindo na percepção da dor, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento da dor neuropática (Scholz, 2007).

Figura 3- Interação entre células da glia e neurônios na sensibilização.



Fonte: Adaptado de Pinho-Ribeiro et al. (2017).

Legenda: Diversas substâncias liberadas pelo neurônio aferente de primeira ordem podem sensibilizar diretamente o neurônio de segunda ordem ou ativar as células da glia, que por sua vez podem potencializar este processo liberando substâncias que também irão ativá-las ou sensibilizar os neurônios de 1ª e 2ª ordem.

2.4 MODULAÇÃO SUPRAESPINAL DA DOR

A hiperexcitabilidade dos neurônios de segunda ordem, pode gerar uma descarga intensa no tálamo, pois os impulsos serão conduzidos por meio dos axônios destes neurônios de segunda ordem por vias saindo da medula espinal em direção a centros supraespinhais, e a principal via é a espinotalâmica. Localizado no diencefalo, o tálamo possui núcleos responsáveis por modular diferentes funções, entre elas o

processamento dos estímulos sensoriais. As sinapses localizadas no tálamo permitem uma comunicação entre os neurônios de segunda e terceira ordem. Quando estimulado, o neurônio de terceira ordem encaminha o impulso nociceptivo para o córtex somatossensorial, onde será integrado e percebido como dor (Ab Aziz; Ahmad, 2006).

O tálamo tem uma atuação intimamente relacionada com o córtex, pois atua modulando e retransmitindo sinais vindos de diversas vias, como a via espinotalâmica. A via espinotalâmica é dividida em dois tratos, o trato neoespinotalâmico e o trato paleoespinotalâmico. O trato neoespinotalâmico possui neurônios que tem origem principalmente da lâmina I do corno dorsal da medula, cruzam para o lado contralateral da medula espinal e ascendem pelo funículo anterolateral da medula espinal até o tálamo, onde se comunicam com neurônios de terceira ordem dos núcleos ventral posterolateral (VPL) e ventral posteromedial (VPM), que compõem o complexo ventrobasal. Os neurônios de terceira ordem do complexo ventrobasal levam o estímulo ao córtex, principalmente ao córtex somatossensorial primário onde será integrado características específicas da dor, como a intensidade, localização e qualidade da dor, esta via compõe o chamado sistema lateral da dor. Já o trato paleoespinotalâmico possui neurônios que derivam da lâmina II e ascendem pelo funículo anterolateral e pelo posterolateral, chegando até os complexos posteromedial e intralaminar do tálamo. Então, os impulsos nociceptivos são retransmitidos para o córtex somatossensorial e estruturas límbicas, esta é a via medial da dor que agrega principalmente as qualidades afetivas e aversivas da dor (Ab Aziz; Ahmad, 2006; Lent, 2004).

As regiões para onde são enviados os estímulos nociceptivos são variadas, podendo ser, por exemplo, para o córtex cingulado anterior, córtex insular, córtex pré-frontal e outras regiões, como mesencéfalo, hipotálamo, núcleo lentiforme (Ab Aziz; Ahmad, 2006). Os neurônios de segunda ordem do corno dorsal da medula espinal (CDME), além do tálamo, também podem se projetar para outras regiões, formando outros tratos. Entre os quais temos: o trato espinoreticular, trato espinomesencefálico, e trato espinoparabraquial. O direcionamento dos estímulos, vindos da medula espinal, para diversas áreas é de suma importância para a ativação da modulação nociceptiva, assim como para agregar aspectos emocionais a dor e desencadear as respostas relativas a dor (Almeida; Roizenblatt; Tufik, 2004).

As respostas frente a dor podem ser autonômicas ou comportamentais, e são muito particulares a cada indivíduo, pois são dependentes de uma interação de fatores, dentre eles, a modulação que ocorre nos diversos níveis da via nociceptiva, inclusive nos centros superiores como tálamo e córtex. No tálamo a dor neuropática induz alterações na bioquímica (como redução da liberação de serotonina (5-HT) no complexo ventrobasal contralateral, o que diminui a inibição da nocicepção), na expressão gênica, no fluxo sanguíneo, nos campos receptivos, e nas respostas a estímulos nocivos dos neurônios talâmicos (Goettl *et al.*, 2002). Uma redução do limiar de ativação de neurônios do tálamo foi observada em estudos que induziram dor neuropática em ratos, e apresentaram sintomas dolorosos comuns a dor neuropática (Guilbaud *et al.*, 1990; Leblanc *et al.*, 2019).

Além disso, ocorre ativação microglial no tálamo após lesão nervosa, gerando uma plasticidade sináptica que favorece a transmissão do impulso ao córtex. A participação da micróglia no tálamo, foi vista em alguns estudos onde utilizaram o modelo de hemorragia talâmica para induzir dor neuropática que foi revertida após inibição de células microgliais (Huang *et al.* 2020; Infantino *et al.*, 2022). Outros estudos também demonstram ativação glial no tálamo frente a lesão no sistema nervoso periférico (Cobianchi, 2014; Giardini, 2017). A ativação da micróglia também foi observada no córtex sensorial e na amígdala, decorrente de lesão no sistema nervoso periférico (Taylor *et al.* 2017), o que também pode resultar em hiperexcitabilidade do circuito nociceptivo.

Outra alteração supraespinhal importante que pode ocorrer é o desequilíbrio entre a inibição e a facilitação descendente. Vários mecanismos estão relacionados com as mudanças que levam a intensificação da atividade facilitatória descendente e diminuição da atividade inibitória descendente (Rosenberger, *et al.*, 2019). A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma estrutura envolvida na via descendente inibitória. Em um estudo conduzido por Ni *et al.* (2016) demonstrou que a via de sinalização p38 MAPK parece mediar a ativação microglial na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral do mesencéfalo. Em animais com dor neuropática induzida por lesão através da constrição crônica do nervo ciático, a administração intra-SCP do inibidor de p-p38 MAPK sete dias após CCI (lesão de constrição crônica do nervo ciático) suprimiu a ativação microglial e atenuou de forma significativa os sintomas da dor neuropática. Então, na presença de dor neuropática a ativação glial

na SCP pode estar relacionada com a facilitação descendente (Ni *et al.*,2016).

Em resumo, a modulação da nocicepção durante a dor neuropática envolve interações complexas entre diferentes regiões da via nociceptiva, células gliais e vias de transmissão. Compreender melhor esses sistemas é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a dor neuropática, já que os tratamentos propostos na atualidade se mostram insatisfatórios (Cavalli *et al.*,2019).

2.5 TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA

Apesar do leque de possibilidades terapêuticas para a dor neuropática (DN), o seu tratamento ainda pode ser um desafio (Rosenberger, *et al.*,2020). Com a terapêutica atual apenas 30% das pessoas afetadas e tratadas respondem com uma redução superior a 50% da intensidade da dor neuropática. A resistência da DN aos tratamentos, pode estar relacionada aos diferentes mecanismos nociceptivos individuais em cada paciente, além da interação de outras variáveis psicológicas e genéticas, além de características intrínsecas a cada tipo de lesão nervosa. Porém a eficácia dos tratamentos disponíveis parece não ser impactada pela etiologia da dor neuropática. Por isso, o grupo de interesse especial em dor neuropática (NeuPSIG) através de uma grande meta-análise (Finnerup *et al.*,2015), criou para o tratamento da dor neuropática algumas diretrizes que não têm foco nas causas subjacentes, mas abordam a dor neuropática como uma condição distinta. As diretrizes recomendam um tratamento gradativo, partindo de medicamentos de primeira escolha que possuem melhor eficácia e maior tolerabilidade. Propondo como fármacos de primeira linha os antiepiléticos, os antidepressivos tricíclicos, e os inibidores da recaptção de serotonina. Os de segunda linha são o tramadol, a lidocaína e a capsaicina, e os considerados de terceira linha são os opióides fortes (Finnerup *et al.*, 2015).

Quadro 2- Tratamento farmacológico para a dor neuropática
(continua)

MEDICAMENTOS DE PRIMEIRA LINHA
INIBIDORES DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA E NOREPINEFRINA
Duloxetina
Venlafaxina

Quadro 2- Tratamento farmacológico para a dor neuropática
(conclusão)

MEDICAMENTOS DE PRIMEIRA LINHA
ANTIDEPRESSIVOS TRICICLICOS
Amitriptilina
Nortriptilina
Desipramina
ANTICONVULSIVANTES
Pregabalina
Gabapentina
MEDICAMENTOS DE SEGUNDA LINHA
Tramadol
TERAPIA TÓPICA
Adesivos de capsaicina 8%
Adesivos de lidocaína *
MEDICAMENTOS DE TERCEIRA LINHA
OPIOIDES FORTES
Morfina
Oxicodona
TOXINA BOTULÍNICA TIPO A (BTX-A)

Fonte: elaborado pela autora de acordo com Attal, et al. (2010).

Apesar do consenso para o tratamento farmacológico da dor neuropática, o uso desses medicamentos tem grande limitação, não geram uma melhora adequada, além de poder haver resistência fisiopatológica ao fármaco, ou ainda causar dependência e vários outros efeitos indesejáveis (Cohen; Mao, 2014). Por exemplo, a pregabalina mesmo estando dentro da classe farmacológica de primeira escolha apresenta com seu uso uma série de efeitos adversos, como sonolência, tontura e perda cognitiva (Dworkin *et al.*, 2007). Estes efeitos indesejáveis são responsáveis por 15% dos pacientes tratados com pregabalina desistirem do tratamento (Moore *et al.*, 2009). Com o uso de antidepressivos também pode ocorrer efeitos de sedação, boca seca, retenção urinária e ganho de peso (Attal *et al.*, 2010; Finnerup *et al.*, 2015). Os inibidores da recaptação de serotonina têm sido mais bem tolerados, porém pouco

eficientes (Kremer *et al.*, 2016). A morfina também é capaz de desencadear uma série de eventos indesejáveis como náuseas, vômitos, sedação, além de muitos pacientes tornarem resistentes (Finnerup *et al.*, 2015). Além disso, a prescrição de opioides deve ser feita com extrema responsabilidade, já que o abuso dessas substâncias é um problema de saúde pública importante em diversos países. Nos EUA, por exemplo, 4% da população faz uso indevido de opioides prescritos, e estudos indicam que é comum que consumidores de heroína tenham inicialmente feito mau uso de opioides prescritos (Skolnick, 2017).

O tratamento ineficaz e os efeitos colaterais dos medicamentos, se somam com os sintomas da dor neuropática e afetam a qualidade de vida, podendo comprometer o estado psicológico dos indivíduos acometidos. Por isso, além das estratégias individualizadas para um tratamento bem sucedido, é também necessário aprofundar as investigações nos mecanismos complexos da dor neuropática, para trazer novos alvos farmacológicos. As terapias atuais são voltadas a subunidade do canal de cálcio $\alpha_2\delta-1$ onde atuam os gabapentinóides, aos sistemas serotoninérgico, adrenérgico e colinérgico e aos canais de sódio dependentes de voltagem, que são alvos dos antidepressivos, e receptores opioides, onde atuam seus agonistas. Os contínuos avanços nas pesquisas mostram possíveis potenciais alvos para o tratamento da dor neuropática, alguns exemplos são os receptores canabinoides CB1/2, receptores de interleucina 6 e receptores da interleucina 1β (Borges, *et al.*, 2021). Além destes, os receptores de acetilcolina também estão sendo investigados como importantes alvos para tratar a dor (Chen *et al.*, 2010b; Hayashida *et al.*, 2006; Papke *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006).

2.6 SISTEMA COLINÉRGICO E DOR

A acetilcolina é um éster de ácido acético e colina, que atua como um importante neurotransmissor, tanto no sistema nervoso periférico como no central (Kummer; Lips; Pfeil, 2008). Ela é sintetizada, no citoplasma do terminal nervoso a partir da combinação de dois precursores: acetil coenzima A e colina, através de uma reação catalisada pela colina acetiltransferase (ChAT). A enzima ChAT transfere o grupo acetil de uma molécula de acetil-coenzima A, para uma molécula de colina, assim sintetizada, a acetilcolina é transportada, pelo transportador vesicular de

acetilcolina (VACHT), que é uma proteína transmembrana das vesículas que atua realizando o antiporte de prótons e acetilcolina. Esse processo depende de bombas de prótons da membrana vesicular que através da quebra de ATP, bombeia prótons para o lúmen da vesícula sináptica, assim o interior das vesículas se tornam mais ácidos e mais carregados positivamente, gerando um gradiente eletroquímico. Esse gradiente impulsiona o VACHT a transportar dois íons H^+ para o exterior da vesícula enquanto realiza o antiporte de uma molécula de ACh para o interior da vesícula. Ou seja, a energia da concentração de prótons é usada para transportar a acetilcolina contra seu próprio gradiente de concentração, para o interior de vesículas pré-sinápticas (Naguib, 2002; Pohanka, 2012; Usdin, *et al.*, 1995).

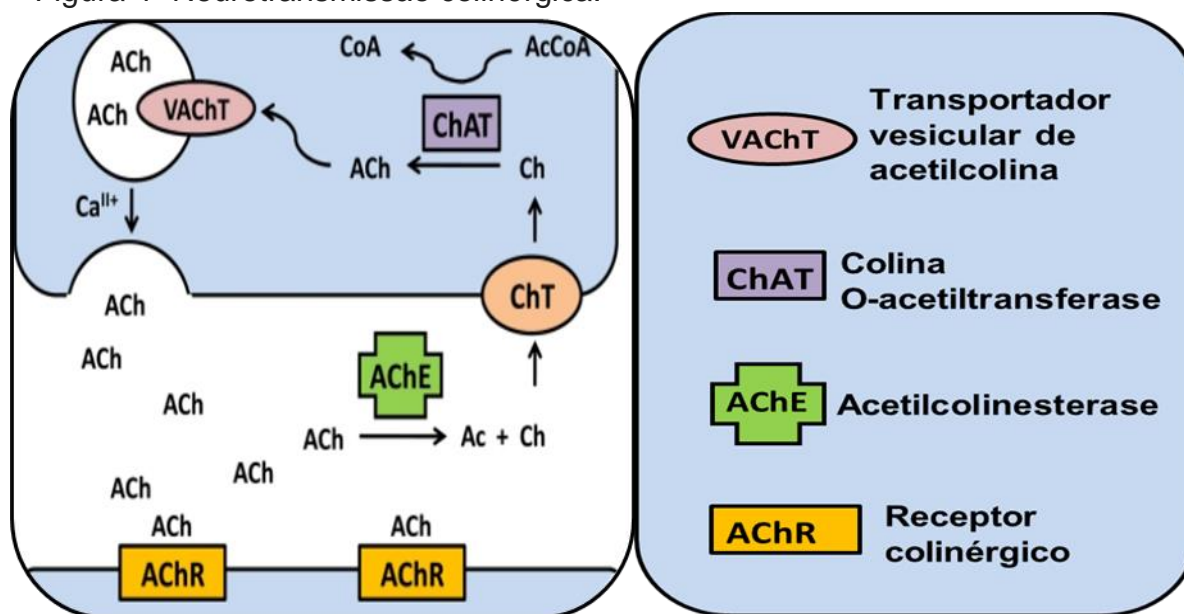
Cada vesícula pode armazenar de 5.000 a 10.000 moléculas de acetilcolina, que ficam contidas nas vesículas até que um estímulo provoque um potencial de ação, que irá despolarizar a membrana. A despolarização gera uma mudança conformacional em canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, essa mudança na estrutura permite o influxo de Ca^{2+} através desses canais. O Ca^{2+} então ativa uma cascata que permite a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica e a subsequente exocitose de ACh (Naguib, 2002).

Através de muitos estudos foi observada diversas interações entre proteína-proteína e proteína-lipídio, que permitem o acoplamento das vesículas à membrana plasmática. As três principais proteínas que sofrem interações e permitem a fusão e exocitose das vesículas são: sinaptobrevina, proteína 25 associada ao sinaptossomo (SNAP-25) e syntaxina-1. Na presença de Ca^{2+} a sinaptobrevina que é uma proteína integral da membrana das vesículas sinápticas, forma um complexo com a SNAP-25, que está fracamente ligada ao lado interno da membrana plasmática do neurônio na sinapse. Outra molécula na membrana interna, a syntaxina, sofre interação com o complexo, resultando na formação do complexo receptor de proteína de ligação ao fator de fusão sensível à N-etilmaleimida (SNARE), que é essencial para ancoragem das vesículas de acetilcolina com a membrana. O processo de fusão também depende de outras proteínas, por exemplo, a sinaptotagmina, que é uma importante proteína que opera como sensor de cálcio, através da interação do cálcio com as subunidades C2A e C2B da sinaptotagmina (Dun; Rickman; Duncan, 2010; Rizo; Sudhof, 2002). O desenvolvimento desta cascata é muito preciso e rápido, em menos de 0,5 ms após a entrada de Ca^{2+} a acetilcolina é liberada na fenda sináptica (Rizo; Sudhof, 2002).

A acetilcolina possui um átomo de amônio quaternário na estrutura da colina. Átomos de amônio quaternário são átomos de nitrogênio ligados a quatro átomos de hidrogênio, resultando em uma carga positiva que impede que a molécula de acetilcolina seja facilmente quebrada por reações químicas. Isso torna a acetilcolina um composto quimicamente estável, necessitando de enzimas para catalisar sua degradação e encerrar a sinalização feita por ela ao se ligar em seus receptores (Pohanka, 2012).

As enzimas que realizam a degradação da ACh na fenda sináptica são as colinesterases, que incluem a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) (Giacobini, 2004; Soreq; Seidman, 2001). Entre as duas a AChE é a principal enzima encontrada no cérebro saudável, enquanto a BChE é vista como tendo uma função secundária na regulação dos níveis de ACh no cérebro (Greig, *et al.*, 2005). A acetilcolinesterase (AChE) é uma serina hidrolase que desempenha um papel crucial na terminação da transmissão do impulso nas sinapses colinérgicas ao catalisar a hidrólise da ACh. O sítio catalítico da AChE é composto por três resíduos aminoácidos: serina, histidina e um resíduo ácido. O mecanismo da catálise envolve várias etapas: inicialmente, a AChE se liga à acetilcolina e é acetilada, resultando na formação de um complexo temporário. A serina do sítio ativo possui um grupo hidroxila (-OH), que ataca o carbono carbonílico da acetilcolina, o átomo de carbono ligado a um grupo acetila (CH₃CO-). Esse ataque nucleofílico resulta na formação de um complexo temporário conhecido como intermediário acetil-enzima. Esse intermediário é instável e rapidamente hidrolisado, resultando na quebra da ligação éster entre a serina e o grupo acetila. Por fim, o grupo acetato é liberado, regenerando a AChE para participar de nova catálise e o substrato é convertido nos produtos, colina e ácido acético. Esse processo de hidrólise da acetilcolina pela AChE é essencial para a regulação dos níveis de acetilcolina na sinapse e para a terminação do sinal (Colletier, *et al.*, 2006; Soreq; Seidman, 2001). Antes de ser degradada, a ACh pode se ligar em receptores colinérgicos específicos, que medeiam suas diversas ações no organismo, inclusive a modulação da nocicepção. Um esquema da neurotransmissão colinérgica pode ser visto na Figura 4.

Figura 4- Neurotransmissão colinérgica.



Fonte: Adaptado de Pohanka (2012).

Legenda: A acetilcolina é sintetizada a partir de acetil coenzima A e colina pela enzima colina O-acetiltransferase (ChAT). Após sua formação, a acetilcolina é armazenada em vesículas e liberada na fenda sináptica quando há aumento do cálcio intracelular. A fusão das vesículas com a membrana celular libera a acetilcolina, que então interage com os receptores de acetilcolina (AChR). A enzima acetilcolinesterase (AChE) divide a acetilcolina em ácido acético e colina. A colina é recapturada usando o transportador de colina de alta afinidade (ChT), enquanto o ácido acético é decomposto.

A nível medular a ACh modula a nocicepção, principalmente na região da lâmina II (Mesnage *et al.*, 2011). Foi visto que o aumento da concentração de ACh na medula espinal é capaz de gerar antinocicepção (Matsumoto *et al.*, 2007). Yang e colaboradores (2012) observaram um aumento a nível medular nos níveis de ACh, e dos peptídeos opioides endógenos: L-encefalina, β -endorfina e dinorfina após uma indução a dor com iontoforese de potássio. No mesmo estudo o aumento dos níveis de peptídeos opioides endógenos também foi visto após administração intratecal de acetilcolina, e os níveis foram revertidos através do inibidor muscarínico atropina, e também do inibidor nicotínico galamina hexaídrica. Porém o estudo mencionado não investigou como a ACh afeta os níveis dos opioides endógenos (Yang *et al.*, 2012).

A modulação colinérgica da nocicepção, também ocorre em regiões superiores como na amígdala, no córtex somatossensorial, córtex insular, córtex cingulado anterior e córtex medial pré-frontal (Naser *et al.*, 2018). Nessas regiões assim como na medula espinal são expressos diversos receptores colinérgicos, inclusive os relacionados a nocicepção.

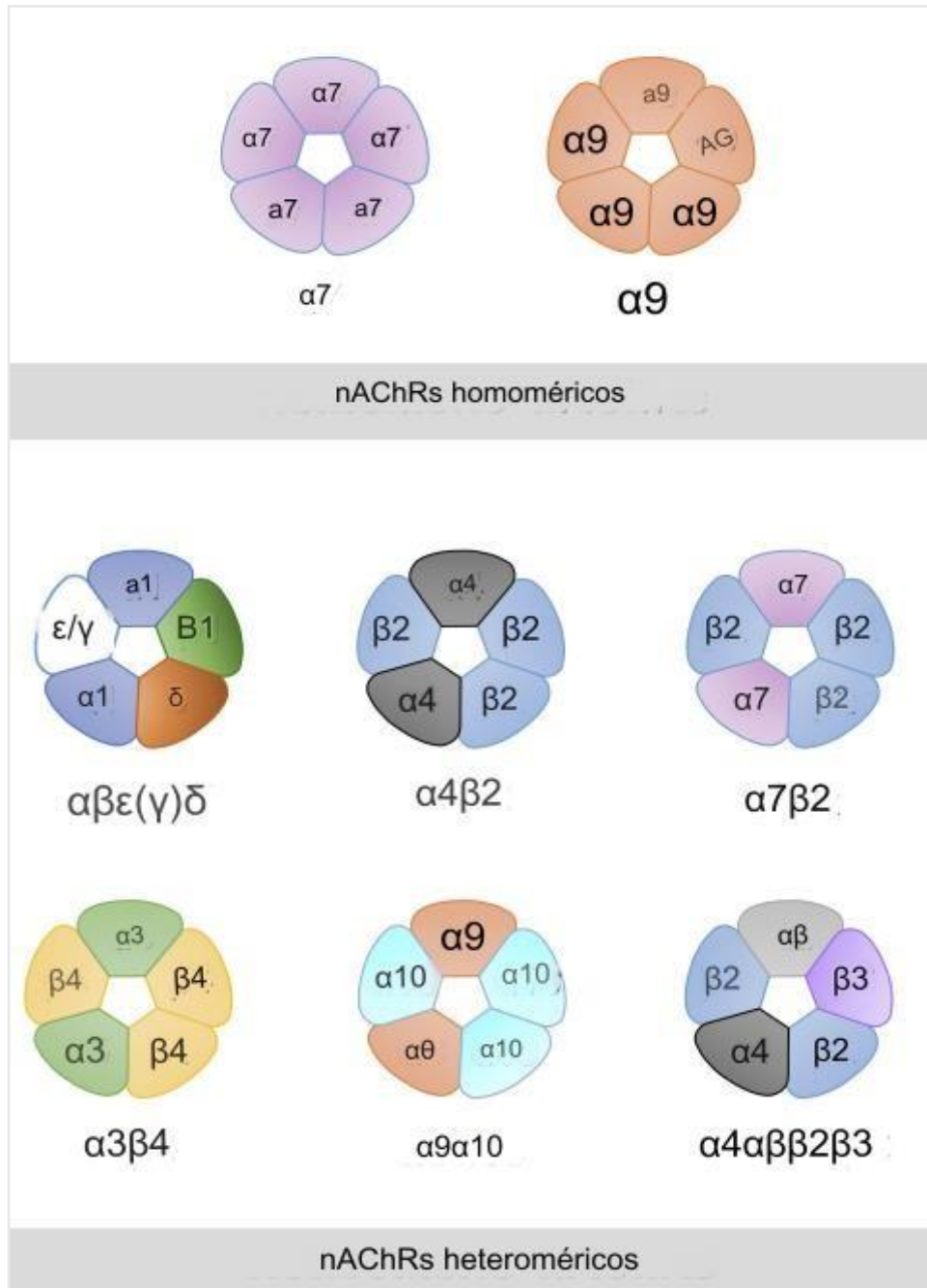
Os receptores colinérgicos são divididos em duas classes: muscarínicos

(mAChRs) e nicotínicos (nAChRs). São assim chamados devido suas interações com metabólitos que atuam nos receptores como agonistas seletivos, sendo eles a muscarina e a nicotina. A muscarina é um composto da espécie fúngica a *Amanita muscaria*. E a nicotina, um metabólito da planta *Nicotiana tabacum*, *Solanaceae* (Pohanka, 2012). As propriedades antinociceptivas da nicotina vem sendo investigadas desde o século XVI, quando Jean Nicot percebeu atributos analgésicos do tabaco (Taly *et al.*, 2009).

2.7 RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 7$

Os receptores nicotínicos (nAChRs) são expressos na junção neuromuscular, nos gânglios autônomos e no SNC. Eles são proteínas integrais de membrana, composto por cinco subunidades diferentes (heteropentaméricos) ou iguais (homopentaméricos). As subunidades estão dispostas simetricamente, como demonstrado na Figura 5, formando um canal iônico central seletivo a íons catiônicos. Dezessete genes codificam as subunidades, sendo elas $\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, δ , ϵ , Υ . Destas, são expressas no cérebro 9 subunidades α e 3 subunidades β . As combinações diferentes dessas subunidades conferem aos receptores propriedades distintas, quanto a sua cinética e a sensibilidade ao ligante. O acoplamento do ligante aos sítios de ligação do receptor gera uma mudança conformacional reversível. Mas a ACh ou drogas nicotínicas, por exemplo, ao serem mantidas cronicamente podem dessensibilizar o receptor, causando uma diminuição gradual na taxa de resposta iônica, levando a um estado fechado. O sítio de ligação dos receptores nicotínicos se localiza entre uma subunidade α e outra não α , exceto em nAChRs homoméricos, como é o caso dos receptores nicotínicos $\alpha 7$ (nAChRs $\alpha 7$) que possuem 5 locais de ligação, dispostos entre todas as suas 5 subunidades $\alpha 7$ (Taly *et al.*, 2009). A subunidade $\alpha 7$ está entre as poucas que formam homopentâmeros (Hone; McIntosh, 2017).

Figura 5 – Esquema ilustrativo de nAChRs homoméricos e heteroméricos.



Fonte: Traduzido de Corradi; Bouzat (2016).

Legenda: $\alpha 7$ e $\alpha 9$ são as únicas subunidades capazes de formar receptores homoméricos funcionais, os quais contêm cinco sítios de ligação. São mostradas algumas combinações heteroméricas possíveis de subunidades α e não α . É necessária uma subunidade do tipo α para sítio de ligação.

Os nAChRs $\alpha 7$ são expressos em células não neuronais e neuronais, como os neurônios ganglionares, inclusive os localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD), os quais estão envolvidos na nocicepção. Nos neurônios aferentes do GRD os nAChR $\alpha 7$, estão envolvidos na modulação da liberação de glutamato (Genzen; Mcgehee, 2003),

e na modulação da produção de óxido nítrico (NO), o que pode favorecer a neuroproteção em caso de lesão a neurônios do GRD (Papadopolou *et al.*, 2004).

Alguns exemplos de células não neuronais que expressam nAChRs $\alpha 7$ são macrófagos, monócitos, células T, células B, e micróglia (Hone; McIntosh, 2017). Os nAChRs $\alpha 7$ tem alta permeabilidade ao cálcio, mas sua probabilidade de estado aberto é muito baixa comparado com outros receptores nicotínicos. A ativação desses receptores não induz corrente iônica em células não neuronais que os expressam. Nessas células pode ser que os nAChRs $\alpha 7$ exerçam uma atividade parecida com a de receptores metabotrópicos (Bagdas *et al.*, 2018). Receptores nicotínicos foram identificados em complexos moleculares juntamente com proteínas G, arrestinas, e proteínas quinases, reforçando a possibilidade de uma sinalização de natureza metabotrópica, relacionada com os nAChRs $\alpha 7$ (Buckingham *et al.*, 2009).

Os nAChRs $\alpha 7$ participam da via nociceptiva espinal e supraespinal, e estão ativos em vários modelos de dor neuropática. Um exemplo disso foi observado com a administração intraperitoneal de NS6740 um agonista silencioso do nAChR $\alpha 7$. Agonistas silenciosos são moléculas que sozinhas não são capazes de causar abertura do canal, mas induzem seletivamente o estado dessensibilizado dos nAChRs. O NS6740 desencadeou efeitos analgésicos na dor neuropática induzida por CCI, por meio desses receptores em um estado não condutor. Essa é outra evidência que também apoia a ideia de que haja uma atuação não convencional dos nAChRs $\alpha 7$ (Papke *et al.*, 2015).

Vários outros estudos em animais também mostram a participação dos nAChRs $\alpha 7$ na dor neuropática, a administração de um agonista seletivo para nAChRs $\alpha 7$ diminuiu a alodínia em um modelo de dor neuropática crônica em rato (Pacini *et al.*, 2010). Já está claro que a colina é um agonista endógeno eficaz do nAChRs $\alpha 7$, e sua administração demonstrou ser antinociceptiva em modelos de dor pós-operatória e dor aguda (Damaj; Meyer ; Martin, 2000; Rowley *et al.*, 2010). Efeito similar foi visto com o aumento da colina, impulsionado por citidina-5'-difosfato-colina; citicolina (CDP-colina) administrada por via intracerebroventricular (icv), que demonstrou ser eficaz na modulação da dor neuropática proveniente de lesão nervosa e quimioterapia, a administração central do antagonista seletivo do nAChR $\alpha 7$, α -bungarotoxina evitou o efeito anti-hiperalgésico da CDP-colina (Bagdas *et al.*, 2011; Kanat *et al.*, 2013).

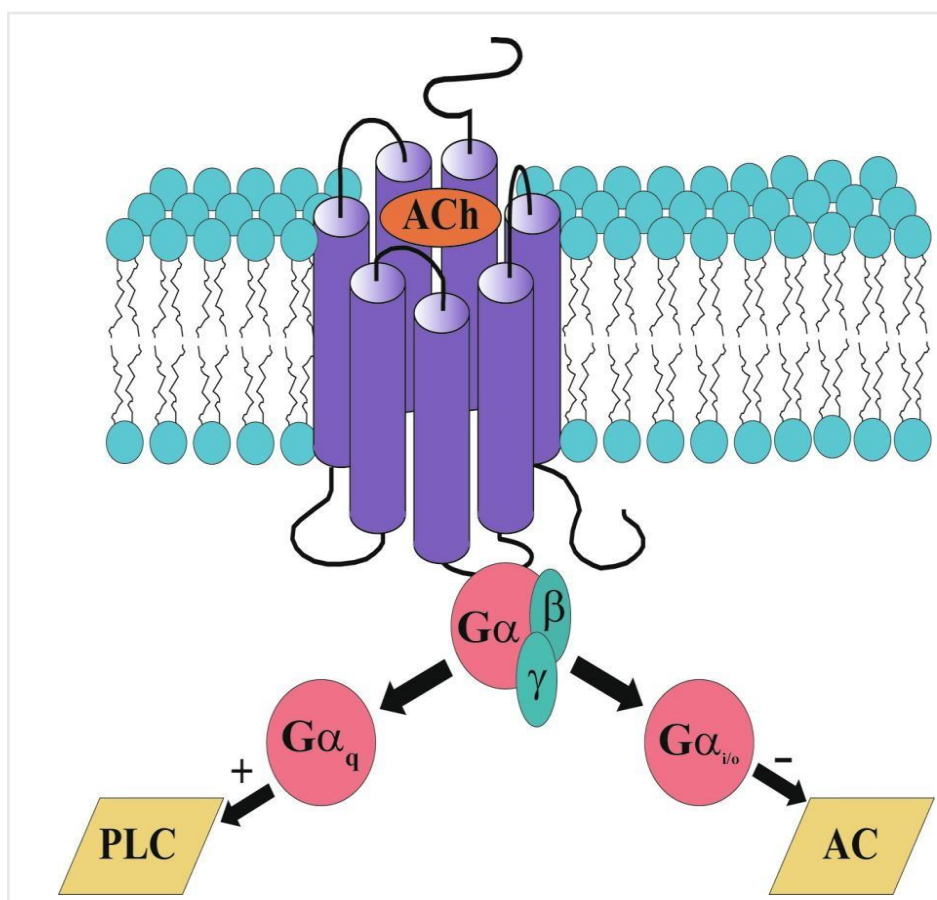
Outra vantagem dos agonistas nAChR $\alpha 7$ é a melhora dos comportamentos

aversivos relacionados à dor. Um modulador alostéricos positivos (PAMs) e um agonista silencioso do nAChR $\alpha 7$, revertem comportamentos aversivos associados à dor visceral em camundongos (Bagdas, *et al.*, 2016; Papke *et al.*, 2015). Isso indica que o nAChR $\alpha 7$, como alvo terapêutico, pode, além de tratar componentes sensoriais, contribuir na melhora dos aspectos afetivos da dor.

2.8 RECEPTOR MUSCARÍNICO M2

Os receptores muscarínicos (mAChRs) são metabotrópicos e acoplados a proteína G (Figura 6) o que permite regular várias funções bioquímicas em todo o organismo, já que a sua expressão é ampla (Zhang *et al.*, 2006). As proteínas G em seu estado inativado tem um GDP associado ao seu sítio catalítico em sua porção $G\alpha$, que se mantém firmemente ligada as subunidades $G\beta\gamma$. Quando o receptor o qual a proteína está acoplada é ativado, irá ocorrer uma mudança conformacional que permite a interação da proteína G, mais especificamente da sua porção alfa com o receptor. Essa interação muda a conformação da subunidade alfa e faz com que ocorra a troca do GDP por GTP, o que permite a dissociação e o deslocamento das subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. A subunidade $G\alpha$ ligado a GTP e $G\beta\gamma$ livres irão interagir com diversos efetores a jusante. Já estão bem estabelecidos vários efetores sinalizados pelas proteínas G, mas quais deles serão ativados e a consequência dessa ativação é dependente do tipo de proteína G. Essas proteínas são divididas, quanto ao tipo de subunidade α , em 4 famílias: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$ (Syrovatkina *et al.*, 2016). Existem 5 subtipos de mAChRs conhecidos: M1, M2, M3, M4 e M5 (Langmead; Watson; Reavill, 2008; Wess, 2004;). Estes subtipos de mAChR diferem quanto ao tipo de proteína G que estão ligados. Os subtipos M1, M3 e M5 formam complexos preferencialmente com as proteínas G q/11 que estão relacionadas a ativação de fosfolipases C (PLC- β 1-4), que cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), o IP3 abre o receptor IP3 para o cálcio na membrana do reticulo endoplasmático, e o DAG ativa a proteína quinase C. Já os receptores M2 e M4 estão acoplados a G_i/o que inibem a adenilato ciclase, diminuindo as concentrações intracelulares de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP) e inibe canais de cálcio dependentes de voltagem (Maeda *et al.*, 2019).

Figura 6- Estrutura dos receptores muscarínicos de acetilcolina.



Fonte: TEAL et al., 2019

Legenda: Os receptores muscarínicos são acoplados a proteína G. M1, M3 e M5 acoplam-se seletivamente às proteínas G Gq / 11, levando à ativação do PLC e subsequente aumento em DAG e IP3, levando ao aumento do cálcio intracelular. M2 e M4 ativam preferencialmente as proteínas Gi/o G, inibindo a adenilil ciclase, portanto, reduzindo as concentrações intracelulares de AMPc.

Estudos demonstraram a presença de receptores muscarínicos na medula espinal atuando na via nociceptiva. (Chen *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2006,). A inibição de receptores muscarínicos com atropina via intratecal acarretou uma diminuição de opioides endógenos na medula espinal (Yang *et al.*, 2012). Foi visto que a ativação de mAChRs supraespinhais e espinhais induz efeitos analgésicos (Wess; Eglen; Gautam, 2007). Estudos mostraram que receptores muscarínicos são expressos em neurônios pré-sinápticos nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigeminal. E a administração de agonistas muscarínicos diminuiu a liberação de glutamato por neurônios no corno dorsal da medula espinal (Jeong *et al.*, 2013).

Dentre os mAChRs, o subtipo M2 é o mais expresso no corno dorsal da medula espinal e também o mais envolvido na nocicepção. Um estudo observou aumento da expressão do receptor muscarínico M2 nos gânglios da raiz dorsal de neurônios de

animais submetidos a ligadura de nervos espinhais (Hayashida *et al.*, 2006). A administração de arecaidina, um agonista relativamente seletivo para M2, induziu a dessensibilização de nociceptores periféricos tipo C e suprimiu a transmissão dos impulsos de dor causados através de estimulação térmica (Bernardini *et al.*, 2001). A administração de arecaidina também foi capaz de reduzir a hiperalgesia e alodínia causada pela administração intraplantar do fator de crescimento do nervo em camundongos (De Angelis *et al.*, 2014). A oxotremorina, um agonista muscarínico, é capaz de induzir antinocicepção nos testes de movimento da cauda e placa quente em camundongos. Camundongos *knockout* para receptor muscarínico de acetilcolina M2 exibiram redução significativa na antinocicepção causada pela oxotremorina (Gomez *et al.*, 1999).

Essas informações revelam o potencial do sistema colinérgico como um alvo terapêutico para dor neuropática. Sendo assim, inibidores de acetilcolinesterase podem aumentar a disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica, e conseqüentemente proporcionar maior ativação desses receptores, podendo resultar em analgesia. Dentre esses inibidores de acetilcolinesterase, a donepezila vem sendo testada para o tratamento de condições dolorosas (Clayton, *et al.*, 2007; Ferrier *et al.*, 2015; Selvy *et al.*, 2022).

2.9 DONEPEZILA PARA O TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA

A donepezila, um sal cloridrato de piperidina, é um inibidor reversível e não competitivo da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh). A donepezila age inibindo a atividade hidrolítica da AChE, aumentando a concentração de ACh na fenda sináptica (Zeb *et al.*, 2017). Embora este fármaco seja utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, cuja fisiopatologia está relacionada com a redução da atividade da colina acetiltransferase (enzima responsável pela biossíntese da ACh) a donepezila tem apresentado resultados positivos contra a dor neuropática. Estudos mostram que a donepezila é bem tolerada pelos pacientes, principalmente portadores de Alzheimer, além de apresentar uma menor incidência de efeitos adversos comparada a outros inibidores de AChE (como a rivastigmina e a galantamina) ou placebo (Jackson *et al.* 2004).

Assim, devido a essa maior segurança e perfil de tolerabilidade, a donepezila

tem sido avaliada para o tratamento da dor neuropática. Um dos primeiros estudos que demonstraram a eficácia da donepezila no controle da dor neuropática foi conduzido por Clayton e Colaboradores em 2007. Esses autores encontraram um significativo efeito antinociceptivo promovido pelo tratamento com a donepezila (10 mg/kg) administrada por via oral em ratos com dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático. Além disso, esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento com a atropina, um antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos de ACh, administrada sistêmica e intratecalmente. Reforçando esse achado, um estudo atual demonstrou que o efeito antinociceptivo da donepezila (5 mg/kg, v.o.) em ratos com dor neuropática induzida pelo quimioterápico paclitaxel foi revertida pela administração intratecal dos receptores muscarínicos do tipo 2 (M2R) metotramina (Selvy *et al.*, 2022). A participação desses receptores presentes no córtex insular também foi demonstrada em outro estudo avaliando o efeito antinociceptivo da donepezila em ratos com dor neuropática (Ferrier *et al.*, 2015).

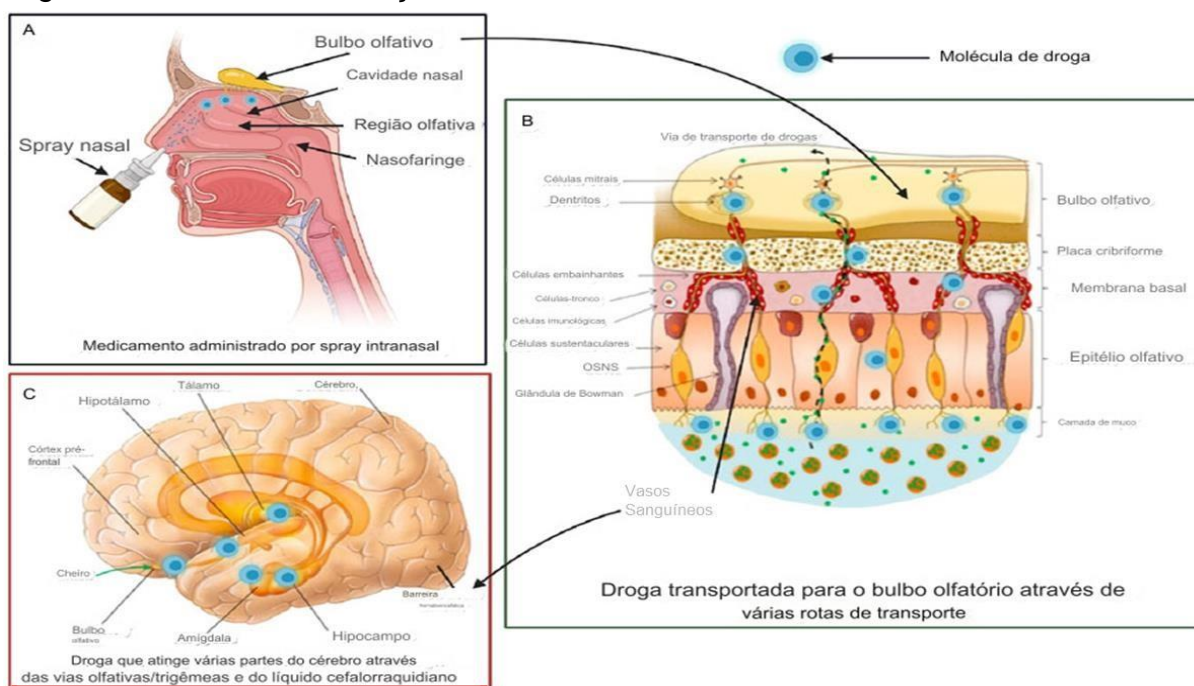
Estudos avaliando a expressão de receptores colinérgicos em células da glia têm encontrado a existência de todos, tanto os muscarínicos que são acoplados a proteína G (metabotrópicos) quanto os nicotínicos (ionotrópicos) (Gamage *et al.*, 2020). Receptores muscarínicos do tipo 2 e 4 e nicotínicos do tipo alfa 7 têm sido demonstrados envolvidos no controle da nocicepção via transmissão colinérgica, porém em neurônios de 1ª e 2ª ordem no corno dorsal da medula espinal (Naser & Kuner, 2018).

Apesar da escassez de estudos, as células da glia espinhais podem ser um importante alvo envolvido na antinocicepção promovida pela donepezila durante a dor neuropática. Estudos *in vitro* verificam que a donepezila inibiu a produção dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), ciclooxigenase 2 e óxido nítrico em cultura de micróglia ativada com lipopolissacarídeo bacteriano (Haraguchi *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2021). Além disso, esse efeito foi associado com a inibição das vias de sinalização intracelular e de fatores de transcrição para esses mediadores.

Diante do exposto, faz-se importante estudos que investiguem o efeito da donepezila em células da glia; bem como, o mecanismo colinérgico envolvido neste processo. Além disso, a administração oral de donepezila tem sido relacionada a uma série de efeitos adversos como diarreia, bradicardia, vômito, insônia e anorexia

(Zhang *et al.*, 2019). É uma das estratégias que tem sido estudadas para solucionar os inconvenientes relacionados à administração oral da donepezila, é o desenvolvimento de formulações para administração nasal deste fármaco (Souza *et al.*, 2021). A via nasal vem sendo cada vez mais explorada para a administração de fármacos que atuam no sistema nervoso central. É uma via de fácil acesso, não invasiva e indolor, além de evitar o metabolismo de primeira passagem, a inativação no trato gastrointestinal e o metabolismo da parede intestinal (Kirange; East, 2017). Ela possui um epitélio com uma grande área superficial, além de permitir o transporte direto de fármacos para o cérebro (Figura 7) , através das vias olfatórias e respiratórias, evitando assim a passagem pela barreira hematoencefálica, principal obstáculo para os fármacos que atuam no sistema nervoso central (Khan *et al.*, 2017).

Figura 7- Via de administração nasal.



Fonte: RAJPUT, et al. (2022).

Legenda: Através da administração nasal, os fármacos podem chegar ao SNC sem atravessar a BHE através da via direta na qual faz parte as vias olfatórias e trigeminal, e da via indireta que é facilitada pela alta vascularização da região.

Assim, com o intuito de viabilizar a administração nasal de donepezila, foi empregado no presente trabalho carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) carregados com donepezila, previamente desenvolvidos. Os CLN são considerados excelentes carreadores para administração nasal de fármacos, uma vez que promovem uma rápida absorção para o cérebro, além de que, quando incorporado no

CLN, o fármaco é protegido da degradação e do efluxo que o leva de volta para a cavidade nasal, aumentando assim a disponibilidade do fármaco no cérebro e no sangue (Costa *et al.*, 2019; Akel; Ismail; Csóka, 2020). Em trabalho anterior do nosso grupo, foi demonstrado que a administração nasal de CLN carregados com canabidiol foi capaz de aumentar a eficácia e a duração do efeito antinociceptivo em animais com dor neuropática induzida por quimioterápico, quando comparado à administração de solução de canabidiol, tanto pela via nasal quanto pela via oral (Matarazzo et al., 2021).

Nesse sentido, além do presente estudo tentar desvendar o mecanismo nociceptivo da inibição da acetilcolinesterase, ele irá avaliar o efeito antinociceptivo de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com donepezila (CLN-donepezila), administrados via nasal em camundongos com dor neuropática.

3 JUSTIFICATIVA

A alta incidência da dor neuropática e os prejuízos à qualidade de vida dos indivíduos que convivem com ela, justificam a intenção de elucidar mecanismos de analgesia eficientes, já que ela se mostra muitas vezes resistente aos tratamentos propostos até o momento, além de que esses podem apresentar efeitos adversos que variam de desagradáveis até graves.

Nessa busca estudos vem comprovando a eficácia da donepezila como alternativa a esses tratamentos. Porém, ainda não se sabe se a antinocicepção promovida por este fármaco está relacionada à inibição de micróglia, já que essas são amplamente descritas como importantes na modulação da excitabilidade dos neurônios, e assim se faz importante esclarecer se elas são os potenciais alvos.

Além disso, a administração nasal da donepezila através de um carreador lipídico nanoestruturado, pode evitar os efeitos gastrointestinais e outros indesejáveis da administração oral na dor neuropática, além de poder potencializar e prolongar o efeito analgésico, tornando a verificação de sua eficácia e viabilidade de uso para este fim de grande importância.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da donepezila e de CLN-donepezila sobre a micróglia, via receptores colinérgicos durante a dor neuropática em camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da donepezila e de CLN-donepezila sobre o limiar nociceptivo de camundongos com dor neuropática;

a) Investigar o envolvimento espinal e talâmico dos nAChR $\alpha 7$ e mAChR M2 na antinocicepção induzida pela CLN-donepezila durante a dor neuropática;

b) Avaliar a expressão gênica de nAChR $\alpha 7$, mAChR M2, e micróglia em medula espinal e tálamo, durante o controle da dor neuropática pela CLN-donepezila;

c) Investigar a influência de CLN-donepezila sobre os níveis das citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-1 β na medula espinal; e tálamo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), foram utilizados nos experimentos que se iniciaram quando os animais tinham 7 semanas de idade e pesavam entre 20 e 25g. Os animais foram alojados aleatoriamente em caixas de polipropileno, forradas com maravalha, com no máximo 6 animais por caixa, e mantidos em condições padrão de temperatura (22,1 °C), ciclo claro/escuro (12h/12h) e umidade de 65%, com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas éticas estabelecidas para a experimentação, recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG. O projeto foi aprovado pela CEUA sob o número de protocolo 0046/2022 (Anexo A).

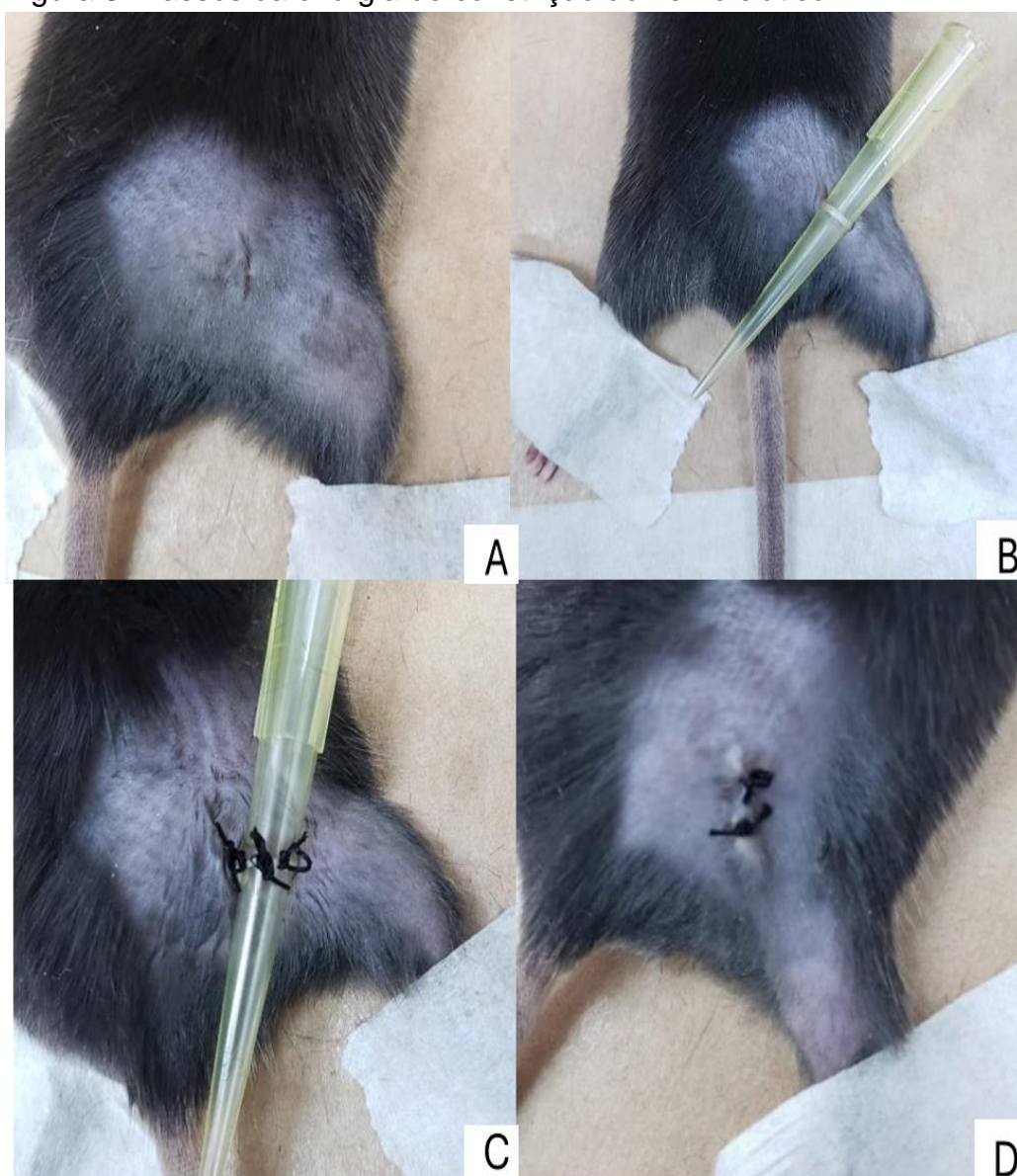
5.2 CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO (CCI)

Os animais foram pesados e anestesiados por meio de uma injeção intramuscular contendo uma solução composta por cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. No membro posterior direito, foi administrado 1 µL da solução anestésica para cada grama de peso do animal. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre uma mesa, com seus membros fixados por meio de uma fita adesiva. Em seguida, foi realizada a tricotomia na região posterior da coxa direita. A cirurgia de constrição do nervo ciático foi conduzida de acordo com o protocolo estabelecido por Bennet & Xie (1988), que propuseram o método para indução de dor neuropática, por ser capaz de evocar sinais comportamentais de dor espontânea, e proteção como mancar e evitar colocar peso sobre o membro lesionado. O protocolo foi utilizado, porém adaptado para camundongos e consistiu na incisão da pele e músculos do membro posterior direito, expondo assim o nervo ciático direito. Posteriormente, foram realizadas três ligaduras no nervo utilizando fio de sutura de seda com espessura 4,0, cada uma com um nó duplo. A pressão dos nós contra o nervo foi

ajustada de forma a não interromper o fluxo sanguíneo epineural, mas também garantindo que não deslizassem pelo nervo. O nervo foi então reposicionado e a incisão foi fechada com pontos simples(Figura 8).

Outro grupo foi formado por animais falsos operados (grupo SHAM) submetidos ao mesmo protocolo experimental, mas apenas com a exposição dos nervos, sem a realização de qualquer constrição por ligadura, caracterizando assim o grupo SHAM.

Figura 8- Passos da cirurgia de constrição do nervo ciático.



Fonte: Autora (2023).

Legenda: A) incisão; B) exposição do nervo ciático; C) Ligaduras com fio de seda ao redor do nervo ciático; D) sutura da pele.

5.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO ESTUDO

As seguintes substâncias foram utilizadas no presente estudo:

-Cloridrato de Cetamina

Cetamin 10%, Syntec, Brasil. - 100 mg/Kg (CEUA UNIFAL-MG, 2021).

Foi utilizado como anestésico cirúrgico associado a xilazina, para as cirurgias de constrição do nervo ciático.

-Cloridrato de xilazina

Xilazin 2%, Syntec Brasil. - 10 mg/Kg, IM (CEUA UNIFAL-MG, 2021).

Foi utilizado como sedativo associado a cetamina, para realização das cirurgias.

-Isoflurano

Isoforine, Cristália, Brasil. – 3% Inalatório (CEUA UNIFAL-MG,2021).

Foi utilizado como anestésico inalatório para a administração de substâncias por via intratecal.

-Donepezila

Cloridrato de donepezila, Cristália, Brasil.- 3 mg/kg VO (Choi *et al.*, 2022).

Inibidor da acetilcolinesterase, diluído em salina (0,9%) e administrado por via oral em um volume de 10µL por grama de peso corpóreo.

-CLN-donepezila

Carreador lipídico nanoestruturado carregados com donepezila, Laboratório de pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos, FCF-UNIFAL-MG. - 3mg/Kg (correspondente a dose de donepezila VO). Administrados por via nasal em um volume de 20µL por animal, divididos em 4 aplicações de 5µL cada, revezadas entre as narinas.

-CLN-Vazio

Carreador lipídico nanoestruturado vazio, Laboratório de pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos, FCF-UNIFAL-MG.

Veículo da CLN-donepezila. Administrado por via nasal em um volume de 20µL por animal, divididos em 4 aplicações de 5µL cada, revezadas entre as narinas.

-Dimetindeno

Maleato de dimetindeno, Tocris, EUA – 0,4 µg (Motta *et al.*, 2011).

Antagonista seletivo para receptor mAChR M2, administrado por via intratecal (i.t.) em um volume de 6 µL.

-Metillicaconitina

Citrato de metillicaconitina - 10 µg, (Damaj *et al.*, 1997).

Antagonista seletivo para nAChR $\alpha 7$, administrado por via intratecal (i.t.) em um volume de 6 µL.

5.5.2 Via de administração oral

A donepezila administrada por via oral foi utilizada como controle positivo por apresentar efeitos antinociceptivos já conhecidos. A donepezila foi então administrada por via oral pelo método de gavagem que consiste em conter o animal pela base do pescoço, de maneira que o camundongo mantenha a boca aberta naturalmente para que se possa introduzir uma cânula metálica curvada, medindo 4cm de comprimento e 3 mm de diâmetro, acessando o esôfago do animal. Foi administrado 10 µL por grama de peso corporal da solução contendo donepezila.

5.4 PREPARO DOS CLN-DONEPEZILA

Os CLN-donepezila foram preparados no Laboratório de pesquisa em Sistemas de Liberação de Fármacos, FCF-UNIFAL-MG, pela técnica da microemulsificação a quente, proposta por Gasco (1993). Os CLN são partículas coloidais constituídas por uma matriz lipídica biodegradável preparados empregando ácido esteárico (Sigma-Aldrich, EUA), ácido oleico (Sigma-Aldrich, EUA), Tween-80 (Sigma-Aldrich, EUA) e Pluronic F68 (Sigma-Aldrich, EUA).

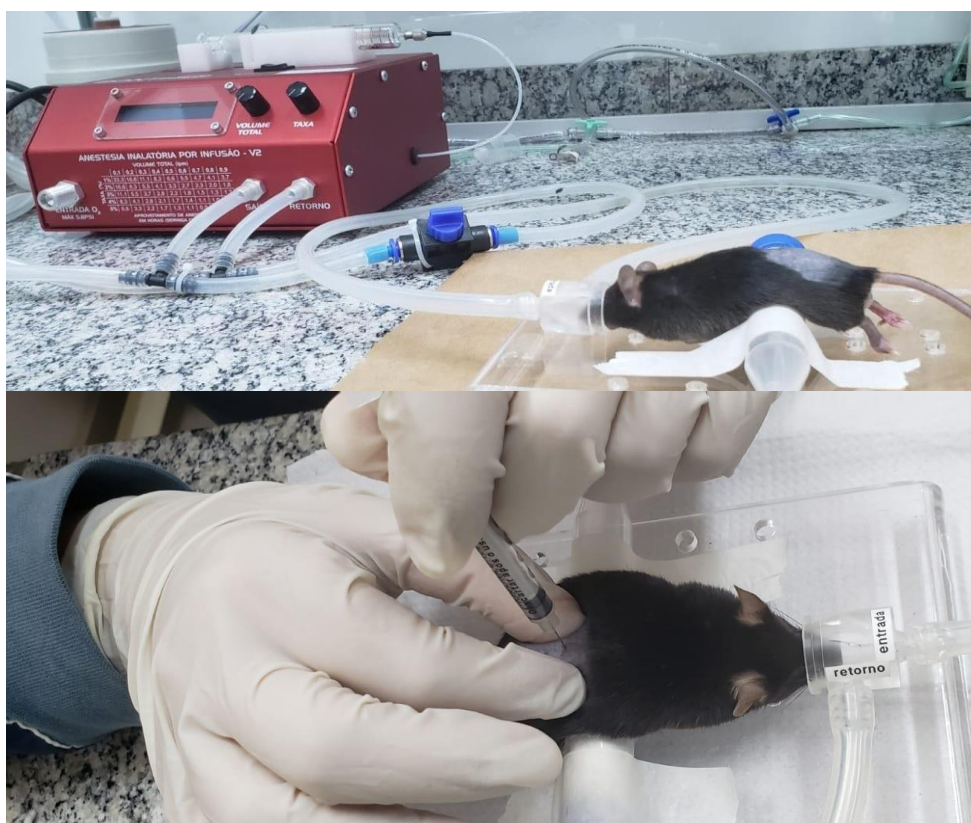
5.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

5.5.1 Via de administração intratecal

Para avaliar a participação espinhal do mAChR M2 e do nAChR $\alpha 7$ na possível antinocicepção induzida pela donepezila ou pelo CLN-donepezila, os respectivos antagonistas dimetindeno (DIM) e a metillicaconitina (MLA) foram administrados por via intratecal. Para a realização das injeções intratecais (i.t.), utilizamos o método proposto por Hylden e Wilcox (1980). Inicialmente, os animais foram sedados com

isoflurano por meio de um sistema de anestesia inalatória digital de baixo fluxo (Bonther Produtos e Equipamentos para Laboratório LTDA). O equipamento contém uma caixa de indução em acrílico onde os animais permaneceram até a indução da anestesia com uma taxa de 3% de isoflurano. Após a indução os animais foram colocados em uma mesa com máscara para inalação de isoflurano com uma taxa de manutenção de 1% (Figura 9). Anestesiados, os animais foram tricotomizados na região lombar, e foi utilizado álcool 70% para assepsia do local. Em seguida, os animais foram posicionados de maneira a facilitar a palpação dos processos espinhosos das vértebras lombares (segmentos L5 e L6). Uma agulha foi então inserida diretamente no espaço intervertebral de cada animal e, após a verificação do reflexo da cauda, foi realizada a injeção em um volume total de 6 μ L para cada substância ou veículo. Previamente a esse procedimento e com o objetivo de assegurar a administração correta das substâncias, foi realizado um treinamento para o aprimoramento da técnica com injeção de 6 μ L de lidocaína (2%), observando como resposta positiva da administração i.t. de lidocaína, uma paralisia dos membros traseiros dos animais.

Figura 9- Administração intratecal.



Fonte: Autora (2023).

5.5.3 Via de administração nasal

Foi avaliado o efeito antinociceptivo da administração nasal de CLN-donepezila. Para esta administração, os animais foram anestesiados com isoflurano e segurados pela pele na região cervical e mantidos em posição dorsal em uma angulação de 45° (Figura 10). Logo em seguida, 5 µL de cada uma das soluções; CLN-donepezila; ou CLN-vazio, foram pipetados na entrada próximo de cada uma das narinas do animal e após 3 segundos o mesmo procedimento foi repetido em cada uma das narinas, totalizando 20 µl (Hanson *et al.*, 2013).

Figura 10- Administração nasal.



Fonte: Hanson et al. (2013).

5.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Para avaliar as alterações do limiar nociceptivo mecânico resultantes da constrição crônica do nervo ciático e da administração das substâncias, foram utilizados os filamentos de von Frey (AESTHESIA, EUA) (Figura 11A), seguindo um método padronizado pelo laboratório. Os passos estão descritos a seguir:

1. Ambientação dos animais: O experimento foi realizado dentro o período de 7:00 horas da manhã e 18:00 horas da tarde, respeitando o ciclo claro dos animais. Inicialmente, os camundongos foram colocados em caixas de vidro, divididas em 4 compartimentos individuais. Essas caixas que não possuem fundo permaneceram sobre um aparato com grade de metal, que permite a exposição da pata dos animais(Figura 11B). Para ambientação os animais permaneceram de 30

a 60 minutos no aparato experimental, antes de se iniciar a aplicação dos filamentos.

2. Aplicação dos filamentos: Foi utilizado um conjunto de monofilamentos (AESTHESIA®, EUA) de várias espessuras 0,02g, 0,04g, 0,07g, 0,16g, 0,4g, 0,6g, 1,0g, 1,4g e 2,0g em que cada filamento possui uma força em gramas. Os filamentos foram aplicados de forma perpendicular sobre a superfície plantar da pata traseira direita de cada animal, com uma pressão suficiente para causar a curvatura do filamento (Figura 11C). Cada filamento foi aplicado 3 vezes (3 aplicações seguidas com o mesmo filamento) iniciando-se pelo de 0,02 g e aumentando progressivamente até atingir uma resposta positiva de nocicepção.

3. Identificação da resposta de nocicepção positiva: A retirada, a lambida ou agitação da pata que está sendo avaliada foram consideradas respostas positivas. Ea identificação em gramas do filamento que provocou tal resposta foi anotada para aquele animal. Observada a resposta positiva, o próximo animal a ser avaliado recebeu as aplicações conforme o passo 2.

4. Medições repetidas: Após avaliação de todos os animais e identificação do filamento capaz de evocar uma resposta positiva para cada um, uma nova medida foi realizada para cada animal. Iniciando pelo primeiro animal, os passos 2 e 3 foram repetidos mais duas vezes. Assim, no total, foram realizadas três medições por animal.

5. Cálculo do limiar nociceptivo mecânico: Foi calculada a média das três medições de cada animal em gramas (g) e foi considerada como o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata.

Figura 11- Teste de von Frey.



Fonte: Autora (2023).

Legenda: A) Filamentos de von Frey ; B) Animais posicionados sobre grade;
C) Aplicação do filamento até que o mesmo se curve.

5.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

Com o intuito de verificar o efeito da donezepila, bem como da CLN-donezepila sobre a atividade motora dos animais, foi utilizado o teste do rota-rod. O aparelho de rotarod (Bonther, Brasil) consiste em um cilindro com 25 cm de diâmetro, dividido em quatro baias de 6 cm cada (Figura 12). O cilindro gira no sentido horário a uma velocidade constante de 13 rotações por minuto. Foi realizada uma ambientação prévia no dia anterior ao teste. No dia do teste, foi avaliado o período em segundos em que cada animal permanece no cilindro que está girando (Rosland *et al.*, 1990). O período máximo registrado foi de 120 s. O teste foi repetido três vezes para cada animal, com um intervalo de 5 minutos entre as medidas. Foi calculada a média em segundos das 3 medidas de tempo em que cada animal permaneceu no cilindro sem cair.

Figura 12- Aparelho de rotarod.



Fonte: Autora (2023)

5.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Além dos ensaios comportamentais o presente estudo avaliou, por meio do ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real, a expressão gênica para mAChR M2, nAChR $\alpha 7$ e TMEM119 (marcador microglial). Para tal, segmentos da medula espinal (segmentos L4-L6) e do tálamo (retirado do hemisfério cerebral esquerdo) dos seguintes grupos de animais foram utilizados (n=5): animais induzidos a dor neuropática; animais sham; animais induzidos a dor neuropática tratados com CLN- donepezila e animais sham tratados com CLN-donepezila.

Imediatamente após a eutanásia dos animais com overdose de xilazina e cetamina, no 21º dia pós CCI ou SHAM, os tecidos de cada animal dos grupos previamente descritos foram coletados e logo em seguida colocados em tubos de 1,5 ml contendo TRIzol e armazenados a -80°C . A quantificação do RNA total foi avaliada por leitura espectrofotométrica usando o NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Em seguida, 1 μg 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 (Quadro 4). 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 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 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).

Quadro 3- Primers utilizados na técnica de RT-qPCR.

Gene	Sequência (5' - 3')
nAChR $\alpha 7$	F:GTACAAGGAGCTGGTCAAGAA R:CAGGAGACTCAGGGAGAAGTA
mAChR M2	F:GAATGGGGATGAAAAGCAGA R:GCAGGGTGCACAGAAGGTAT
tmem119	F:GTGTCTAACAGGCCCCAGAA R:AGCCACGTGGTATCAAGGAG
sdha	F:GGAACACTCCAAAAACAGACCT R:CCACCACTGGGTATTGAGTAA

Fonte: Autora.

Legenda: F = do inglês forward , iniciador direto ; R = do inglês reverse, iniciador inverso.

5.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Foi avaliado o efeito de CLN-donepezila sobre os níveis espinhais e talâmicos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 em animais submetidos a injúria por constrição crônica do nervo (CCI) ou sham. Para a realização desses experimentos, após a eutanásia, as amostras da medula espinal (segmentos L4-L6) e do tálamo esquerdo (contralateral a lesão) foram coletadas e utilizadas para a dosagem de citocinas por meio da técnica de ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Foram utilizados kits específicos para cada citocina e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Prepotech, EUA). As amostras foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4 e centrifugadas a 5,000 rpm por 10 minutos em uma temperatura de 4°C e então os sobrenadantes foram retirados e armazenados em tubos no biofreezer a uma temperatura de -80°C até o momento da análise. Inicialmente, microplacas (uma para cada citocina) com 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de

captura durante a noite. No outro dia, os poços foram lavados com tampão de lavagem contendo PBS e 0,05% de Tween-20 e uma solução de BSA foi adicionada nos poços da microplaca por 2 horas, para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Após esse período a placa foi lavada novamente e depois, a curva padrão de cada citocina e as amostras foram colocados nos poços pelo período de 2 horas. Em seguida, a placa foi novamente lavada, e incubada por 2 horas com anticorpo de detecção. Após nova lavagem, a avidina-HRP foi adicionada por um período de 30 minutos. Por fim, a placa foi lavada mais uma vez e o substrato da HRP, 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico) (ABTS), foi adicionado. Por fim, as leituras das reações colorimétricas, foram realizadas a 405nm de comprimento em um leitor de microplacas ELx800 (BIOTEK, EUA).

5.10 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos os animais foram distribuídos de forma aleatória em grupos apresentados no Quadro 3.

Quadro 4 – Grupos experimentais.

(continua)

Grupos	Descrição
Avaliação do limiar nociceptivo	TESTE DE VON FREY(n=6)
CCI (injúria por constrição crônica)	Animais submetidos ao modelo de dor neuropática
SHAM (falso operados)	Animais submetidos à cirurgia simulada
CCI+ donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com donepezila (controle positivo)
SHAM+ donepezila	Animais falso operados e tratados com donepezila
CCI+CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com CLNs carregados com donepezila
SHAM+CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com CLNs carregados com donepezila
Avaliação de receptores	TESTE DE VON FREY(n=6)
CCI (injúria por constrição crônica)	Animais submetidos ao modelo de dor neuropática
SHAM (falso operados)	Animais submetidos à cirurgia simulada

Quadro 4 – Grupos experimentais

(continuação)

Grupos	Descrição
Avaliação de receptores	TESTE DE VON FREY(n=6)
CCI+dimetindeno+CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com antagonista do mACh M2 e CLN-donepezila
SHAM+dimetindeno+CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com antagonista do mACh M2 e CLN-donepezila
CCI+metillicaconitina+CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com antagonista do nACh $\alpha 7$ e CLN-donepezila
SHAM+metillicaconitina+CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com antagonista do nACh $\alpha 7$ e CLN-donepezila
CCI+ Veículo +CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com salina (veículo dos antagonistas) e CLN-donepezila
SHAM+ Veículo +CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com salina (veículo dos antagonistas) e CLN-donepezila
Grupos de controle com veículos	TESTE DE VON FREY(n=5)
CCI+SALINA	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com salina (veículo da donepezila)
SHAM+SALINA	Animais falso operados e tratados com salina (veículo da donepezila)
CCI+CLN-Vazio	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com o veículo da CLN-donepezila
SHAM+CLN-Vazio	Animais falso operados e tratados com o veículo da CLN-donepezila
Avaliação da função motora	TESTE DE ROTAROD(n=5)
CCI+ donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com donepezila (controle positivo)
SHAM+ donepezila	Animais falso operados e tratados com donepezila
CCI+CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com CLNs carregados com donepezila
SHAM+CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com CLNs carregados com donepezila
Testes biomoleculares	ELISA(n=4), RT-PCR(n=5)
CCI (injúria por constrição crônica)	Animais submetidos ao modelo de dor neuropática
SHAM (falso operados)	Animais submetidos à cirurgia simulada / Controle

Quadro 4 – Grupos experimentais

(conclusão)

Grupos	Descrição
Testes biomoleculares	ELISA(n=4), RT-PCR(n=5)
CCI+CLN-donepezila	Animais induzidos a dor neuropática e tratados com CLNs carregados com donepezila
SHAM+CLN-donepezila	Animais falso operados e tratados com CLNs carregados com donepezila

Fonte: elaborado pela autora.

5.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.11.1 Delineamento da avaliação do limiar nociceptivo, e da avaliação da função motora

Inicialmente, para avaliar o efeito de CLN-donepezila sobre a nocicepção induzida pelo modelo de dor neuropática, foi avaliada a medida basal do limiar nociceptivo dos animais. Logo em seguida, esses animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos: CCI, CCI+donepezila, CCI+CLN-donepezila, SHAM, SHAM+donepezila, SHAM+CLN-donepezila. Após 21 dias a CLN-donepezila foi administrada no grupo CCI+CLN-donepezila e também no grupo SHAM+donepezila. A donepezila (controle positivo) também foi administrada no 21º dia pós CCI e sham, nos grupos CCI+donepezila, SHAM+donepezila. A CLN-donepezila e donepezila foram administradas e 40 minutos depois o limiar nociceptivo foi avaliado, e novas avaliações foram subsequentemente realizadas a cada 40 min enquanto perdurou o efeito, e repetida 24 horas após as administrações. Neste mesmo período foi também avaliado os grupos CCI e SHAM que não receberam nenhum tratamento.

Para avaliar a participação dos receptores mAChR M2 e nAChR $\alpha 7$ no efeito de CLN-donepezila sobre a dor neuropática, foi verificado o limiar nociceptivo de novos grupos de animais que passaram pela medida basal e foram divididos aleatoriamente em grupos (n=6): CCI+dimetindeno+CLN-donepezila, SHAM+dimetindeno+CLN- donepezila, CCI+metillicaconitina+CLN-donepezila, SHAM+metillicaconitina+CLN- donepezila, CCI+Veículo+CLN-donepezila, SHAM+Veículo+CLN-donepezila. No caso dos animais que receberam os antagonistas para os receptores colinérgicos ou veículo, estes foram administrados

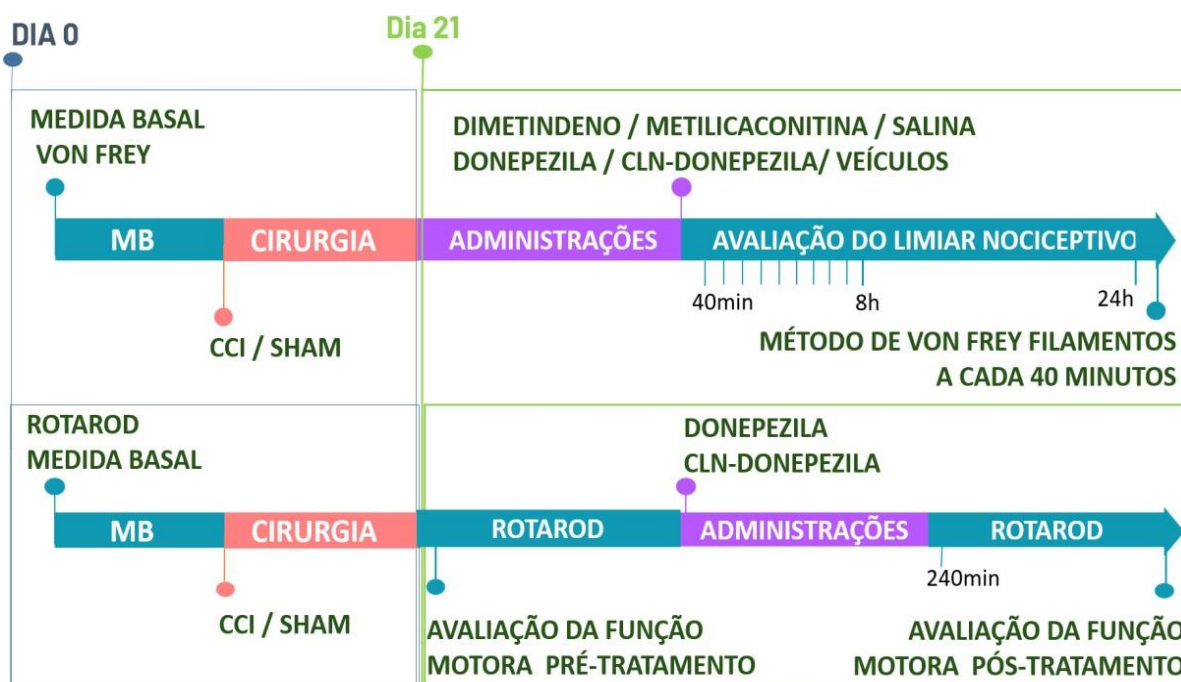
por via i.t. 10 min antes à administração de CLN- donepezila, e 40 minutos depois foi avaliado o limiar nociceptivo a cada 40 minutos, até 480 minutos e repetido 24 horas depois das administrações.

Em outro momento também foi verificado o limiar nociceptivo de animais controles CCI e sham tratados com salina ou CLN-vazio respectivos veículos da donepezila e da CLN-donepezila, e foi seguido o mesmo protocolo de cirurgia, tempo de administrações e de avaliações do limiar nociceptivo.

Com intuito de avaliar se a função motora é afetada por donepezila e CLN-donepezila, o que pode influenciar a resposta de retirada frente ao estímulo mecânico dos filamentos de von Frey, foi realizado o teste de rotarod. Para esse experimento utilizamos outros animais divididos nos seguintes grupos: CCI+ donepezila, SHAM+ donepezila, CCI+CLN-donepezila, SHAM+CLN-donepezila. O teste de rotarod foi composto de uma medida basal, realizada antes das cirurgias nos animais CCI e sham, posteriormente uma medida no 21º dia após as cirurgias, seguido da administração de donepezila e CLN-donepezila e uma nova medida 240 minutos pós-tratamento.

A Figura 13 representa resumidamente o delineamento das avaliações descritas. O dia de início do experimento foi descrito como dia 0, em que foi realizado a medida basal (MB) e as cirurgias CCI ou sham. No dia 21 foram feitas as

Figura 13- Esquema representativo do delineamento das avaliações do limiar nociceptivo, e da função motora.



Fonte: Autora.

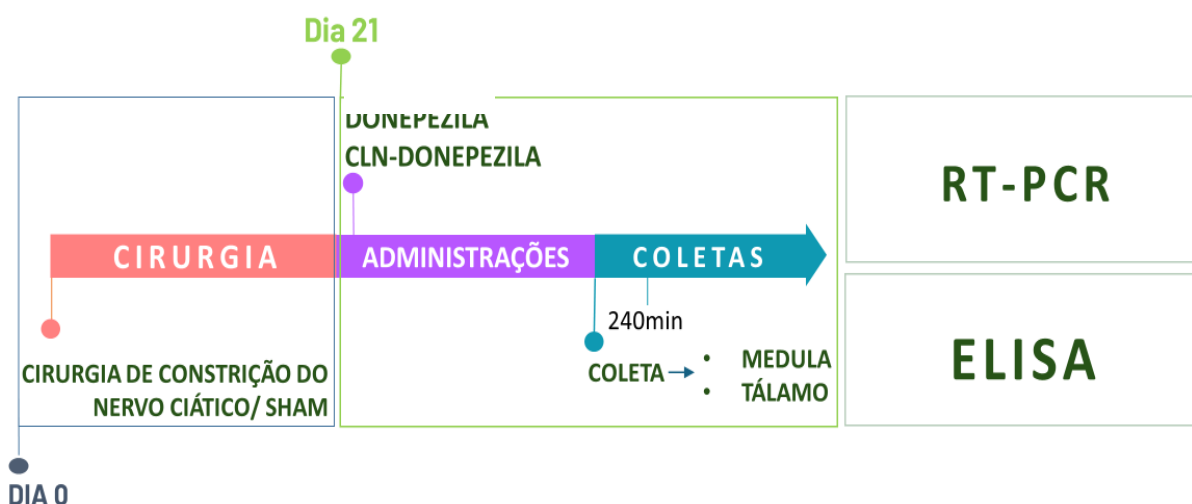
Legenda :A) Foi realizado uma medida basal (MB) antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (CCI), após 21 dias as substâncias foram administradas e 40 minutos depois o limiar nociceptivo foi avaliado a cada 40 minutos, e repetido 24h depois.

B) Foi realizado uma medida basal (MB) antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (CCI), após 21 dias foi realizada uma nova avaliação da função motora e logo em seguida as substâncias foram administradas , 240 minutos depois (auge do efeito de CLN-donepezila) a função motora foi novamente avaliada.

5.11.2 Delineamento dos testes biomoleculares

Os testes biomoleculares foram realizados para avaliar os níveis de citocinas IL-10, IL-1 β e TNF- α , e a expressão gênica dos receptores mACh M2, nACh α 7 e micróglia, na medula espinal e no tálamo contralateral, após a administração de CLN-donepezila. Para cada um dos testes, RT-PCR, ou ELISA, foi utilizado os seguintes grupos: CCI (injúria por constrição crônica), SHAM (falso operados), CCI+CLN-donepezila, SHAM+CLN-donepezila. Os grupos tratados com CLN-donepezila, no 21º dia pós cirurgia, foram eutanasiados 240 minutos após as administrações, e logo em seguida os segmentos L4-L6 da medula espinal e o tálamo esquerdo (contralateral a lesão) foram coletados e armazenados em -80°C, até o dia do experimento, como resume a Figura 14.

Figura 14- Esquema representativo do delineamento das coletas de amostras para os testes biomoleculares.



Fonte: Autora.

Legenda: Foi realizado a cirurgia de constrição do nervo ciático (CCI), após 21 dias as substâncias foram administradas , 240 minutos depois (auge do efeito de CLN-donepezila) , os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta de amostras da medula e do tálamo esquerdo.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais de limiar nociceptivo mecânico, foi utilizada análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*). Já o tratamento estatístico dos dados obtidos no teste de rotarod e nos ensaios moleculares foi realizado por meio da análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*). Ambas as análises foram seguidas pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A análise estatística e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5 (GraphPad Software, EUA).

6 RESULTADOS

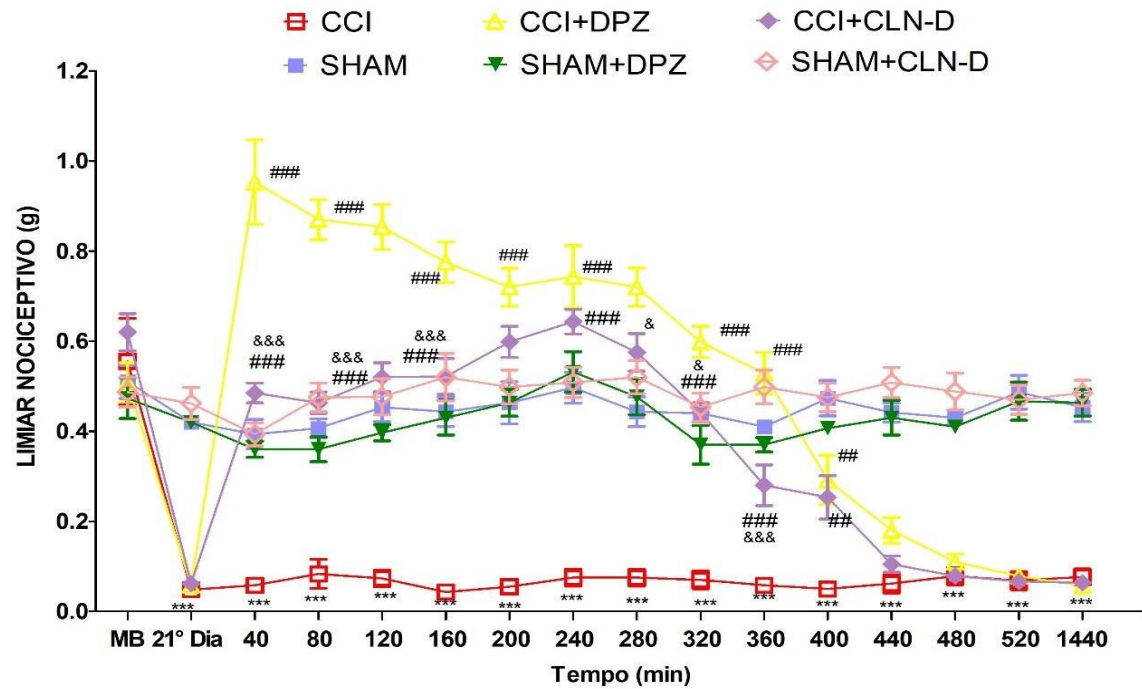
6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DONEPEZILA E CLN-DONEPEZILA NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE ANIMAIS COM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR CCI

Inicialmente, foi avaliado se CLN-donepezila administrada via nasal, seria capaz de gerar antinocicepção; bem como este efeito comparado à donepezila administrada por via oral em animais submetidos a CCI (Gráfico 1A). O resultado desse experimento mostrou uma redução significativa do limiar nociceptivo do grupo CCI em relação ao grupo SHAM, no 21º dia pós-operatório ($F_{5,30} = 22.94$, $P < 0,001$). Outro grupo submetido a CCI foi tratado, no 21º dia pós-operatório, com CLN-donepezila por via nasal (CCI+CLN-DPZ), o limiar foi verificado e constatou-se reversão da alodínia mecânica 40 minutos após o tratamento, por 400 minutos ($F_{5,30} = 22.94$, $P < 0,001$). Também no 21º dia pós indução da dor neuropática, outro grupo de animais foi tratado com donepezila 3 mg/kg por via oral (CCI+DPZ), e 40 minutos após a administração, houve uma grande reversão do limiar nociceptivo comparado ao grupo dor neuropática (CCI) ($F_{5,30} = 22.94$, $P < 0,001$), ultrapassando até mesmo o limiar basal pré cirúrgico. O efeito foi significativo em relação ao grupo não tratado (CCI) até 400 minutos ($F_{5,30} = 22.94$, $P < 0,001$) após a administração oral de donepezila.

Os animais falso operados que receberam também os tratamentos com CLN-donepezila, e donepezila (SHAM+CLN-DPZ / SHAM+DPZ) não apresentaram nenhuma alteração significativa em seu limiar comparado com animais falso operados não tratados (SHAM) ($F_{5,30} = 22.94$, $P > 0,05$).

Dessa forma, observando o Gráfico 1A podemos considerar que os tratamentos, tanto com donepezila como CLN-donepezila causaram acentuada redução da resposta positiva de nocicepção comparados ao grupo não tratado (CCI). Além disso, a comparação entre as drogas mostra que houve uma diferença significativa em seus efeitos, principalmente entre 40 a 160 minutos ($P < 0,001$, $F_{5,30} = 22.94$), após a administração das substâncias. A donepezila, administrada por via oral, promoveu um efeito antinociceptivo mais acentuado comparado a CLN-donepezila ($P < 0,001$, $F_{5,30} = 22.94$).

Gráfico 1A – Avaliação do efeito da donepezila e CLN-donepezila no limiar nociceptivo

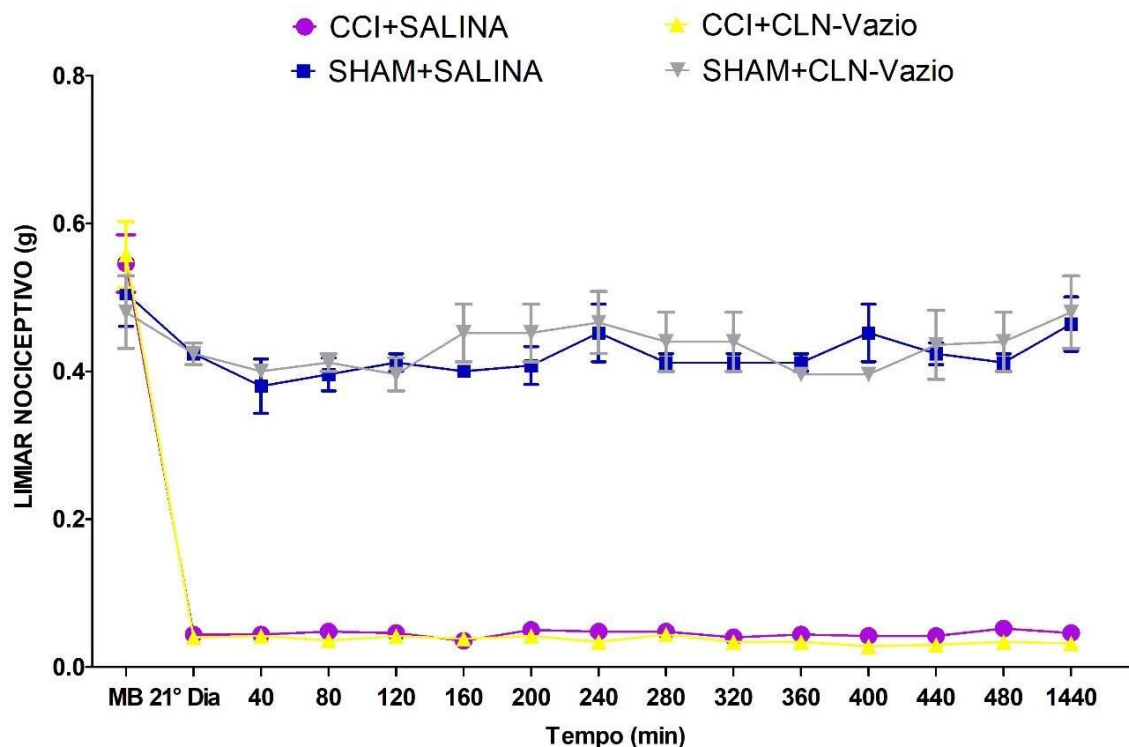


Fonte: Autora.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste Bonferroni. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de von Frey filamentos antes do procedimento cirúrgico (MB). No 21º dia após o procedimento cirúrgico foi feita administração por v.o. de donepezila (CCI+DPZ/ SHAM DPZ), e administração por v.n. de CLN-donepezila (CCI+CLN-D/ SHAM+CLN-D), após as administrações o limiar foi verificado a cada 40 minutos, até 520 minutos e na 24ª hora (1440 min). *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo SHAM. #### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo CCI. &&& & indicam significância estatística ($p < 0,001$, $p < 0,05$) da comparação ente CCI+CLN-DPZ e CCI+DPZ.

Para descartar a influência dos respectivos veículos dos fármacos, no limiar verificado após administrações de CLN-donepezila e donepezila, foi avaliado o limiar nociceptivo de animais em grupos tratados apenas com os veículos: salina e CLN-vazio (Gráfico 1B). Animais submetidos a cirurgia de indução de dor neuropática (CCI+SALINA) ou animais falso operados (SHAM+SALINA) não apresentaram alteração dos seus limiares nociceptivos ($p > 0,05$) após receberem salina ($F_{3,16} = 10,20$). O mesmo foi observado com a administração do carreador da nanopartícula de donepezila vazio, tanto animais com dor neuropática CCI+CLN-Vazio), como animais falso operados (SHAM+CLN-Vazio), que receberam administração nasal do CLN-vazio não sofreram alteração de resposta nociceptiva após a administração ($p > 0,05$; $F_{3,16} = 10,20$).

Gráfico 1B – Avaliação do efeito dos veículos da donepezila e CLN-donepezila no limiar nociceptivo.



Fonte: Autora.

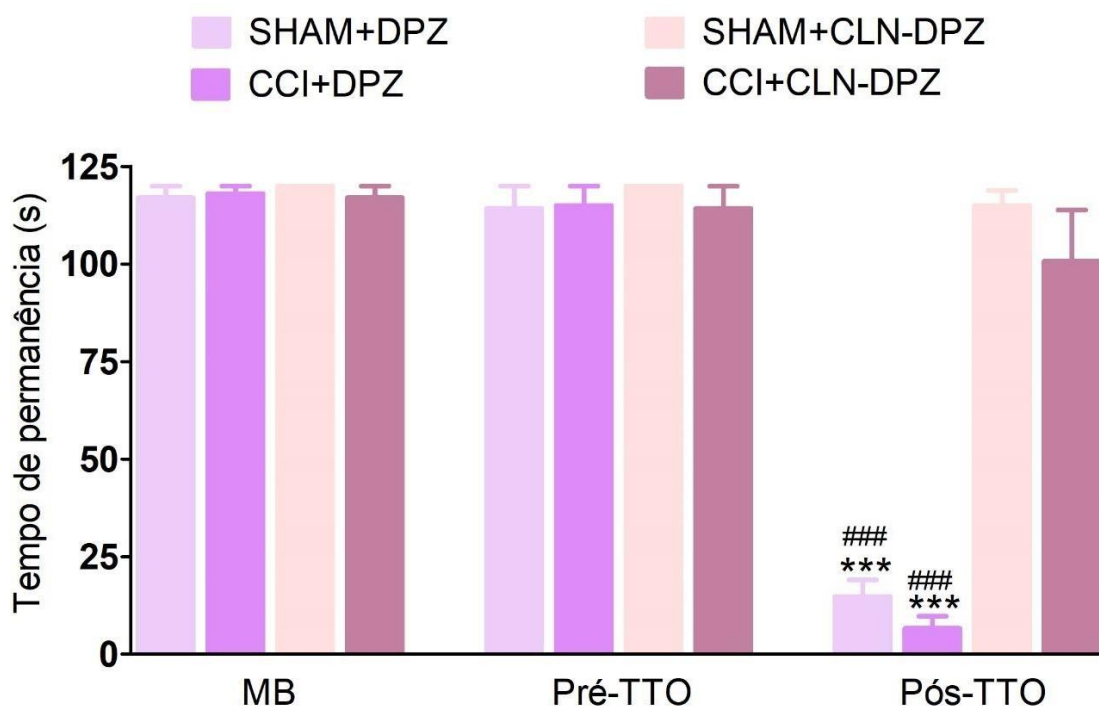
Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos antes do procedimento cirúrgico (MB), e depois de 21 dias. Após a medida pré- tratamento no 21º dia após o procedimento cirúrgico, foi feita administração de salina (CCI+SALINA / SHAM+SALINA), e administração de CLN-Vazio (CCI+CLN-Vazio/ SHAM+CLN-Vazio), após as administrações o limiar foi verificado a cada 40 minutos, por 480 minutos e após 24 horas (1440 min).

6.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZILA E CLN-DONEPEZILA

Foi utilizado o teste de rotarod para avaliar a atividade locomotora, diante da possibilidade da donepezila, e CLN-donepezila provocarem uma alteração da função motora dos animais. A avaliação mostrou que animais tratados por via oral com donepezila, não foram capazes de manter a locomoção no cilindro giratório, a perda da coordenação motora foi observada tanto nos animais que foram induzidos a dor neuropática (CCI+DPZ), como em animais falso operados (SHAM+DPZ) ($F_{3,16}=77.38, p<0.001$).

Já os animais tratados com CLN-Donepezila (CCI+CLN-DPZ/SHAM+CLN-DPZ) não apresentaram alteração na coordenação motora ($p > 0,05$).

Gráfico 2 – Avaliação da coordenação motora de animais com DN após administração de donepezila e CLN-donepezila



Fonte: da autora.

Legenda: Avaliação basal (MB) da coordenação motora antes da cirurgia e antes dos tratamentos com donepezila (CCI+DPZ/SHAM+DPZ) ou CLN-donepezila (CCI+CLN-D/SHAM+CLN-D) (Pré-TTO) e após o tratamento (Pós-TTO). Os dados representam a média \pm E.P.M. do tempo de permanência (s), de 5 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando One-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação aos valores de MB para os mesmos grupos, ### indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação aos valores de Pré-TTO para os mesmos grupos.

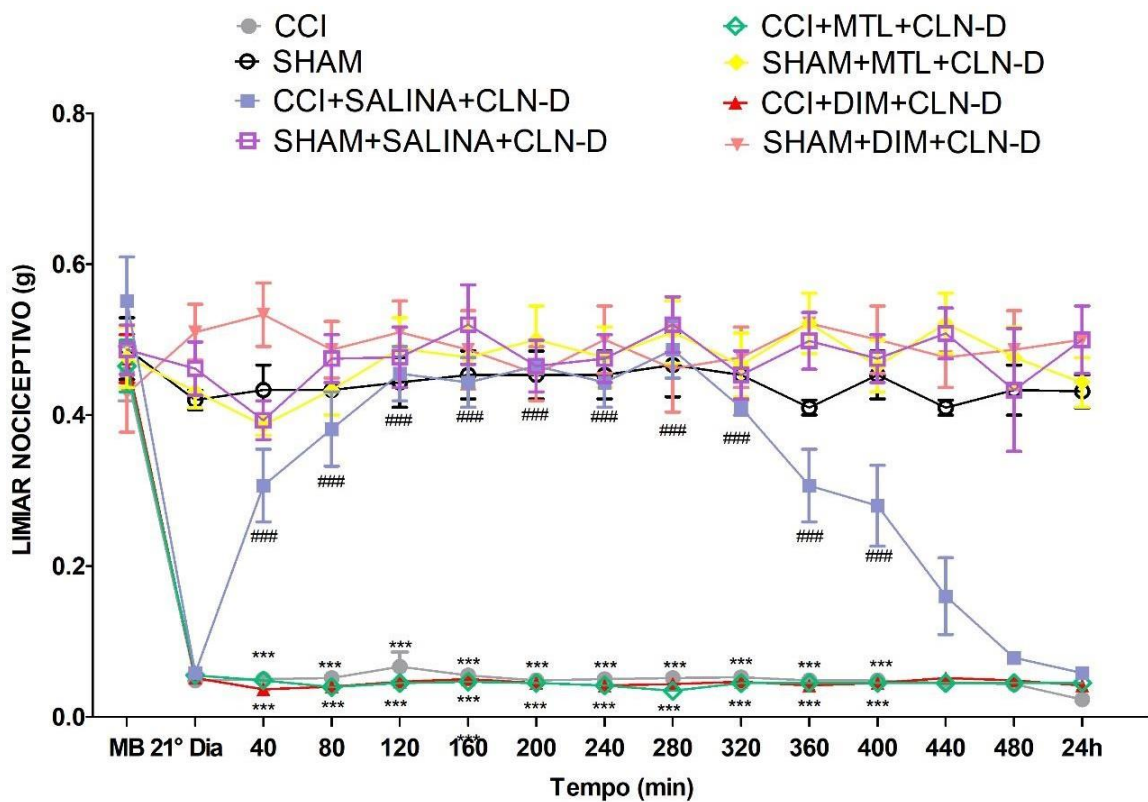
6.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES nACh $\alpha 7$ e mACh M2 DA MEDULA ESPINAL NA ANTINOCEPÇÃO INDUZIDA POR CLN-DONEPEZILA

Diante do resultado da avaliação da função motora, prosseguimos os experimentos apenas com o CLN-donepezila. Foi investigado se o efeito antinociceptivo da administração do inibidor de acetilcolinesterase, CLN-donepezila, está relacionado com a ativação dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 na medula espinal. Para isso, foi avaliado o limiar nociceptivo de animais que receberam antagonistas, por via intratecal, para esses receptores (Gráfico 3).

Foi administrado metillicaconitina, um antagonista para o receptor nACh $\alpha 7$, por via intratecal, e dez minutos depois administrado CLN-donepezila, por via nasal. A administração da metillicaconitina anteriormente à CLN-donepezila, reverteu o efeito

antinociceptivo da CLN-donepezila, de 40 a 400 minutos após a sua administração (F 7,40= 9.575, $p < 0,001$). Do mesmo modo, a pré-administração de dimetindeno, um antagonista do receptor mACh M2 impossibilitou a resposta antinociceptiva causada pela aplicação nasal de CLN-donepezila, a partir de 40 minutos após a aplicação até 400 minutos, comparado com o efeito de CLN-donepezila em animais pré-tratados com salina (F 7,40= 9.575, $p < 0,001$).

Gráfico 3 – Participação dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 no efeito antinociceptivo do CLN-donepezila.



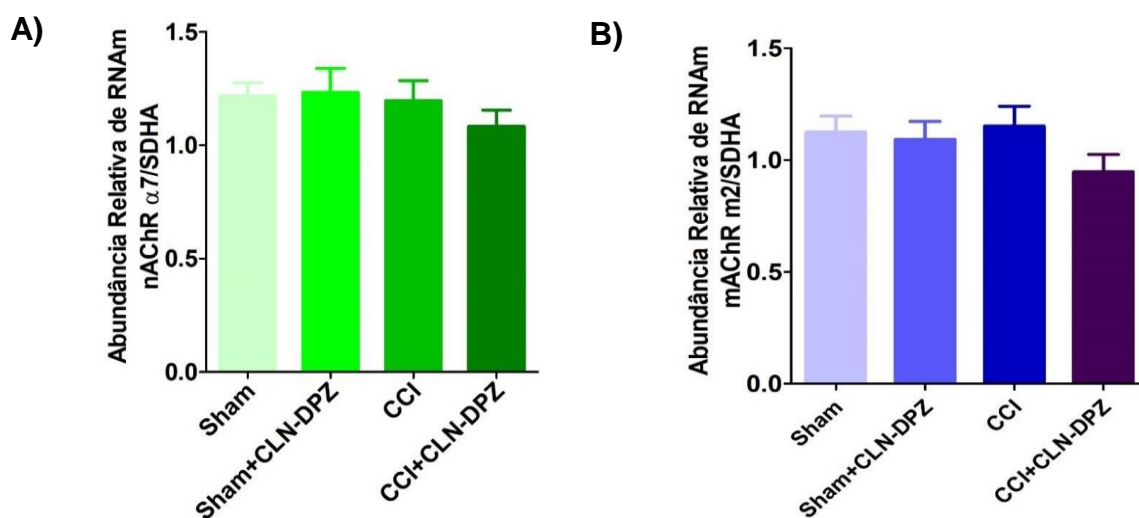
Fonte: Autora.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós teste Bonferroni. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos antes do procedimento cirúrgico (MB). No 21º dia após o procedimento cirúrgico um grupo recebeu por via i.t. o antagonista de mACh M2: dimetindeno, seguido por administração v.n. de CLN-donepezila (CCI+DIM+CLN-D/ SHAM+DIM+CLN-D), em outro grupo foi feita administração por via i.t. de antagonista de nACh $\alpha 7$: metilicacotina, seguido de administração por v.n. de CLN-donepezila (CCI+MTL +CLN-D/ SHAM+MTL+CLN-D), e ainda outro grupo recebeu salina por via i.t., seguido de administração por v.n. de CLN- donepezila (CCI+SALINA+CLN-D/ SHAM+SALINA+CLN-D). Após as administrações o limiar foi verificado a cada 40 minutos, até 480 minutos e na 24ª hora (1440 min). *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo CCI+SALINA+CLN-D.

6.4 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NA EXPRESSÃO GÊNICA ESPINAL DOS RECEPTORES nACh $\alpha 7$ E mACh M2 E DA MICRÓGLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Diante da observação farmacológica da participação dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 no efeito antinociceptivo induzido por CLN-donepezila, foi avaliado a influência de CLN-donepezila sobre a expressão gênica desses receptores nos segmentos L4 a L6 da medula espinal. Para isso, foi utilizada a técnica de RT-PCR e avaliado os grupos CCI e SHAM, tratados ou não tratados com CLN-donepezila e não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos em relação a expressão dos receptores nACh $\alpha 7$ (Gráfico 4A) e receptores mACh M2 (Gráfico 4B).

Gráfico 4 – Expressão gênica dos receptores nACh 7 (A), e mACh M2(B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 21^o dia após CCI.



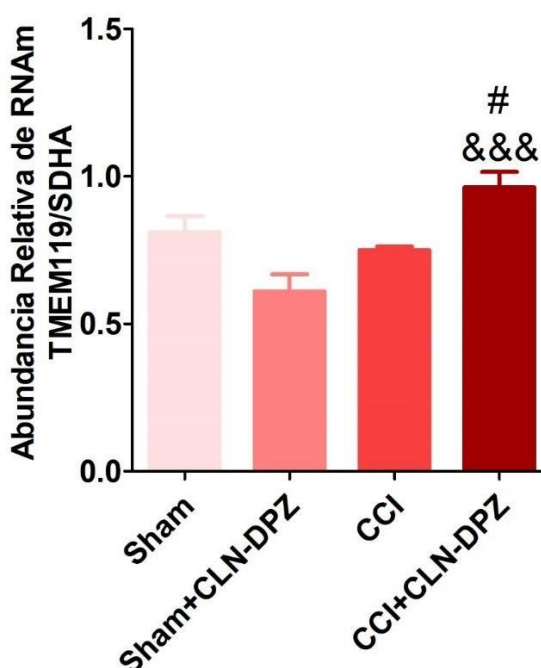
Fonte: autora.

Legenda: Expressão gênica de a) nAChR $\alpha 7$, b) mAChR M2, na medula espinal de animais CCI ou Sham tratados e não tratados com CLN-donepezila no 21^o dia pós-operatório (n=5 por grupo). Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. CCI: do inglês chronic constriction injury; CLN-DPZ: carreador lipídico nanoestruturado carregado com donepezila; RNAm: do inglês ribonucleic acid messenger; SDHA: do inglês succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A.

A literatura nos apresenta a micróglia desempenhando um importante papel da sensibilização da via nociceptiva relacionada a dor neuropática (Leblanc, *et al.*, 2011; Ji; Suter, 2006). Para investigar se a micróglia poderia ser um alvo envolvido na antinocicepção promovida pela CLN-donepezila durante a dor neuropática, investigamos os níveis gênicos espinais para o marcador microglial TMEM119

(proteína transmembrana 119). Os dados apresentados no Gráfico 5 mostra expressão de genes para TMEM119 mais elevada no grupo CCI tratado com CLN-donepezila em relação ao grupo CCI não tratado ($p < 0,05$), e aumento também em relação ao grupo SHAM tratado com donepezila ($p < 0,001$).

Gráfico 5 – Expressão gênica de micróglia nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 21º dia após CCI.



Fonte: autora.

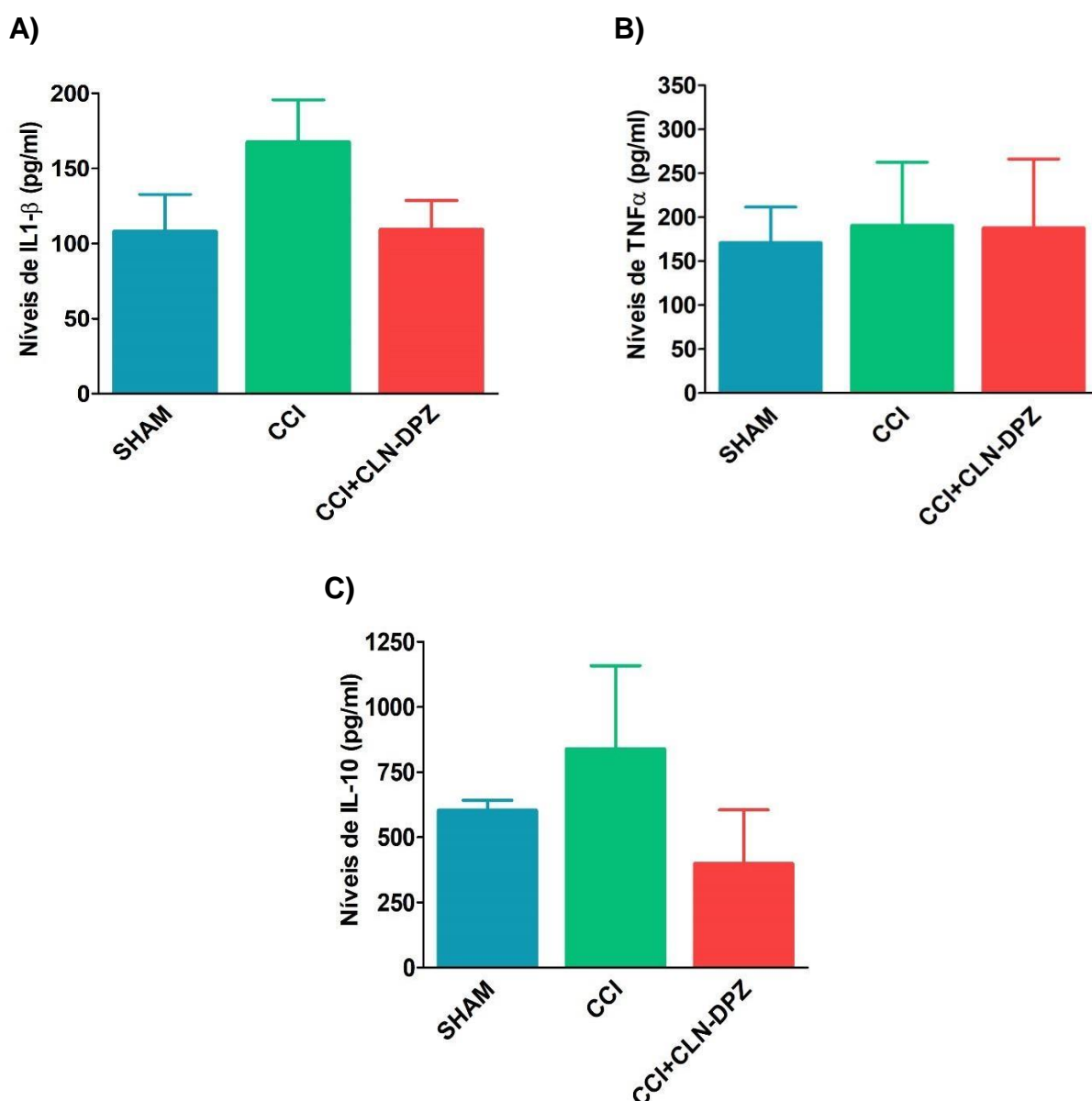
Legenda: Expressão gênica de TMEM119, na medula espinal de animais CCI ou Sham tratados e não tratados com CLN-donepezila no 21º dia pós-operatório ($n=5$ por grupo). Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. &&& indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo Sham+CLN-DPZ. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo CCI. CCI: do inglês *chronic constriction injury*; CLN-DPZ: carreador lipídico nanoestruturado carregado com donepezila; RNAm: do inglês ribonucleic acid messenger; SDHA: do inglês succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A.

6.5 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

A ativação microglial, tanto para seu fenótipo M1 como M2, contribui para a modulação da dor neuropática através da liberação de substâncias, como as citocinas que atuam na sinalização glial e neuronal (Costigan; Scholz; Woolf, 2009; Watkins; Maier, 2003). Visto que o tratamento com CLN-donepezila em animais com dor neuropática aumentou a expressão gênica microglial, a influência da CLN-donepezila

nos níveis espinais das citocinas IL-1 β , TNF α e IL-10, foi avaliada. O Gráfico 6 A - C mostra que animais que receberam CLN-donepezila não apresentaram uma alteração significativa dos níveis das citocinas ($p > 0,05$) em relação aos grupos não tratados (CCI) ou controle (SHAM).

Gráfico 6 – Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) na medula no 21^o dia após CCI.



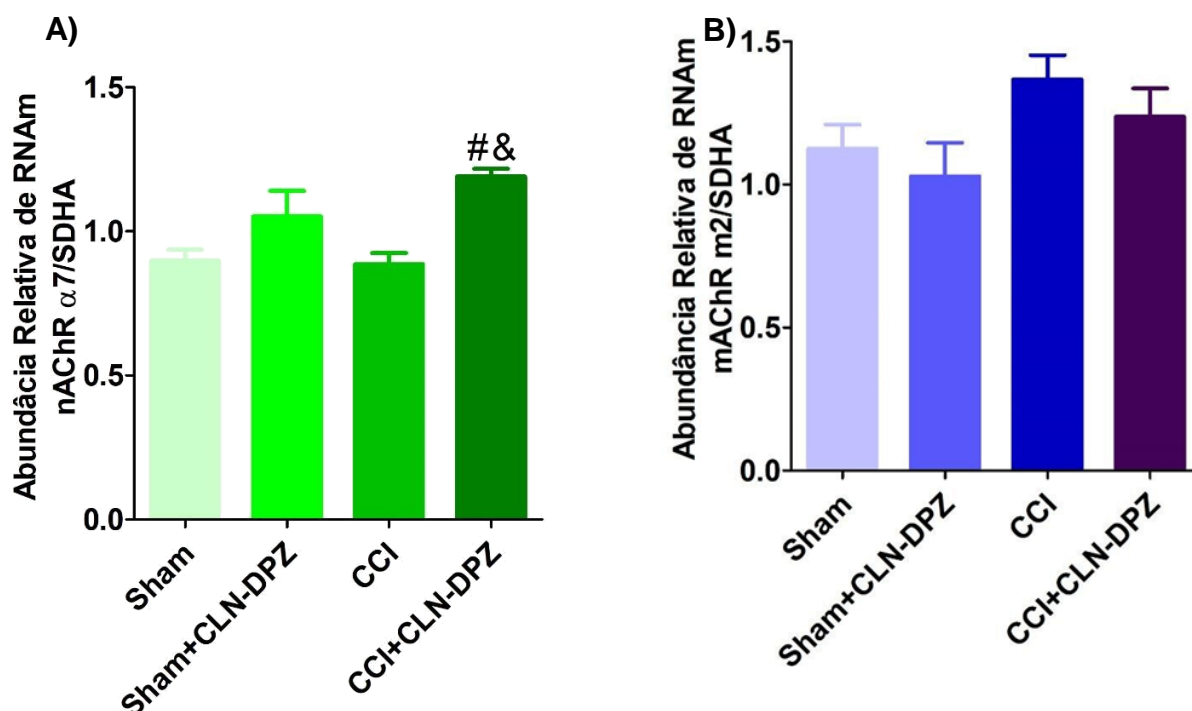
Fonte: Autora.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da concentração de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10(C) em picogramas por mililitro (pg/mL) de 4 animais por grupo. Os animais foram tratados com CLN-donepezila no 21^o dia após CCI, e 240 minutos após a administração os segmentos medulares foram coletados. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos.

6.6 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NA EXPRESSÃO GÊNICA TALÂMICA DOS RECEPTORES nACh $\alpha 7$ E mACh M2 E DA MICRÓGLIA DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

O tálamo é uma região crucial na integração, transmissão e modulação da nocicepção. A administração nasal permite alcançar uma ação sistêmica de CLN-donepezila, o que a possibilita exercer uma possível modulação da dor neuropática na região talâmica. Considerando isso, foi avaliado a influência de CLN-donepezila sobre a expressão gênica dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 no tálamo esquerdo (contralateral a lesão por CCI). Foram avaliados através da técnica de RT-PCR os grupos CCI e SHAM, tratados ou não tratados com CLN-donepezila (n=5 por grupo). Os dados obtidos mostraram um aumento nos níveis gênicos de nAChR $\alpha 7$ no grupo CCI tratado com CLN-donepezila em relação aos grupos CCI (sem tratamento) e SHAM também tratado com CLN-donepezila ($p < 0,05$) (Gráfico 7A). Os níveis gênicos de mAChR M2 não foram alterados.

Gráfico 7 – Expressão gênica dos receptores nACh $\alpha 7$ (A), e mACh M2(B) talâmicos no 21º dia após CCI.



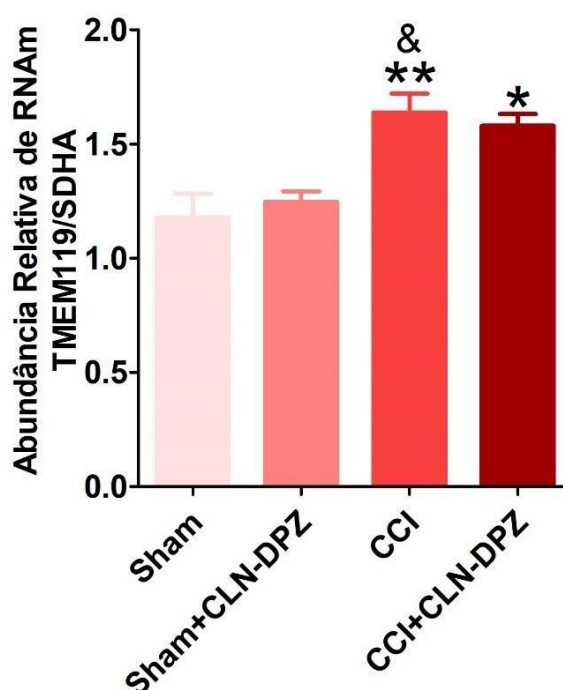
Fonte: autora.

Legenda: Expressão gênica de a) nAChR $\alpha 7$, b) mAChR M2, no tálamo de animais CCI ou Sham tratados e não tratados com CLN-donepezila no 21º dia pós-operatório (n=5 por grupo).

Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo CCI; & indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham+CLN-DPZ. CCI: do inglês chronic constriction injury; CLN-DPZ: carreador lipídico nanoestruturado carregado com donepezila; RNAm: do inglês ribonucleic acid messenger; SDHA: do inglês succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A.

Após uma lesão nervosa, há também uma ativação microglial no tálamo, que induz plasticidade sináptica e modula a transmissão nociceptiva (Cobianchi, 2014; Giardini, 2017; Huang *et al.* 2020; Infantino *et al.*, 2022). Por isso, foi também avaliado no tálamo contralateral a lesão por CCI os níveis gênicos relacionado a micróglia. O Gráfico 8 mostra que no tálamo os níveis de TMEM119 (marcador de micróglia) foram mais elevados nos grupos CCI ($p < 0,01$) e CCI+CLN-DPZ ($p < 0,05$) em relação ao grupo SHAM. O grupo CCI também apresentou nível elevado em relação ao grupo SHAM+CLN-DPZ ($p < 0,05$).

Gráfico 8 – Expressão gênica de micróglia no tálamo contralateral a lesão no 21º dia após CCI.



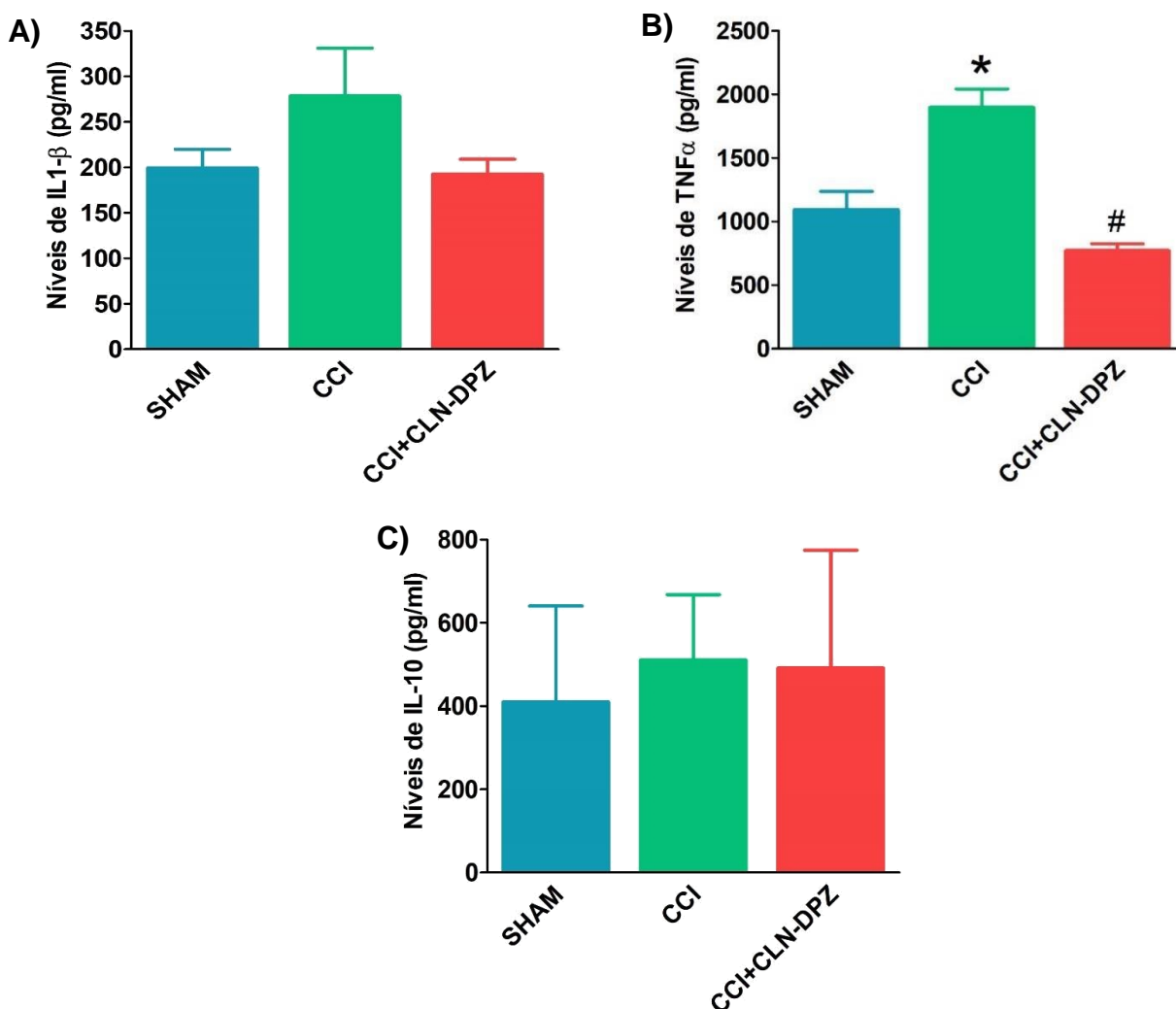
Fonte: autora.

Legenda: Expressão gênica de TMEM119, no tálamo contralateral a lesão CCI ou Sham tratados e não tratados com CLN-donepezila no 21º dia pós-operatório ($n=5$ por grupo). Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. & indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham+CLN-DPZ. *, ** indicam significância estatística ($p < 0,05$; $p < 0,01$) em relação ao grupo Sham. CCI: do inglês chronic constriction injury; CLN-DPZ: carreador lipídico nanoestruturado carregado com donepezila; RNAm: do inglês ribonucleic acid messenger; SDHA: do inglês succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A.

6.7 INVESTIGAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CLN-DONEPEZILA NOS NÍVEIS TALÂMICOS DE CITOCINAS DURANTE A DOR NEUROPÁTICA

Assim como nos seguimentos medulares, foram avaliados os níveis de citocinas também no tálamo contralateral a lesão, uma vez que essas substâncias desempenham um papel fundamental da modulação nociceptiva supra-espinhal. Os resultados dessa análise são mostrados no Gráfico 9, que indica níveis mais elevados de TNF- α no grupo CCI em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$), enquanto o grupo que recebeu o tratamento com CLN-donepezila (CCI+CLN-donepezila) apresentou níveis mais baixos de TNF- α comparados ao grupo CCI ($p < 0,05$) (Gráfico 9-B). Os níveis de IL-1 β e IL-10 não foram significativamente diferentes entre os grupos (Gráfico 9A;9C).

Gráfico 9 – Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) no tálamocontralateral a lesão 21^o dia após CCI.



Fonte: Autora.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da concentração de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10(C) em picogramas por mililitro (pg/mL), de 4 animais por grupo. Os animais foram tratados com CLN-donepezila no 21º dia após CCI, e 240 minutos após a administração os tálamos contralaterais a lesão foram coletados. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham, # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo CCI.

7 DISCUSSÃO

O modelo utilizado nesse estudo induz dor neuropática por meio da constrição crônica do nervo ciático (CCI) e gera comportamentos de alodínia e hiperalgesia nos animais, semelhante aos sintomas que acometem os humanos com dor neuropática (Bennett; Xie, 1988). O teste de filamentos de Von Frey adaptado do método proposto por Chaplan *et al.* (1994) nos permitiu confirmar que a cirurgia de CCI foi capaz de desencadear alodínia mecânica. Estudos anteriores demonstraram que CCI induziu alodínia mecânica do 7º até o 21º dia pós-operatório (Abbaszadeh *et al.*, 2018). Nos estágios iniciais, é provável que um componente inflamatório esteja associado em sua fisiopatologia, e com a manutenção do estímulo é normal que a dor se estabeleça, e se mantenha através da sensibilização. Portanto o 21º dia foi escolhido para realizar as avaliações, e foi observado que o grupo CCI apresentou uma diminuição significativa do limiar nociceptivo quando comparado ao grupo SHAM.

Diante do desafio que é o tratamento da dor neuropática, torna-se válido a busca por tratamentos inovadores. Nesse contexto, os carreadores lipídicos nanoestruturados apresentam vantagens como por exemplo, o aumento da biodisponibilidade e meia vida de fármacos (Cunha *et al.*, 2017). Além disso, os CLN tornam possível a administração nasal de fármacos, pois quando incorporado no CLN, o fármaco é protegido da degradação e do efluxo para a cavidade nasal (Costa *et al.*, 2019). Dessa maneira, o uso de CLNs é uma estratégia promissora para a administração de fármacos que apresentam efeitos gastrointestinais indesejáveis a partir da administração oral, como é o caso da donepezila. Sendo assim, foi utilizado CLN- donepezila, e avaliado seu efeito no limiar nociceptivo em camundongos induzidos a dor neuropática. Para isso utilizamos como controle positivo a donepezila, que já vem se mostrando eficiente no controle da dor neuropática (Clayton *et al.*, 2007).

A administração de CLN-donepezila gerou uma reversão da alodínia mecânica por 400 minutos após o tratamento. O efeito de CLN-donepezila não foi tão acentuado quanto ao efeito visto após a administração de donepezila, por via oral, porém o efeito no limiar nociceptivo da donepezila por via oral, visto no presente estudo, pode na verdade estar relacionado a uma incapacidade do animal responder aos estímulos, pois um efeito negativo na atividade motora foi observado durante o teste de rotarod. Em humanos já está claro que uma superestimulação dos receptores nicotínicos pode provocar fraqueza muscular, e até mesmo paralisia (Eddleston *et al.*, 2008). Já

a administração nasal de CLN-donepezila não causou depressão significativa na função motora.

A partir de então, foi investigado se o efeito antinociceptivo visto em animais que receberam CLN-donepezila, estava relacionado aos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 na medula espinal. Os mACh M2 do córtex insular posterior já foram relacionados ao efeito antinociceptivo da donepezila na dor neuropática induzida por oxaliplatina. O envolvimento dos mACh M2 na alodínia mecânica foi investigado utilizando um agonista M2 (oxotremorina) e um antagonista M2 específico (metoctramina), que foram injetados no córtex insular posterior. O agonista M2 aumentou significativamente os limiares de retirada mecânica dos animais. E o antagonista M2 preveniu o efeito antialodínico do agonista M2 (Ferrier *et al.*, 2015). Como um dos objetivos do presente estudo é avaliar o envolvimento do mACh M2 espinais, no efeito antinociceptivo de CLN-donepezila, foi administrado por via intratecal o antagonista M2 (dimetindeno). A administração do dimetindeno foi anterior a administração nasal de CLN-donepezila, e resultou na prevenção do efeito antialodínico de CLN- donepezila.

O mesmo foi visto com a pré-administração intratecal do antagonista nicotínico $\alpha 7$ (metillicaconitina), que também foi capaz de prevenir o aumento do limiar nociceptivo induzido por CLN-donepezila em animais com dor neuropática. Em outro estudo o pré-tratamento com a metillicaconitina também foi capaz de bloquear o efeito antialodínico de um agonista seletivo de nAChR $\alpha 7$ PHA-543613, administrado por via intratecal, porém em um modelo de dor induzido por estresse único prolongado (Sun, *et al.*, 2017). Já na dor neuropática induzida por lesão crônica do nervo, outro estudo também encontrou um envolvimento de receptores nACh $\alpha 7$, porém em níveis supraespinhais. A α -bungarotoxina, antagonista do receptor nACh $\alpha 7$, evitou o efeito anti-hiperalgésico induzido por CDP-colina, injetada intracerebroventricular (Bagdas *et al.*, 2011). A observação farmacológica da participação dos receptores espinais nACh $\alpha 7$ e mACh M2 no efeito antinociceptivo induzido pela CLN-donepezila sugere um potencial alvo para esse fármaco no tratamento da dor neuropática. No entanto, ao avaliar a influência da CLN-donepezila sobre a expressão gênica desses receptores nos segmentos L4 a L6 da medula espinal, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados com CLN-donepezila, tanto no grupo com lesão de nervo como no grupo SHAM. Esses resultados podem indicar que a CLN-donepezila não exerce seu efeito antinociceptivo através de uma regulação direta da expressão gênica dos receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2 na medula espinal.

Porém, a regulação positiva de acetilcolina e outros mecanismos, como a modulação pós-traducional desses receptores, podem estar envolvidos no efeito antinociceptivo da CLN-donepezila na dor neuropática. Assim como o tratamento com CLN-donepezila não resultou em aumento da expressão dos receptores colinérgicos espinais avaliados, o modelo de dor neuropática por CCI, também não alterou os níveis gênicos de nAChR $\alpha 7$ e mAChR M2 na medula espinal no 21º dia após CCI. Já o modelo de neuropatia diabética induzida pela estreptozotocina, foi capaz de aumentar a expressão do mAChR M2 na medula espinal (Chen; Pan, 2003). O modelo de ligadura dos nervos espinais também aumentou os níveis de mAChR M2 nos gânglios da raiz dorsal (Hayashida *et al.*, 2006)

O tálamo é uma região essencial para a modulação sensorial. As informações somatossensoriais são transmitidas e processadas através do tálamo antes de alcançar o córtex (Yen; Lu, 2013). Os níveis gênicos de nAChR $\alpha 7$ e mAChR M2 também foram avaliados no tálamo de animais induzidos a dor neuropática, e o modelo de CCI não alterou a expressão desses genes no tálamo comparados aos níveis de animais sham. Porém o tratamento com CLN-donepezila em animais induzidos a dor neuropática por CCI aumentou os níveis de nAChR $\alpha 7$ comparado aos grupos CCI não tratado e ao grupo SHAM tratado com CLN- donepezila. O nAChR $\alpha 7$ está presente na via nociceptiva em nível espinal e supraespinal, e foram vistos ativos em modelos de dor neuropática crônica (Bagdas *et al.*, 2018). Os nAChR $\alpha 7$ são expressos por vários tipos de células neuronais e não neuronais, como células endoteliais, linfócitos, monócitos, macrófagos, astrócitos, células precursoras de oligodendrócitos, e na micróglia (Bouzat *et al.*, 2017).

A micróglia expressa diversos receptores que quando ativados altera seu estado de repouso, através do reconhecimento de moléculas liberadas por estímulos como danos aos neurônios, infecção e isquemia (Yuan; Fei, 2022). Assim, a micróglia exibe uma plasticidade que apesar de muito ampla ainda é comumente diferenciada em fenótipo M1 e M2. Um estudo analisou a expressão de genes microgliais e observou que a micróglia M1 expressa um alto nível de genes transcritos relacionados à inflamação (Ccl2, Ccl3, Ccl5) enquanto a micróglia M2 expressa genes (por exemplo, IGF-1) importante no crescimento e na renovação de células neurais (Butovsky, *et al.*, 2014). O fenótipo tipo M1 é chamado de pró-inflamatório, ou ativação clássica, e o tipo M2 anti-inflamatório, ou ativação alternativa. A possível alternância do fenótipo M1 para o fenótipo M2 pode melhorar a dor neuropática (Yuan; Fei, 2022).

Em um modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, observou-se uma ativação da micróglia na medula espinal. Esta ativação foi caracterizada por uma morfologia hipertrófica, acompanhada de um significativo aumento no número de células e na expressão de marcadores microgliais (Cheng *et al.*, 2014). Diante do envolvimento do nAChR $\alpha 7$ na antinocicepção e sabendo que as células microgliais expressam nAChR $\alpha 7$, um estudo investigou se a participação do nAChR $\alpha 7$ na dor inflamatória está relacionado com a micróglia. A administração de colina ou do GTS-21, ambos agonistas nAChR $\alpha 7$, após a administração de gp120 (um indutor inflamatório) resultou em uma redução significativa na expressão do gene *cd11b*, marcador de ativação de micróglia, na medula espinal (Loram, *et al.*, 2010). Já no presente estudo, a expressão gênica na medula espinal de TMEM119 (proteína transmembrana 119), um marcador microglial, mostrou-se mais elevado nos animais tratados com CLN-donepezila em relação ao grupo CCI não tratado. TMEM119 é uma proteína transmembrana específica da micróglia, atuando como um marcador altamente específico da superfície celular microglial. Sua expressão é regulada durante o desenvolvimento da micróglia e é exclusiva dessa população celular, não sendo encontrada em macrófagos ou outros tipos de células imunes ou neurais (Bennett; *et al.*, 2016). Um estudo investigou genes únicos da micróglia, e através de análise por qPCR demonstrou que o TMEM119 estava ausente em oligodendrócitos, astrócitos e neurônios. Entretanto o mesmo estudo relata que TMEM119 é considerado um marcador de micróglia em seu estado de repouso (M0) e não é específico para os subtipos de ativação M1 ou M2 (Butovsky, *et al.*, 2014). Além disso, seu padrão de expressão pode variar dependendo do contexto, da região avaliada e das condições específicas. Em algumas situações, pode ocorrer uma diminuição na expressão de TMEM119 em microglia ativadas, incluindo aquelas que assumem um fenótipo M1 pró-inflamatório. No entanto, em outras condições, a expressão de TMEM119 pode permanecer estável ou até mesmo aumentar, independentemente do estado de ativação da micróglia (Ruan; Elyaman, 2022).

Portanto, embora TMEM119 seja amplamente usado como marcador de microglia, não é um indicador definitivo dos subtipos de ativação. Sendo assim, o aumento observado no gene TMEM119 na medula, causado por CLN-donepezila, conforme visto no presente estudo, sugere uma ativação microglial. Esta ativação pode estar direcionada para um fenótipo M2, porém para interpretar qual o estado de polarização, é necessário analisar demais dados e realizar novas investigações. No

tálamo os níveis de TMEM119 foi visto mais elevado no grupo CCI em relação ao grupo SHAM, não havendo diferença significativa entre o grupo CCI tratado com CLN-donepezila com o CCI não tratado. Esse resultado reforça que a micróglia pode apresentar diferentes padrões de expressão em cada região do SNC, mesmo diante da mesma condição.

A micróglia em seu fenótipo inflamatório pode ativar vias de sinalização intracelular como a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A consequência da ativação dessa e outras vias leva a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas 1 β (Ji *et al*, 2010). A redução da liberação de TNF- α foi observada através da ativação de nAChR α 7 em micróglia de ratos estimulada por LPS. Nesse mesmo estudo não foram encontradas diferenças nos níveis de IL-10 e IL-1 β relacionados com a ativação de nAChR α 7 (De Simone, 2005).

As citocinas são proteínas secretadas predominantemente por células do sistema imunológico, assim como por células de Schwann e células gliais do sistema nervoso central. Elas desempenham um papel crucial na comunicação entre as células, sendo liberadas em resposta a condições como doenças, inflamações ou lesões teciduais. Ao contrário dos hormônios, que têm efeitos mais prolongados, as citocinas têm uma ação rápida e uma vida útil relativamente curta. São agrupadas em cinco categorias: interleucinas, interferons, fatores de necrose tumoral, fatores de crescimento e quimiocinas. As citocinas vêm sendo apontadas como cruciais na fisiopatologia da dor neuropática. (Leung; Cahill, 2010)

Dentre as citocinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) têm sido associados ao desenvolvimento da dor neuropática em diversos modelos animais (Wells; *et al.*, 1992) . Estudos utilizando o modelo CCI em ratos demonstraram uma regulação positiva do TNF- α no local da lesão (Leung; Cahill, 2010). A injeção de TNF- α no ciático em ratos reproduz hipersensibilidade à dor semelhante à dor neuropática em humanos (Wagner; Myers, 1996; Sorkin; Doom, 2000). O CCI em ratos resulta em níveis elevados de imunorreatividade ao TNF- α nos gânglios da raiz dorsal (DRG) de aferentes adjacentes ipsilaterais lesionados e não lesionados (Schafers, *et al.*, 2003). Os estudos mencionados avaliaram a expressão de TNF- α em fases mais iniciais da dor neuropática induzida por CCI (6 horas a 14 dias pós CCI), no presente estudo o TNF- α não estava elevado na medula nos grupos CCI no 21º dia pós indução. Diferente do tálamo contralateral a lesão onde foi visto

níveis mais elevados de TNF- α no grupo CCI em relação ao grupo SHAM.

A influência de CLN-donepezila nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 também foram investigados no presente estudo a nível medular e talâmico. Na medula, animais que receberam CLN-donepezila não apresentaram alteração dos níveis das citocinas em relação aos grupos não tratados (CCI) ou controle (SHAM). No tálamo contralateral a lesão, os níveis mais elevados de TNF- α no grupo CCI foi reduzido no grupo tratado com CLN-donepezila. E não foram vistas alterações significativas nos níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 entre os grupos.

Considerando os achados deste estudo e as informações prévias disponíveis na literatura, parece haver diferenças dependendo do período de avaliação após a indução da dor neuropática, do modelo utilizado e da região avaliada na relação do envolvimento de receptores colinérgicos, da micróglia e da expressão de citocinas na dor neuropática. Portanto, são necessários experimentos adicionais para esclarecer essa relação no efeito antialodínico do tratamento com CLN-donepezila.

8 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos concluir que o tratamento com CLN-donepezila foi eficaz em reduzir a alodínia mecânica induzida por CCI. Além disso, observou-se que CLN-donepezila não ocasionou alteração motora, reforçando que o efeito observado seja de um potencial efeito antinociceptivo da CLN-donepezila e indicando um perfil de segurança nesse aspecto. Nossa sugestão é que o mecanismo subjacente à antinocicepção da CLN-donepezila envolva os receptores nACh $\alpha 7$ e mACh M2. Embora não tenha sido observada uma alteração na expressão desses receptores a nível espinal, houve um aumento na expressão do nACh $\alpha 7$ no tálamo. Além disso, a CLN-donepezila causou uma modulação da micróglia a nível espinal, enquanto a lesão por CCI aumentou a expressão de micróglia a nível talâmico. Não é possível afirmar o perfil de ativação microglial, mas é possível que a micróglia a nível medular possa influenciar no contexto antinociceptivo da CLN-donepezila. O tratamento com CLN-donepezila também resultou em uma diminuição da expressão, induzida por CCI, de TNF- α no tálamo, o que pode estar envolvido no efeito antinociceptivo da CLN-donepezila. Esses achados sugerem uma regulação diferencial da antinocicepção promovida pela CLN-donepezila em diferentes regiões do sistema nervoso central. Por fim, podemos destacar o potencial efeito antinociceptivo da CLN-donepezila na dor neuropática, mas os resultados indicam a necessidade de mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos.

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, July 2006.
- ABBASZADEH, A. *et al.* Minocycline through attenuation of oxidative stress and inflammatory response reduces the neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [Iran], v. 21, n. 2, p.138–144, Feb. 2018.
- AKEL, H.; ISMAIL, R.; CSÓKA, I. Progress and perspectives of brain-targeting lipid-based nanosystems via the nasal route in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [Netherlands], v. 148, p. 38–53, Mar. 2020.
- AKHMETZYANOVA E. *et al.* Different Approaches to Modulation of Microglia Phenotypes After Spinal Cord Injury. **Frontiers in systems neuroscience**, [Lausanne], p. 37, Aug. 2019.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1000, p. 40–56, Mar. 2004.
- ATTAL, N1 *et al.* EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European journal of neurology**, Boulogne-Billancourt, v. 17, n. 9, p. 1113-e88, Apr. 2010.
- BAEK J. M. *et al.* Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. **Laboratory animals**, [New York], v. 44, p 440-44, Oct. 2015.
- BAGDAS D. *et al.* New Insights on Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors as Targets for Pain and Inflammation: A Focus on $\alpha 7$ nAChRs. **Current neuropharmacology**, [United Arab Emirates] v.16, p. 415-425, May 2018.
- BAGDAS D. *et al.* The antihyperalgesic effect of cytidine-5'-diphosphate-choline in neuropathic and inflammatory pain models. **Behavioural pharmacology**, [London], v. 22, p. 589–598, Sept. 2011.
- BAGDAS D. *et al.* The $\alpha 7$ nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **British journal of pharmacology**, [London], v. 173, p.2506–2520, May 2016.
- BATES, D.*et al.* A Comprehensive Algorithm for Management of Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, [Malden], v. 20: p. S2-S12, June 2019.
- BENNETT, L. *et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 113, n. 12, p.

E1738-E1746, Mar. 2016.

BENNETT GJ, XIE YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, Bethesda, v.33, p 87–107, Apr. 1988.

BISTA P, IMLACH WL. Pathological Mechanisms and Therapeutic Targets for Trigeminal Neuropathic Pain. **Medicines**, [Switzerland], v. 6: p. 91, Aug. 2019.

BLAZSÓ G, GÁBOR M. Anti-oedematous action of some H1-receptor antagonists. **Agents Actions**, [Switzerland], v.42, p.13-8, Aug.1994.

BORGES, J. P. *et al.* Modulation of pathological pain by epidermal growth factor receptor. **Frontiers in Pharmacology**, [Lausanne], v. 12, p. 642820, May 2021.

BORSOOK, D. Neurological diseases and pain. **Brain**, [London], v. 135: p. 320–344, Feb. 2012.

BOUHASSIRA D. *et al.* Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, [Netherlands], 136,p. S380–387, June 2008.

BOUZAT, C. *et al.* Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. **The Journal of physiology**, [London], v. 596, n. 10, p. 1847-1861, May 2018.

BRIDGES D., THOMPSON S.W.N., RICE A.S.C., Mechanisms of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, [England], v. 87, p.12-26, July 2001.

BUCKINGHAM S.D. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. **Pharmacological reviews**, [S.I.],v.61, p.39-61, Mar 2009

BUTOVSKY, O. *et al.* Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. **Nature neuroscience**, [United States], v. 17, n. 1, p. 131-143, Aug. 2014.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, [USA], v. 52, n. 1, p. 77-92, Oct. 2006.

CAVALLI, E. *et al.* The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, [England], v. 33, p. 2058738419838383, Mar. 2019.

CORRADI, J.; BOUZAT, C. Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery. **Molecular pharmacology**, [s.I.], v. 90, n. 3, p. 288-299, Sept. 2016.

CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, [Netherlands] v. 53, p. 55-63, July 1994.

CHEN, G. *et al.* Sex-Dependent Glial Signaling in Pathological Pain: Distinct Roles of Spinal Microglia and Astrocytes. **Neuroscience Bulletin**, Singapore, v. 34, n. 1, p. 98–108, Feb. 2018.

CHEN, S; PAN, H. Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [United States] v. 307, n. 2, p. 676-681, Nov. 2003.

CHENG, K. I. *et al.* Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pain**, United Kingdom, v. 18, n. 2, p. 162–173, Feb. 2014.

CHOI, HJ., Park, JH., Jeong, Y.J. *et al.* Donepezil ameliorates A β pathology but not tau pathology in 5xFAD mice. **Molecular Brain**, [London], v.15, p.63, July 2022.

CLAYTON, BA. *et al.* Oral donepezil reduces hypersensitivity after nerve injury by aspinal muscarinic receptor mechanism. **Anesthesiology**. [United States], v. 106(5): p. 1019- 25, May 2007.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**, [USA], v. 348, n. feb05 6, p. f7656–f7656, Feb. 2014.

COLLETIER, J.P. *et al.* Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. **The EMBO journal**, [Oxford], v. 25, n. 12, p. 2746-2756, June 2006.

COLLOCA, L. *et al.* Neuropathic pain. **Nature reviews. Disease primers**, [England], v. 3: p. 17002, Feb. 2017.

COSTA, C. *et al.* Nose-to-brain delivery of lipid-based nanosystems for epileptic seizures and anxiety crisis. **Journal of Controlled Release**, [Netherlands], v. 295, p. 187-200, Feb 2019.

COX J. J. *et al.*. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**. [England], v. 14; p.894-8, Dec. 2006.

CRAWFORD, LaTasha K.; CATERINA, Michael J. Functional anatomy of the sensory nervous system: updates from the neuroscience bench. **Toxicologic pathology**, [United States], v. 48, n. 1, p. 174-189, Jan. 2020.

DAMAJ M, *et al.* Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [United States], v.284;p.1058-6, Mar.1998

DAMAJ, M. Imad; MEYER, Edwin M.; MARTIN, Billy R. The antinociceptive effects of $\alpha 7$ nicotinic agonists in an acute pain model. **Neuropharmacology**,

[England], v. 39, n. 13, p. 2785-2791, Dec. 2000.

DE SIMONE, R. *et al.* Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. **Journal of neuroinflammation**, [London], v. 2, n. 1, p. 1-10, Jan. 2005.

DUN, A.R., RICKMAN, C. & DUNCAN, R.R. The t-SNARE Complex: A Close Up. **Cellular and molecular neurobiology**, [New York], v.30, p.1321–1326, Nov. 2010.

DWORKIN, R. H. *et al.* Advances in Neuropathic Pain. **Archives of Neurology**, [United States], v. 60, n. 11, p. 1524, Nov. 2003.

DWORKIN, R.H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: evidencebased recommendations. **Pain**, Madison, WI, USA, v.132, p.237-251, Dec. 2007.

EDDLESTON M. *et al.* Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **Lancet**, [London], v.16; p 597-607, Fev. 2008.

ELISEI, L. M. S. *et al.* Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v. 28, n. 6, p. 1537–1551, Dec. 2020.

FERRIER, J.*et al.* Cholinergic Neurotransmission in the Posterior Insular Cortex Is Altered in Preclinical Models of Neuropathic Pain: Key Role of Muscarinic M2 Receptors in Donepezil-Induced Antinociception. **Journal of Neuroscience**; [Baltimore], v. 35, p. 16418-30, Dec. 2015.

FINNERUP N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurology**. [London] v.14(2), p. 162-73, Jan. 2015.

FINNERUP, N. B.*et al.* Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**. [Netherlands], v. 157, p. 1599-1606, Aug. 2016.

FREITAS, K. *et al.* Effects of alpha 7 positive allosteric modulators in murine inflammatory and chronic neuropathic pain models. **Neuropharmacology**, [England], v. 65, p.156-164, Fev. 2013.

GAMAGE, R.*et al.* Cholinergic Modulation of Glial Function During Aging and Chronic Neuroinflammation. **Frontiers Cell Neuroscience**, [Lausanne], v. 14, p. 77912, Oct. 2020.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. **Patent** [United States], n. 5, p. 250,236, Oct. 1993.

GENZEN, J. R.; MCGEHEE, Daniel S. Short-and long-term enhancement of

excitatory transmission in the spinal cord dorsal horn by nicotinic acetylcholine receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 100, n. 11, p.6807-6812, May 2003.

GIACOBINI E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, **Pharmacological Research**, [Netherlands], v.50, p. 433-440, Oct. 2004.

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], Mar. 2017.

GOETTL V.M. *et al.* JR Reduced basal release of serotonin from the ventrobasal thalamus of the rat in a model of neuropathic pain. **Pain** [Netherlands], v.99, p. 359–66, Sept. 2002.

GONG, X. *et al.* Infant nerve injury induces delayed microglial polarization to the M1 phenotype, and exercise reduces delayed neuropathic pain by modulating microglial activity. **Neuroscience** [United States], v. 349: p. 76–86, May 2017.

GOSSELIN R. D. *et al.* Glial cells and chronic pain. **Neuroscientist**. [Baltimore], v. 16, p.519-31, June 2010.

GUI ,X. *et al.* Botulinum toxin type A promotes microglial M2 polarization and suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain through the P2X7 receptor. **Cell & bioscience**. [London], v. 10, p. 45, Mar. 2020.

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, Nov. 1990.

HAYASHIDA, K.-I. *et al.* Inhibitory M2 muscarinic receptors are upregulated in both axotomized and intact small diameter dorsal root ganglion cells after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, [United States], v. 140, n. 1, p. 259-268, June 2006.

HARAGUCHI ,Y. *et al.* Donepezil suppresses intracellular Ca²⁺ mobilization through the PI3K pathway in rodent microglia. **Journal of Neuroinflammation**, [London], v. 14, p. 258, Dec. 2017.

HELMS, J. E. ;BARONE, C. P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, [United States] v.28 , n.6, p. 38-49, Dec. 2008.

HONE AJ, MCINTOSH JM. Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. **FEBS Lett**. [England], v.592, p.1045-1062, Apr. 2018.

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], Oct. 2020.

HWANG J, HWANG H, LEE HW, SUK K. Microglia signaling as a target of donepezil. **Neuropharmacology**, [England], v. 58, p. 1122-9, June 2010.

HYLDEN JLK, WILCOX GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**. [Krakow], v. 67, p. 313–316, Oct. 1980.

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, Mar. 2022.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **IASP Terminology**. 2020. Washington, USA. Disponível em: <https://www.iasppain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>.

JACKSON S, HAM RJ, WILKINSON D. The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. **British journal of clinical pharmacology**, [England], v. 58, p. 1–8, Oct. 2004.

JÄKEL S, DIMOU L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. **Frontiers Cell Neuroscience**. [Lausanne], p. 11:24, Fev. 2017.

Jl, R. R. *et al.* MAP kinase and pain. **Brain research reviews**, Boston, v. 60, n. 1, p. 135–148, Apr. 2009.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [England], v. 413, n. 6852, p. 203-210, Sept. 2001.

KANAT O. *et al.* Preclinical evidence for the antihyperalgesic activity of CDPcholine in oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology**, [Cyprus], v.18, p.1012–1018, Oct.-Dec. 2013.

KAYE, K.; THEAKER, N. TRAMADOL; A. Position Statement of the NSW Therapeutic Assessment Group Inc. **Sydney: NSW TAG**, p. 1-15, Sept. 2001.

KHAN, A. R. *et al.* Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. **Journal of Controlled Release**, [Netherlands], v. 268, p. 364-389, Dec. 2017.

KIM, J. *et al.* Donepezil Regulates LPS and A β -Stimulated Neuroinflammation through MAPK/NLRP3 Inflammasome/STAT3 Signaling. **International journal of molecular sciences**, [Switzerland], v. 22, p 10637, Sept. 2021.

KING, J. R.; GILLEVET, T. C.; KABBANI, N. AG protein-coupled $\alpha 7$ nicotinic receptor regulates signaling and TNF- α release in microglia. **FEBS Open Bio**, [England], v. 7, n. 9, p. 1350-1361, July 2017.

KIRANGE, R. H.; CHAUDHARI, R. B. Utilizing mucoadhesive polymers for nasal drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [India], v. 8, n. 3, p. 1012–1022, Sept. 2016.

KOBIELA, K A. *et al.* Characterization of macrophage/microglial activation and effect of photobiomodulation in the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain Medicine**, [Malden], v. 18: p. 932–946, May 2017.

KRASEMANN, S. *et al.* The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. **Immunity**, [s.l.], v. 47, n. 3, p. 566-581. e9, Sept. 2017.

KRAYCHET, D. C.; CALANSANS M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [Rio de Janeiro], v.46, n.3, p.199-206, June 2006.

KREMER M. *et al.* (2016). Antidepressants and Gabapentinoids in Neuropathic Pain: Mechanistic Insights. **Neuroscience**, [United States], v.338, p183–206, Dec. 2016.

KUMMER W.; LIPS K.; PFEIL U., The epithelial cholinergic system of the air ways. **Histochemistry and cell biology**, [Berlin], v.130, p. 219, June 2008.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, Philadelphia, v. 10, n.9, p. 895–926, Sept. 2009.

LEÃO FERREIRA K. A. *et al.* Prevalence of chronic pain in a metropolitan area of a developing country: a population-based study. **Arq Neuropsiquiatr**. [Germany.], v. 74, p. 990-8, Dec. 2016.

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, July 2011.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, Springfield, v. 47, n. 2, p. 173–180, Apr. 2020.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2a Edição; São Paulo: Ed. Atheneu, 2010.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF- α and neuropathic pain—a review. **Journal of neuroinflammation**, [London], v. 7, p. 1-11, Apr. 2010.

LI, Z. *et al.* Spinal versus brain microglial and macrophage activation traits determine the differential neuroinflammatory responses and analgesic effect of minocycline in chronic neuropathic pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Netherlands], v. 58: p. 107–117, Nov. 2016.

LI X, WU G, LI M, ZHANG Z. Oleanolic acid administration alleviates neuropathic pain after a peripheral nerve injury by regulating microglia polarization-mediated neuroinflammation. **RSC advances** [Cambridge], v. 10, p. 12920-12928, Apr.

2020.

LORAM, L. C. *et al.* Intrathecal injection of an alpha seven nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates gp120-induced mechanical allodynia and spinal pro-inflammatory cytokine profiles in rats. **Brain, behavior, and immunity**, [Netherlands], v. 24, n. 6, p.959-967, Aug. 2010.

MACHELSKA H, CELIK MÖ. Recent advances in understanding neuropathic pain:glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**, [London], v. 5 p. 2743, Nov. 2016.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, [United States], v.34, p. 285-309, May 2008.

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**, [Netherlands], v. 159, Apr. 2021.

MATSUMOTO, M. *et al.* Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. **Molecular Pain**, [England], v. 3, p.1744-8069-3-41, Dec. 2007.

MAYER M., WESTBROOK GL, GUTHRIE PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**. [England], v.309(5965), p. 261-3, May 1984.

MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annual Review of Physiology**, [United States], v. 61, n. 1, p. 835-856, Mar. 1999.

MCENTIRE, D. M. *et al.* Pain transduction: A pharmacologic perspective. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, London, v. 9, n. 8, p. 1069, May 2016.

MELZACK, R.; WALL, P. D. A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. **Pain mechanisms: a new theory**, USA, v. 150, n. 3699, p. 971–979, Nov. 1965.

MESNAGE, B. *et al.* Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord. **J Comp Neurol**. [United States], v.519, p. 3139–3158, May 2011.

MIKA, J. *et al.* Importance of glial activation in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, Krakow, v. 716, n. 1–3, p. 106–119, Sept. 2013.

MIKE A, CASTRO NG, ALBUQUERQUE EX. Choline and acetylcholine have similar kinetic properties of activation and desensitization on the alpha7 nicotinic receptors in rat hippocampal neurons. **Brain Res**. [Amsterdam], v. 882(1-2), p. 155-68, Nov. 2000.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in**

Neurobiology, [England], v. 57, n. 1, p. 1–164, Jan. 1999.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 10, n. 1, p. 23–36, Jan. 2009.

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, Aug. 2014.

MOORE, R.A. *et al.* Pregabalin for acute and chronic pain in adults. **Cochrane Database. Syst. Rev**, Oxford, v. 8, n. 3, July 2009.

MOTTA, P. G. *et al.* Modulation of peripheral inflammatory pain thresholds by M1 and nicotinic receptor antagonists. **Pharmacology**, [s.l.], v. 88, n. 5-6, p. 309-315, Nov. 2011.

MOULIN D, *et al.* Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. **Pain Res Manag.** [United States], v. 19, p. 328–335, Nov. 2014.

NAGUIB M. *et al.* Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction: Implications for the Anesthesiologist. **Anesthesiology**, [United States], v. 96, p. 202–231, Jan. 2002.

NASER, P. V. ;KUNER R., Molecular, cellular and circuits basis of cholinergic modulation of pain. **Neuroscience**, [United States], v. 387: p. 135-148, Sept. 2018.

NAVE K.-A.. Myelination and support of axonal integrity by glia. **Nature**, [England], v. 468p. 244–252, Nov. 2010.

Ni HD, *et al.* Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. **J Neuroscience Research**. [Baltimore] v.94, p.50–61, Oct. 2015.

OLIVEIRA, R. M. *et al.* Comparative analysis of functional capacity among women with fibromyalgia and low back pain. **Revista Dor**, [São Paulo], v. 14, p. 39-43, Mar. 2013.

OLIVEIRA, R. *et al.* Clinicians participants of the panel of experts recommended by the Brazilian Academy of Neurology, Andrade DC. Pharmacological treatment of central neuropathic pain: consensus of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr**; [Germany], v. 78: p. 741-752, Dec. 2020.

OSSIPOV M., MORIMURA K, PORRECA F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current opinion in supportive and palliative care** . [United States], v.8(2), p.143-51, June 2014.

PACINI A. *et al.* Protective effect of alpha7 nAChR: Behavioural and morphological

features on neuropathy. **Pain**. [Netherlands]; v. 150, p. 542–549, Sept. 2010.

PAPADOPOLOU, S. *et al.* Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. **Neuroscience letters**, [Ireland], v. 361, n. 1-3, p. 32-35, May 2004.

PAPKE R.L. *et al.* The analgesic-like properties of the alpha7 nAChR silent agonist NS6740 is associated with non-conducting conformations of the receptor. **Neuropharmacology**. [England], v.91, p. 34–42, Apr. 2015.

PIOVESANA, R. *et al.* Cholinergic modulation of neuroinflammation: focus on alpha7 nicotinic receptor. **International Journal of Molecular Sciences**, [Switzerland], v. 22, n. 9, p. 4912, May 2021.

POHANKA, M. Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology. **International journal of molecular sciences**. [Switzerland], v. 13, p. 2219-2238, Feb. 2012.

RAJA, S. N. *et al.* The Revised IASP definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain**, Amsterdam, v. 161, n. 9, p. 1976, Sept. 2020.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature medicine**, [England], v. 16, n. 11, p. 1267-1276, Oct. 2010.

RIZO, J., SÜDHOF, T. Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. **Nature Reviews Neuroscience** [United States], v. 3, p. 641–653, Aug. 2002.

ROSENBERGER DC. *et al.* Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. **Journal of Neural Transmission**, Vienna, v. 127, p. 589-624, Feb. 2020.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology & toxicology** [Denmark], v. 66, p. 382-386, May 1990.

ROWLEY T.J. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of choline in a mouse model of postoperative pain. **British journal of anaesthesia**, [London]; v.105, p. 201–207, Aug. 2010.

RUAN, C.; ELYAMAN, W. A new understanding of TMEM119 as a marker of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [Lausanne], v. 16, p. 902372, June 2022.

RUSSELL, F. A. *et al.* Calcitonin gene-related peptide: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Washington, v. 94, n. 4, p. 1099, Oct. 2014.

SCHÄFERS, M. *et al.* Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. **European Journal of Neuroscience**, [France], v. 17, n. 4, p.

791-804, Fev. 2003.

SCHOLZ J, *et al.* Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroscience**. [Baltimore], v. 25(32), p. 7317-23, Aug. 2005.

SCHOLZ, J. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, [Netherlands], v. 160, n. 1, p. 53–59, Jan. 2019.

SCHOLZ, J., WOOLF, C. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, [United States], v. 10, p. 1361–1368, Oct. 2007.

SELVY M. *et al.* Analgesic and preventive effects of donepezil in animal models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Involvement of spinal muscarinic acetylcholine M2 receptors. **Biomed Pharmacother**. [France], v. 149: p. 112915, May 2022.

SHAYGAN M, BÖGER A, KRÖNER-HERWIG B. Neuropathic sensory symptoms: association with pain and psychological factors. **Neuropsychiatr Dis Treat**. [New Zealand], v.10: p. 897-906, May 2014.

SHUBAYEV, V. I.; MYERS, R. R. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. **Brain research**, [Amsterdam], v. 855, n.1, p. 83-89, Fev. 2000.

SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Current pain and headache reports**, Dundee, v. 16, p. 191-198, Fev. 2012.

SMITH, E. S. J. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of Neurology**, Cambridge, v. 265, n. 2, p. 231, Fev. 2018.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, [United States], v. 2, n. 4, p. 294-302, Apr. 2001.

SORKIN, L. S.; DOOM, C. M. Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. **Journal of the peripheral nervous system**, [United States], v. 5, n. 2, p. 96-100, Dec. 2001.

SOUZA, I. F. F. *et al.* The liquid crystalline phase behaviour of a nasal formulation modifies the brain disposition of donepezil in rats in the treatment of Alzheimer's disease. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [Netherlands], v. 203, July 2021.

STENSSON *et al.* Increased Anandamide and Decreased Pain and Depression after Exercise in Fibromyalgia. **Medicine and science in sports and exercise**, [USA], n. 8, p. 1617–1628, Jul 2020.

SUN, Rao *et al.* Spinal activation of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor

attenuates posttraumatic stress disorder-related chronic pain via suppression of glial activation. **Neuroscience**, [United States], v. 344, p. 243-254, Mar 2017.

SYROVATKINA V, ALEGRE KO, DEY R, HUANG XY. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. **Journal of Molecular Biology**. [United States], v. 428, p. 3850-68, Sept. 2016.

TALY, A. *et al.* Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. **Nature reviews. Drug discovery**, [England], p.733–750, Sept. 2009.

UDALL, M. *et al.* Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of Pain Research**. [New Zealand], v.12, p. 243-253, Jan. 2019.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 109, n. 1-2, p. 57-77, Jan. 2006.

USDIN, Ted B. *et al.* Molecular biology of the vesicular ACh transporter. **Trends in neurosciences**, [New York], v. 18, n. 5, p. 218-224, May 1995.

VALLEJO R, TILLEY DM, VOGEL L, BENYAMIN R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain** [United States], v. 10 : p. 167-84, Apr. 2010.

VANEGAS, H.; SCHIBBLE, H. G., Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in neurobiology**, [United States], v.64, p.327-363, July 2001.

VAN HECKE, O. *et al.* Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, [Netherlands], v. 155, n. 4, p. 654-662, Apr. 2014.

WAGNER, Rochelle; MYERS, Robert R. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport**, [England] v. 7, n. 18, p. 2897-2901, Nov. 1996.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: A driving force for pathological pain. **Trends in Neurosciences**, New York, v. 24, n. 8, p. 450–455, Aug. 2001.

WATSON JC, SANDRONI P. Central neuropathic pain syndromes. **Mayo Clinic proceedings** [England], v. 91: p. 372–385, Mar. 2016.

WELLS, Michael R. *et al.* Changes in plasma cytokines associated with peripheral nerve injury. **Journal of neuroimmunology**, [Amsterdam], v. 39, n. 3, p. 261-268, Aug. 1992.

WESS, J., EGLIN, R. & GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature reviews. Drug**

discovery, [England], p.721–733, Sept. 2007.

WHO - World health Organization. Pain association with neurological disorders. In:Neurological disorders: public health challenges, Geneva: WHO Press, cap.3, p.127-139, 2006.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [United States], v. 80, p. 300-307,Mar. 1944.

XU F, *et al.* Microglial polarization dynamics in dorsal spinal cord in the early stages following chronic sciatic nerve damage. **Neuroscience Letters**, [Ireland], v. 617: p. 6–13, Mar. 2016.

YAM MF, *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International journal of molecular sciences**, [Switzerland], v. 19: p. 2164,July 2018.

YANG, J. *et al.* Acetylcholine participates in pain modulation by influencing endogenous opiate peptides in rat spinal cord. **World Journal of Neuroscience**, [United States], v. 2, no. 1, p. 15-22, Jan. 2012.

YEN, Chen-Tung; LU, Pen-Li. Thalamus and pain. **Acta Anaesthesiologica Taiwanica**, [Taipei], v. 51, n. 2, p. 73-80, July 2013.

YUAN J, FEI Y. Lidocaine ameliorates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through regulating M1/M2 microglia polarization. **Open Medicine**; [s. l.],v. 17, p. 897-906, May 2022.

ZEB MW, RIAZ A, SZIGETI K. Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. **Clinical Medicine Insights: Geriatrics**; [United States], v. 10: p. 1–14, Jan. 2017.

ZHANG, H. *et al.* Reassembly of native components with donepezil to execute dual-missions in Alzheimer's disease therapy. **Journal of Controlled Release**, [Netherlands], v.296, p. 14–28, Fev. 2019.

ZHAO H, *et al.* The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: what do we know? **British journal of anaesthesia**; [England], v. 118, p. 504-516, Apr. 2017.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [Netherlands], v. 16, p. 109–110, June 1983.

ANEXO A – Certificado do Comitê de ética em pesquisa e uso animal

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE UMA NANOPARTÍCULA DA DONEPEZILA SOBRE A DOR NEUROPÁTICA VIA RECEPTORES COLINÉRGICOS ESPINHAIS EM CAMUNDONGOS**, registrada com o nº **0046/2022**, sob a responsabilidade de **Giovane Galdino de Souza**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **02/03/2023 a 03/03/2025**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / C57bl6	180	180	0	Biotério central da unifal

Alfenas, 06 de Março de 2024

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG