

Vanessa Rafaella Foletto da Silva

A MEDULA ESPINHAL MODULA A SIMETRIA DA ARTRITE INDUZIDA POR CFA EM RATOS

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis
2015

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

da Silva, Vanessa Rafaella Foletto

A medula espinhal modula a simetria da artrite induzida por CFA em ratos / Vanessa Rafaella Foletto da Silva ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC, 2015.

239 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Simetria. 3. Reflexo da raiz Dorsal. 4. Microglia. I. Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Este trabalho é dedicado aos que, de
alguma forma, são encantados com a
ciência, a pesquisa e o
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Esse projeto deve agradecer, primeiramente, aos animais que tornaram esse estudo possível, meu respeito.

A todos os professores que me auxiliaram com enorme prontidão, ao orientador Prof. Carlos Rogério Tonussi e a coordenadora Profa. Thereza Monteiro de Lima, meu muito obrigada.

Aos que caminharam comigo nessa jornada, meus amigos, esse foi somente um passo para que possamos realizar muito mais. Flora Lucena, Maíra Bicca, Débora Callado, Marcele Blauth de Oliveira, Taciane Stein, Lucas Mascarin, Elba Marina, Mariana Bottamedi, Franci Ellen Finn. Muito obrigada por dividirem as expectativas, vitórias e decepções dessa vida de gráficos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Querem que vos ensine o modo de chegar
à ciência verdadeira?
Aquilo que se sabe, saber que se sabe;
aquilo que não se sabe, saber que
não se sabe; na verdade é este o
saber”
Confúcio

RESUMO

A apresentação bilateral de sinais clínicos de uma doença sugere um envolvimento do sistema nervoso na sua fisiopatogenia. Neste estudo em ratos, a partir de um modelo animal, um estímulo pró-inflamatório de adjuvante incompleto de Freund (CFA) (250 µg de *Mycobacterium tuberculosis* e 100 µl de adjuvante), unilateral e não sistêmico na pata, conduziu ao comprometimento articular da pata contralateral homóloga após 21 dias do estímulo flogístico. Durante o desenvolvimento do quadro inflamatório foi possível observar uma inter-relação entre o aumento de volume da pata ipsilateral com o aumento da contralateral nos animais onde a lateralização ocorreu. Quanto aos mecanismos dessa simetria, a incidência da doença contralateral foi reduzida quando uma potente neurotoxina para TRPV1, a resiniferatoxina, foi administrada (760 ng) pela via intratecal, cinco dias antes do CFA. A redução da magnitude do quadro bilateral também, foi reduzida com a administração intratecal do bloqueador do co-transportador de Cl⁻ (NKCC1), a bumetanida (60 µg) 30 minutos após o CFA e diariamente por mais 4 dias. Sendo assim, ficou demonstrado haver uma participação de fibras nervosas TRPV1 positivas com envolvimento do Reflexo da Raiz Dorsal (RRD). O RRD dá origem a uma transmissão que percorre de forma antidrômica as fibras sensoriais primárias (fibras C e Aδ) e libera neuropeptídeos na periferia que são pró-inflamatórios e pró-artritogênicos com participação do NKCC1. A compreensão da passagem da informação de um hemisfério ao outro considerou a notável relação entre as células neuronais e não neuronais, que identifica as células gliais como responsivas aos sinais vindos da periferia, implicando a capacidade dessas células em intermediar um efeito contralateral. A ativação microglial, vista pelo aumento da imunorreatividade `a marcação pelo anticorpo anti- Iba-1, foi observada em ambos os hemisférios do modelo de artrite simétrica deste estudo, mas também, com a administração intratecal de Zymosan A (0,01 ou 100 ng), um ligante exógeno do receptor TLR2 que é, principalmente, encontrado em microglia. Concomitantemente, houve um aumento da incidência de

lateralização em ambos os casos. A prevenção da ocorrência da simetria foi associada ao bloqueio da ativação microglial pela administração intratecal prévia e repetida de minociclina (50 µg), o que não ocorreu com a administração intraperitoneal da mesma droga, mostrando por essa dose e via um mecanismo medular exclusivo. Um ponto de partida para especular a forma como ocorre a comunicação entre as células da microglia e as fibras TRPV1 positivas, capaz de promover a ocorrência de um processo inflamatório em articulação contralateral, foi obtido com a administração IT prévia de Fractalcina (CX3CL1) (30 ng) e TNF- α (3 ng). Ambos os tratamentos aumentaram e anteciparam o desenvolvimento de simetria associado a uma maior ativação microglial bilateral. Por consequência, considerando-se o papel da medula na etiologia de enfermidades, o tratamento de muitas doenças não se resumiria apenas na inibição da atividade neuronal aferente, mas também poderia envolver igualmente estratégias para reduzir a atividade eferente das fibras sensoriais e do estado de interação neurônio-glia. A medula espinhal não é apenas uma simples via de transmissão de uma informação sensorial da periferia para o cérebro, mas um local potencial para a modulação da resposta inflamatória durante um insulto periférico.

Palavras-chave: Simetria. Reflexo Raiz Dorsal. Microglia.

ABSTRACT

The bilateral expression of clinical signs of a disease suggests the involvement of the nervous system in its physiopathology. In the present study in rats, an animal model of joint damage with unilateral, non-systemic pro-inflammatory CFA stimulus (250 µg) on the paw showed the development of arthritis in the homologous contralateral paw after 21 days of the inflammatory stimulus. In addition, an inter-relation was found between the increased volume of the ipsilateral paw and the increase of the contralateral paw among the animals that showed lateralization. This model – which offers an ideal opportunity to study the mechanisms and develop treatment strategies of the progressions in arthritic lesions – shows a role in the symmetry of TRPV1-positive and capsaicin-sensitive nervous fibers with the involvement of the dorsal root reflex (DRR). DRR originates a transmission that runs antidromically across the primary sensory fibers (fibers C and A δ) and releases pro-inflammatory and pro-arthritisogenic neuropeptides in the periphery. The understanding of the passage of information from one hemisphere to the other considered the notable relation between neuronal and non-neuronal cells, which identifies the glial cells as responsive to the signs from the periphery, thus implying the ability these cells have to intermediate a contralateral effect. The microglial activation, noticed through the increase in immunoreactive marking by the anti-Iba-1 antibody, was observed in both hemispheres in the symmetric arthritis model in this study, but also through the intrathecal administration of Zymosan A, an exogenous ligand of the receptor TLR2 mainly found in microglia. At the same time, the incidence of lateralization increased in both cases. Symmetry prevention was associated with the blocking of the microglial activation by the prior repeated intrathecal administration of minocycline, which did not occur with the intraperitoneal administration of the same drug, thus showing an exclusive medullar mechanism through this dose and administration pathway. One starting point to speculate about how the communication takes place between the microglia cells and the TRPV1-positive and capsaicin-sensitive fibers, able to promote an inflammatory process in the contralateral joint, was obtained by

previous IT administration of Fractalkine (CX3CL1) and TNF- α . Both treatments increased and brought forward the development of symmetry associated with greater bilateral microglial activation. Consequently, given the role of the medulla in the etiology of disorders, the treatment of many diseases would not be limited to simply inhibiting the afferent neuronal activity, but could also equally involve strategies to reduce the efferent activity of the sensory fibers and of the neuron-glia interaction status. The spinal cord is not only a simple transmission path of sensory information from the periphery to the brain, but rather a potential site to modulate the inflammatory response during a peripheral injury.

Keywords: Symmetry. Dorsal Root Reflex. Microglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático dos mecanismos que comumente ocorrem nas várias fases da artrite reumatoide.	31
Figura 2: As ações da SP e CGRP que contribuem para a inflamação neurogênica e para os processos artritogênicos na periferia.	36
Figura 3: Representação esquemática do mecanismo da PAD, inibição pré-sináptica e RRD.....	45
Figura 4: Ilustração da Circuitaria do Reflexo da Raiz Dorsal.....	46
Figura 5: Desenho esquemático da despolarização do aferente primário (PAD) em um tecido inflamado.....	51
Figura 6: Possível mudança no equilíbrio de Cl ⁻ pela microglia no corno dorsal durante estados de dor patológica.....	53
Figura 7: A interação entre microglias e neurônios.	56
Figura 8: Foto ilustrativa da mensuração do volume da pata.....	68
Figura 9: Injeção Intratecal.....	73
Figura 10: Desenho experimental do protocolo de avaliação de doses crescentes de CFA unilateral.....	78
Figura 11: Efeito do <i>M. tuberculosis</i> no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral.....	79
Figura 12: Efeito do tempo no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral na dose de 250 µg de <i>M. tuberculosis</i>	81
Figura 13: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral no modelo de CFA.	83
Figura 14: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata.....	85
Figura 15: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata.....	89
Figura 16: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores direitas de ratos naive e CFA.	92
Figura 17: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores esquerdas de ratos naive e CFA.	93
Figura 18: Desenho experimental do protocolo de NMDA intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.....	96
Figura 19: Efeito da administração intratecal de NMDA no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral.....	97
Figura 20: Efeito da administração intratecal de doses crescentes de NMDA no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral. ..	99

Figura 21: Desenho experimental do protocolo de resiniferatoxina intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	102
Figura 22: Efeito da administração de resiniferatoxina intratecal nos comportamentos nocifencivos induzidos pela capsaicina na pata de ratos Wistar (fêmeas).	103
Figura 23: Efeito da administração da resiniferatoxina intratecal no aumento de volume de pata ipsi e contralateral.	105
Figura 24: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos pré-tratados com resiniferatoxina intratecal.	107
Figura 25: Desenho experimental do protocolo de bumetanida intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	110
Figura 26: Comparação dos protocolos de bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral.	111
Figura 27: Comparação dos protocolos de bumetanida intratecal no aumento de volume de pata contralateral.	112
Figura 28: Efeito da administração da bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.	114
Figura 29: Efeito da administração da bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.	116
Figura 30: Imagens de microscopia óptica de articulações da pata posterior ipsilateral e contralateral de ratos tratados com bumetanida intratecal.	118
Figura 31: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de bumetanida nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA.	120
Figura 32: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de bumetanida nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA.	121
Figura 33: Desenho experimental do protocolo de 6-ODHA intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	125
Figura 34: Efeito da administração intratecal de 6-ODHA no aumento de volume de patas em modelo de inflamação simétrica por CFA unilateral.	126
Figura 35: Desenho experimental do protocolo de zymosan intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	128

Figura 36: Efeito da administração intratecal de indutor de atividade microglial no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.....	130
Figura 37: Desenho experimental do protocolo de minociclina intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.....	132
Figura 38: Efeito da administração de minociclina intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.	133
Figura 39: Efeito da administração intratecal e intraperitoneal de minociclina no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.....	135
Figura 40: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com minociclina intratecal.	137
Figura 41: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de minociclina nos dias 0, 2 e 4 após CFA.....	138
Figura 42: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de minociclina nos dias 0, 2 e 4 após CFA.....	141
Figura 43: Desenho experimental do protocolo de fractalcina (CX3CL1) intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	144
Figura 44: Efeito da administração de fractalcina (CX3CL1) intratecal ou intravenosa no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.	145
Figura 45: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com fractalcina intratecal.	147
Figura 46: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral nos animais simétricos com fractalcina (CX3CL1) intratecal.....	148
Figura 47: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de fractalcina (CX3CL1) 24 horas antes do CFA.....	149

Figura 48: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de fractalcina (CX3CL1) 24 horas antes do CFA.....	150
Figura 49: Desenho experimental do protocolo de TNF- α intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.	152
Figura 50: Efeito da administração intratecal de TNF- α no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.	155
Figura 51: Efeito da administração de TNF- α intratecal ou intraperitoneal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.....	157
Figura 52: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral nos animais simétricos com TNF- α intratecal.	158
Figura 53: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com TNF- α intratecal 24 horas antes do CFA.	160
Figura 54: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.	161
Figura 55: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.	163
Figura 56: Imunoconteúdo de NeuN, marcador de células neuronais, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.....	165
Figura 57: Transmissão sensorial pelas fibras aferentes primárias, a sensibilização central e deflagração do Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) com envolvimento das células da microglia na simetria da artrite por CFA em ratos.....	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores dos escores histológicos de patas ipsilateral e contralateral de animais naive e CFA (n = 5 por grupo) (250 µg de <i>M. tuberculosis</i>) após 35 dias da inoculação do agente.	90
Tabela 2: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais pré-tratados (24 horas antes do CFA com resiniferatoxina intratecal.	106
Tabela 3: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral 35 dias após o CFA de animais tratados com bumetanida intratecal nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA.	117
Tabela 4: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias após CFA, de animais tratados com minociclina intratecal nos dias 0, 2 e 4 após CFA....	136
Tabela 5: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais tratados com fractalcina intratecal 24 horas antes do CFA.	146
Tabela 6: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais tratados com TNF-α intratecal 24 horas antes do CFA.....	159
Tabela 7: Resultados encontrados no estudo.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-ODHA	6-hidroxi dopamina
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
AR	Artrite Reumatoide
ATP	Adenosina Trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BSA	Albumina Soro Bovino
BUM	Bumetanida
Ca²⁺	Cálcio
CatS	Catepsina S
CD14	"Cluster" de Diferenciação de Antígeno
CDs	Células Dendríticas
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CGRP1R	Receptor 1 do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CGRP2R	Receptor 2 do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Cl⁻	Cloreto
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
COX	Cicloxigenase
CX3CL	Fractalcina
CX3CR	Receptor da Fractalcina
DRG	Glânglio da Raiz Dorsal
E_{anion}	Potencial de Reversão Aniônica
ELAM-1	Molécula de Adesão Endotelioleucocítica-1
FLS	Sinoviócitos Fibroblasto-like
FMs	Fagócitos Mononucleares
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
Iba1	"Ionized calcium binding adaptor molecule 1"
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Inibidor da Óxido Nítrico Sintase
IP	Intraperitoneal
IT	Intratecal

IV	Endovenosa
JAK-STAT	Somente Outra Quinase - Transdutores e Ativadores de Sinais de Transcrição.
K⁺	Potássio
KCC2	Co-transportador de Potássio e Cloreto
LANEN	Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mGluR	Receptor de Glutamato Metabotrópico
MINO	Minociclina
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MPCs	Fagócitos Mononucleares
NA	Noradrenalina
Na⁺	Sódio
NF-κB	Fator Nuclear - kappa B
NK1	Receptor de Neurocinina 1
NKCC1	Cotransportador de sódio, potássio e cloreto
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
PACAP	Peptídeo Relacionado com a Ativação de Adenilato Ciclase Pituitária
PAD	Despolarização do Aferente Primário
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogênicos
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Proteína Quinase C
RNA_m	Mensageiro Ácido Ribonucleico
RRD	Reflexo da Raiz Dorsal
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RTX	Resiniferatoxina
SC	Subcutâneo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator Alfa de Necrose Tumoral

TRPV1	Receptor Vanilóide de Potencial Transitório 1
VIP	Poli-peptídio Vasoativo Intestinal
WNK1	sem lisina K.
ZYM	Zymosan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	A SIMETRIA DA ARTRITE REUMATOIDE.....	25
1.2	SISTEMA IMUNE INATO NA GÊNESE DA AR.....	27
1.3	SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO COMO PROMOTOR DE ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE INATA: A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA.....	32
1.4	OS EFEITOS ARTRITOGÊNICOS DA INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA VIA NEUROPEPTÍDEOS.....	34
1.5	ESTIMULAÇÃO IPSILATERAL: ALTERAÇÕES CONTRALATERAIS.....	39
1.6	O MECANISMO DE DEFLAGRAÇÃO DO REFLEXO DA RAIZ DORSAL E A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA.....	41
1.7	MECANISMOS DESENCADEADOS PELA INFLAMAÇÃO QUE FACILITAM O REFLEXO DA RAIZ DORSAL E A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA.....	47
1.8	INTERAÇÃO ENTRE NEURÔNIOS E GLIAS.....	55
1.9	NOVAS PERSPECTIVAS.....	58
2	OBJETIVOS.....	61
2.1	OBJETIVO GERAL.....	61
2.1.1	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>61</i>
3	DESENVOLVIMENTO DA HIPÓTESE.....	63
3.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E METODOLOGIA.....	63
3.1.1	<i>Animais.....</i>	<i>63</i>
3.1.2	<i>Indução da inflamação.....</i>	<i>65</i>
3.1.3	<i>Medida indireta da inflamação.....</i>	<i>67</i>
3.1.4	<i>Medida direta da inflamação.....</i>	<i>69</i>
3.1.5	<i>Quantificação da atividade microglial.....</i>	<i>70</i>
3.1.6	<i>Administração de fármacos pela via intratecal.....</i>	<i>73</i>
3.1.7	<i>Protocolos experimentais.....</i>	<i>74</i>
3.1.8	<i>Apresentação dos dados e análises estatísticas.....</i>	<i>74</i>
4	RESULTADOS.....	77
4.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CFA INTRAPLANTAR PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA.....	77

4.2	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE NMDA PARA VERIFICAR O PAPEL DA HIPEREXCITABILIDADE NEURONAL NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA POR CFA....	94
4.3	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE RESINIFERATOXINA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DAS FIBRAS TRPV1 NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA POR CFA.	100
4.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BUMETANIDA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DO NKCC1 NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA.....	108
4.5	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE 6-ODHA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DA NORADRENALINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA.....	122
4.6	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ZYMOZAN INTRATECAL E MINOCICLINA INTRATECAL OU INTRAPERITONEAL PARA AVALIAR O PAPEL DA MICROGLIA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA.....	127
4.7	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE FRACTALCINA (CX3CL1) INTRATECAL E TNF- α INTRATECAL OU INTRAPERITONEAL PARA EVIDENCIAR POSSÍVEIS SINALIZADORES DA INTERAÇÃO NEURÔNIO E MICROGLIA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA.....	142
4.7.1	<i>Resumo dos resultados encontrados.....</i>	166
5	DISCUSSÃO.....	167
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	181
7	REFERÊNCIAS.....	185

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SIMETRIA DA ARTRITE REUMATOIDE

O espelhamento de respostas inflamatórias é frequentemente observado na clínica médica, principalmente, nas doenças artríticas, incluindo algumas artropatias infecciosas, osteoartrite generalizada, algumas doenças do tecido conjuntivo e no exemplo clássico de doença simétrica, a artrite reumatoide (AR) (ARNETT et al., 1988).

Essa característica fundamental da AR ocorre em 83 a 87% dos casos (ZANGGER; KEYSTONE; BOGOCH, 2005) e a mudança da forma assimétrica para a simétrica acontece com a evolução do quadro clínico (FLEMING; CROWN; CORBETT, 1976; JEFFERY, 2014) e inclusive, quando essa mudança acontece em menos de 1 ano do início da doença há uma predição das apresentações mais severas da patologia (FLEMING; CROWN; CORBETT, 1976; MAJITHIA; GERACI, 2007). As articulações com maior probabilidade de similitude são as das mãos e dos pés (ZANGGER; KEYSTONE; BOGOCH, 2005).

De maneira geral, observa-se que ainda não foi alcançado o perfeito entendimento da etiologia e gênese dessa doença progressiva que destrói o tecido articular, nem mesmo um alvo terapêutico mais eficiente. Contudo, essa apresentação bilateral dos sinais clínicos sugere um envolvimento do sistema nervoso na fisiopatogenia da AR. Muitas doenças, cujas manifestações sintomatológicas estão localizadas na periferia, sofrem interferências de eventos que ocorrem no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). Um evento inflamatório periférico pode aumentar a atividade das fibras aferentes primárias que através da liberação de neuropeptídeos na periferia e na medula espinhal (REES et al., 1994; SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995; WILLIS JR., 1999) influenciam o início e a progressão de doenças e, talvez, determinam a ineficiência e/ou resistência a certas terapias (COSTIGAN et al., 2009).

No final da década de 80 e durante a década de 90, a hipótese de envolvimento do sistema nervoso na simetria da AR era algo muito relevante nas abordagens investigativas do tema. Mais detalhes: (BILEVICIUTE; THEODORSSON; LUNDEBERG, 1996;

BILEVICIUTE et al., 1993; DECARIS et al., 1999; DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; KIDD et al., 1989, 1995; LEVINE et al., 1986a; MAPP et al., 1993; REES et al., 1994, 1996). Todavia, mesmo sendo muito razoável para os neurobiólogos, essa teoria era pouco apreciada pelos reumatologistas da época que trataram, inclusive, com ceticismo evidências tais quais: (i) as articulações do lado paralítico de pacientes hemiplégicos que, posteriormente, desenvolvem AR são poupadas do processo inflamatório degenerativo (HAMILTON, 1983); e (ii) o início e exacerbação da doença são, muitas vezes, precedido por trauma psicológico (BAKER, 1982). Tal desinteresse, muito provavelmente, ocorreu devido ao avanço na área de biomarcadores e o desenvolvimento de ferramentas biológicas de quantificação de moléculas nas doenças reumáticas (GOËB et al., 2014) que estimularam as pesquisas com o objetivo de nomear “A Molécula” fundamental da AR, ignorando o sinergismo entre os fatores envolvidos e a complexidade dessa patologia, posto que, múltiplos elementos parecem contribuir para o seu desenvolvimento (MÜLLER-LADNER et al., 2005).

De qualquer forma, mesmo não contemplando o entendimento da simetria e com o foco nas alterações da imunidade adaptativa, veremos, na próxima seção com mais detalhes, que as propostas consideradas importantes até o momento para a patofisiologia da AR concordam em revelar que o desencadeamento da enfermidade ocorre pela ativação do sistema imune inato. Essa ativação promove a primeira mudança no revestimento sinovial para qualquer ação imune que se segue ou perpetue, em resposta a um antígeno e/ou um autoanticorpo, ou seja, para o sistema imune adaptativo com ou sem eventos predeterminantes (“*background*” genético).

Em seguida, vislumbraremos a forma pela qual o sistema nervoso, através da medula espinhal, poderia ser capaz dessa ativação do sistema imune inato em articulação contralateral homóloga, concomitantemente, evidenciaremos os possíveis circuitos neuronais e células da medula espinhal que estariam envolvidos nesse processo de espelhamento.

1.2 SISTEMA IMUNE INATO NA GÊNESE DA AR

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Seus mecanismos, de elevada complexidade, envolvem diversos componentes articulados que convergem para a elaboração da resposta imune adaptativa, sendo possível destacar algumas etapas, como: reconhecimento molecular dos agentes agressores, ativação de vias bioquímicas intracelulares que resultam em modificações vasculares e teciduais, produção de uma variedade de mediadores com efeitos locais e sistêmicos no âmbito da ativação e proliferação celular, síntese de novos produtos envolvidos na quimioatração e migração de células especializadas na destruição e remoção do agente agressor e, finalmente, quando auto-limitante, a recuperação tecidual com o restabelecimento funcional do tecido ou do órgão (TURVEY; BROIDE, 2010).

A ativação desses mecanismos dependem de estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em um elemento considerado invasor e não nos elementos próprios da espécie (UEMATSU; AKIRA, 2008). Logo, o reconhecimento do “perigo” é o primeiro passo para o desencadeamento de “ações eliminadoras”, pois, sem isso, não é observada qualquer alteração na homeostasia.

Na AR, propõe-se que essa deformidade articular pode ser desencadeada por agentes infecciosos (EBRINGER; WILSON, 2000; SILMAN; PEARSON, 2002; TOIVANEN, 2001). Nesse aspecto, o produto da invasão ao organismo seria a **ativação do sistema imune inato** por ligação do invasor aos Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), como os receptores Toll-like (TLRs) (ARMANT; FENTON, 2002) ou CD14 (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002) e, subsequentemente, a presença de uma resposta mediada por células T, polarizadas em T_H1 ou T_H2 (SMOLEN; STEINER, 2003). A polaridade de células T é decisiva para o tipo de ativação de células B com produção de anticorpos (SMOLEN; STEINER, 2003), sendo ambas as células importantes para o desenvolvimento da AR.

Mas, também, é importante conceituar que a AR é considerada uma doença autoimune (SMOLEN; STEINER, 2001) com a participação de vários tipos de autoanticorpos (STEINER; SMOLEN, 2002). Todavia, o papel dos autoantígenos é desconhecido, se são capazes de iniciarem a cascata de ativação das células T e as consequentes alterações inflamatórias ou se intervêm em um momento posterior para reforçar e/ou perpetuar o **processo inflamatório inato prévio**.

Não mesmo importante, ressalta-se, também, a base poligênica da AR (MACKAY et al., 2002), embora a importância dos genes envolvidos ainda não tenha sido definida claramente. A presença de uma forte influência genética como fator para o aparecimento da doença é limitada apenas a alguns pacientes (PICASCIA et al., 2015); logo, outros mecanismos não-genéticos estão ativos. Mesmo assim, presume-se que, num hospedeiro geneticamente predisposto, as células T são ativadas pelo antígeno artritogênico (VAN EDEN et al., 1985) em conjunto com sinais coestimuladores e em um ambiente de citocinas apropriado (PICASCIA et al., 2015). Em paralelo, esse antígeno envolve também a **ativação da resposta imune inata**, tal como a ativação de células dendríticas (CDs) através dos TLRs (expressos em células sinoviais), pelo material exógeno ou por uma combinação de tais estímulos externos com antígenos autólogos (FRITSCH et al., 2002; SCHELLEKENS et al., 1998), antes ou em conjunto ao envolvimento das células T.

Uma vez que o sistema imune inato está ativo, independentemente da forma como se ativou, inicia-se uma migração de células para a membrana sinovial, a qual reveste as articulações e, por contato célula-célula (ISLER et al., 1993; MCINNES et al., 1997) e/ou pela ação de diferentes citocinas mais monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais ou sinoviócitos tipo B (BOMBARA et al., 1993; CROWSTON et al., 1997; JOVANOVIC et al., 1998; STOUT, 1993) se ativam como em um ciclo. Os macrófagos e fibroblastos em conjunto com outras células (MÜLLER-LADNER et al., 2005), em seguida, iniciam a produção de citocinas proinflamatórias - principalmente o TNF- α , IL-1 β e IL-6, que parecem constituir o evento central para evolução `a inflamação crônica (FIRESTEIN; ALVARO-GRACIA; MAKI, 1990; SAXNE et al., 1988a). Vale registrar que muitos indicam o TNF como o

desencadeador da cascata pró-inflamatória (DINARELLO, 1986) e que, dos numerosos tipos de células que estão envolvidos na AR, os fibroblastos ou sinoviócitos tipo B seriam fundamentais na gênese da destruição da articulação em cooperação com outras células mesenquimais e imunocompetentes (MÜLLER-LADNER et al., 2005).

Concomitantemente, além das citadas, muitas outras citocinas e quimiocinas estão envolvidas na patogênese da AR, incluindo IL-15 e IL-18 (LIEW; MCINNES, 2002) e fatores angiogênicos (TAK; KALDEN, 2011).

Por conseguinte, todas essas moléculas solúveis, resultantes do aumento da atividade celular, uma vez acopladas aos seus receptores, desencadeiam a transdução de sinais em diferentes cascatas, como a MAPK (WESTON; DAVIS, 2002), NF-κB (KARIN; LIN, 2002) ou as vias JAK/STAT (GUO et al., 1998), que levam à ativação de fatores de transcrição e a indução subsequente de produtos que irão mediar a inflamação e a degradação do tecido através, por exemplo, da ativação de osteoclastos (DAS et al., 2014). Entre esses produtos estão diferentes citocinas, quimiocinas e enzimas, tais como, as metaloproteinases de matriz (MMPs) e, também, as moléculas de superfície celular que aumentam a ativação das células e as interações célula- célula, como as moléculas coestimuladoras e de adesão (STEINER; SMOLEN, 2002).

As selectinas, integrinas e os seus homólogos medeiam a rolagem celular, adesão e migração em focos inflamatórios, através de células endoteliais e outras interações intercelulares importantes (WEBER, 2003) e, por isso, fundamentais para a geração da resposta inflamatória.

Esse processo inflamatório, neste momento, estabelecido pelo conjunto de ações de origem vascular e celular, resultará em sintomas muito heterogêneos, o que obriga a AR a ser definida por uma série de critérios clínicos (ALETAHA et al., 2010), com ênfase no edema, por ser esse o responsável pela rigidez da articulação e a perda da mecânica normal (KHURANA; BERNEY, 2005).

Isso posto, seria adequado denominar a AR como uma síndrome de prováveis causas distintas, mas de sinalizações e caminhos efetores convergentes, envolvendo células da membrana sinovial reumatoide; cujo ponto inicial comum, conforme

demonstrado pelas principais teorias etiológicas é a **ativação da resposta imune inata** e das células T e B, conduzindo a eventos fisiopatológicos que culminarão na destruição progressiva e irreversível da articulação pelo *pannus*, a neoformação tecidual a partir da membrana sinovial que repleta de células e mediadores inflamatórios invade as estruturas adjacentes. Em paralelo, locais extra-articulares, também, participam, uma vez que células dendríticas (CDs) e fagócitos mononucleares (FMs) migram para os gânglios linfáticos, onde células T tendem para um fenótipo T_H1 (FIRESTEIN, 2003) (Figura 1).

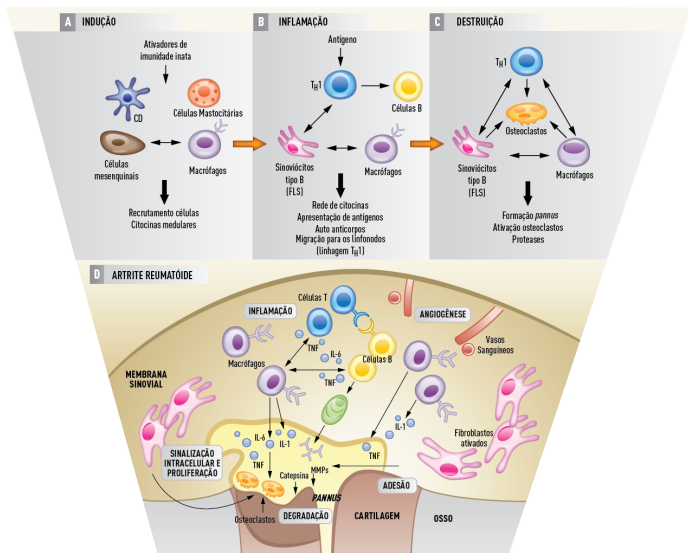


Figura 1: Diagrama esquemático dos mecanismos que comumente ocorrem nas várias fases da artrite reumatoide.

A. Uma progressão gradual pode começar com a ativação da imunidade inata, estimulando células dendríticas, macrófagos, fibroblastos e mastócitos. **B.** Posteriormente, as células imunes migram para a membrana sinovial e uma oportunidade para a resposta imune adaptativa surge em indivíduos com ou sem a predisposição genética apropriada. Embora a apresentação do antígeno possa ocorrer em membranas sinoviais, sítios extra-articulares também participam quando células dendríticas e células T de polarização para um fenótipo T_H1 migrarem para os gânglios linfáticos. **C.** Na fase destrutiva da doença, a ativação dos osteoclastos medeia abundante reabsorção óssea sob a influência de cascatas pró-inflamatórias, enquanto sinoviócitos invadem a cartilagem. Esses processos entretanto, não são, necessariamente, sequenciais, pois a ativação da imunidade inata e adaptativa podem ocorrer em paralelo (designado pelas setas bidirecionais), talvez, contribuindo para os padrões de erupções da doença ou remissão. **D.** Dessa forma, o quadro reumatoide artrítico se estabelece, com presença dos fatores de sinalização intracelular, resultando em proliferação, adesão, inflamação, angiogênese e degradação. CDs, células dendríticas; FLS, sinoviócitos fibroblasto-like; MMPs, metaloproteínases; TNF, fator de necrose tumoral; IL, interleucina. Fonte: autoria própria com adaptação de (FIRESTEIN, 2003).

Essa participação primordial do sistema imune inato na patogenia da AR, pode ser constatada, de forma efetiva, na clínica, uma vez que o primeiro sintoma que denomina a AR é uma sinovite, a inflamação da membrana sinovial. Entretanto, para ser caracterizada como sinal de AR deve apresentar-se de forma persistente (> 3 meses), o que ocorre em 50% das sinovites em geral (FILER et al., 2011), sem conhecimento dos fatores responsáveis por esse prolongamento do cenário inflamatório.

Na biopsia, essa sinovite em fase inicial ou pré-clínica (até 3 meses) da doença é visualizada como uma sinovite de padrão anormal com alargamento da camada íntima da membrana sinovial, aumento da permeabilidade vascular e influxo de células inflamatórias, ao invés, de onde antes, havia uma fina camada de espessura entre 1 a 3 células (10 a 30 μm) (TIWARI et al., 2010) e com presença de sinoviócitos do tipo A (derivados de macrófagos) e tipo B (derivados de fibroblastos) produzindo moléculas da matriz extracelular e mediando a produção e liberação do líquido sinovial (TIWARI et al., 2010). Em contrapartida, a subíntima, com sua rede de colágeno solto contendo fibroblastos, adipócitos, macrófagos, elastina, mastócitos e vasos sanguíneos (D. SMITH, 2011), permanece com padrão vascular normal e nenhum aumento de celularidade, ao menos, inicialmente (HITCHON, 2011).

1.3 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO COMO PROMOTOR DE ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE INATA: A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA

Conforme o que foi enfatizado e supracitado, o sistema nervoso, dotado de um repertório de respostas elaboradas, é capaz de desencadear ou perpetuar a ativação do sistema imune inato em um tecido articular, através da denominada inflamação neurogênica. Essa inflamação, obviamente, de origem neuronal, ocorre a partir de peptídeos vasoativos liberados em consequência de um potencial de ação em terminais periféricos de fibras nervosas sensoriais peptidérgicas, tal como a ativação do receptor vaniloide de potencial transitório 1 (TRPV1) em subtipos de fibras C e A δ (GROETZNER; WEIDNER, 2010; LEIS et al., 2004; LIN; ZOU; WILLIS, 2000).

Esses neuropeptídeos liberados pelos neurônios, por sua vez, rapidamente, ativam seus receptores presentes em células do sistema vascular, imunológico e nos próprios neurônios. Os tipos diferentes de células passam, então, a liberar substâncias, em sua maioria, proinflamatórias, criando um ambiente inflamatório substancial (GEPPETTI et al., 2008).

O início de todo esse processo ocorre pelas ações vasodilatadoras e de aumento da permeabilidade nas células endoteliais, principalmente, pela Substância P (SP) via receptor NK1 vascular (BAGUNA; SALO; ROMERO, 1989) envolvendo, também, a produção de óxido nítrico (NO) (WEIDNER et al., 2000) e/ou por mecanismo indireto com degranulação de mastócitos e liberação de histamina (MEYER et al., 2006; SUZUKI et al., 1995).

A liberação de SP provoca a coliberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) ou, adicionalmente, mais SP (WALLENGREN; HÅKANSON, 1987). O CGRP, por sua vez, promove uma intensa vasodilatação porém mais lenta, progressiva e de maior duração comparada a SP (SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997), através da ação em receptores específicos acoplados à proteína G (CGRP1R e CGRP2R) (AIYAR et al., 1996; LUEBKE et al., 1996; NAGHASHPOUR, 1997), mediante mecanismos tanto dependentes quanto independentes de NO (BULL et al., 1996; GOLDSMITH et al., 1996; RALEVIC et al., 1992; WEIDNER et al., 2000). A habilidade do CGRP para liberar histamina de mastócitos é fraca ou mesmo nula (HUTTUNEN et al., 1996; WEIDNER et al., 2000), no entanto, potencializa a formação de edema induzida por IL-1 e IL-8 (TERENZI et al., 2013) e aumenta a expressão e síntese de IL-8 em células endoteliais (ANSEL et al., 1997).

Os outros peptídeos, de origem neuronal, que também são relatados por influenciar a homeostasia da célula endotelial são a neurocinina A que pode mediar permeabilidade venular, bem como o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e o péptido relacionado com a ativação de adenilato ciclase pituitária (PACAP) que desempenham um papel vasodilatador (HOLZER, 1998).

A partir desse primeiro e importante efeito em célula endotelial, plasma e vários mediadores são agora capazes de extravasarem para os tecidos, assim como a migração de células imunes é favorecida pelo aumento da expressão de moléculas de

adesão, novamente, pela ação da SP e CGRP (CAPPUGI et al., 1990; HSIEH; LIN, 1999; LAMBERT et al., 1998; NAKAGAWA; IWAMOTO; YOSHIDA, 1993).

Em relação às fibras nervosas sensoriais, as diversas citocinas liberadas nesse contexto podem ativar os receptores expressos nessas células nervosas mudando, por consequência, as correntes iônicas, os sistemas de segundos mensageiros e a excitabilidade e, num efeito cíclico, os neurônios passam a liberar, mais facilmente, neurotransmissores e neuropeptídeos (SCHAIBLE, 2014).

os neuropeptídeos promovem, ainda, efeitos artrítogênicos importantes, desencadeados, principalmente e novamente, por SP e CGRP (WAYNE MARSHALL; CHIU; INMAN, 1990), inclusive, efeitos específicos ao processo artrítico da AR (WEIDNER et al., 2000).

1.4 OS EFEITOS ARTRITOGÊNICOS DA INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA VIA NEUROPEPTÍDEOS

Os estudos *in vitro* demonstram que a SP possui ação proliferativa e estimuladora de sinoviócitos tipo B para produzirem collagenases (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987) - um destruidor de tecido conectivo, e a liberarem prostaglandina E₂ (PGE₂) e outras citocinas que são quimiotáticas para monócitos e linfócitos (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987; NICOLETTI et al., 2012). Além do mais, a SP promove o aumento da proliferação e função das células T (MITSUHASHI et al., 1992), ativa a produção de citocinas pelos mastócitos (JEURISSEN et al., 1994) e induz angiogênese (SEEGERS, 2003).

A partir das ações descritas para a SP e CGRP tanto para a inflamação inata quanto para o papel artrítogênico, a figura 2, a seguir, demonstra, de forma resumida, o cenário possível dos efeitos iniciais desses neuropeptídeos em células endoteliais, imune e nervosa quando liberados em resposta a estimulação da fibra peptidérgica.

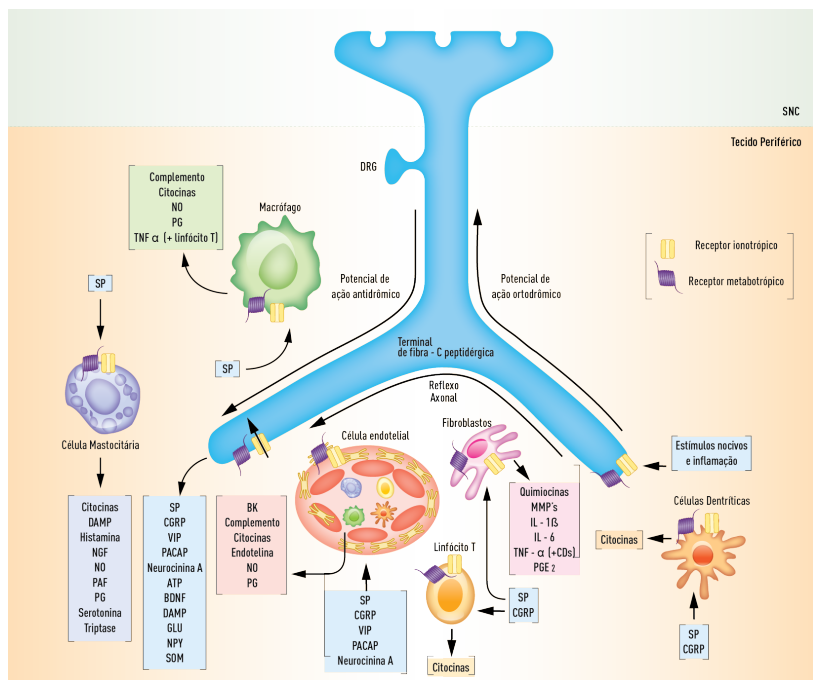


Figura 2: As ações da SP e CGRP que contribuem para a inflamação neurogênica e para os processos artritogênicos na periferia.

A inflamação neurogênica na periferia é iniciada pela atividade neuronal gerada por uma ampla gama de estímulos altamente específicos (ativação de TRPV1, p. ex.) e por estímulos menos específicos (lesão traumática, p. ex.). Isso resulta na geração de potenciais de ação ortodríomicos que conduzem informações para o SNC, bem como potenciais de ação antidríomicos em pontos de ramificação que são conduzidos em direção aos terminais periféricos para induzir a inflamação neurogênica. Os efeitos da liberação de neurotransmissores e, principalmente, neuropeptídeos das terminações nervosas periféricas (caixa azul) afetam rapidamente vários tipos de células, incluindo as células endoteliais vasculares, mastócitos, macrófagos e outras células do sistema imune (não demonstrado) e sinoviócitos tipo B. As células T e as células dendríticas, também podem ser recrutadas. Os diferentes tipos de células começam a liberar substâncias (demonstrado em caixas), criando o "meio inflamatório" substancial. As células imunes, plasma e vários mediadores também podem extravasar para os tecidos (não demonstrado). As fibras nervosas sensoriais tornam-se sensibilizadas e diminuem o seu limiar contribuindo ainda mais para a

liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos. As substâncias pro e anti-inflamatórias e moléculas de sinalização que estão presentes (mostradas nas caixas a partir de várias fontes celulares) ligam-se a receptores sobre as diferentes células e modulam as funções. As sinalização para os centros do SNC de ordem superior (não demonstrado) podem também atenuar ou agravar a inflamação neurogênica periférica. BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; BK, bradicinina; CGRP, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; DAMP, padrões moleculares associados a perigo; DRG, gânglio da raiz dorsal; Glu, glutamato; NGF, fator de crescimento neuronal; NO, óxido nítrico; NPY, neuropeptídeo Y; PAF, fator ativador de plaquetas; PG, prostaglandina; SOM, somatostatina; SP, substância P. Fonte: adaptação de (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

Essas taquicininas ou neuropeptídeos da mesma forma que na periferia, também, são liberadas centralmente e participam no corno dorsal da medula espinhal modulando o SNC (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; CUELLO et al., 1993; NOGUCHI; RUDA, 1992; SCULPTOREANU; ARTIM; DE GROAT, 2009). A SP é uma mediadora chave de "*wind up*", aumento da atividade dos neurônios e alargamento dos seus campos receptivos (DE FELIPE et al., 1998), promovendo, assim, sensibilização neuronal, segundo a definição de sensibilização como um processo celular de aumento de excitabilidade (SANDKÜHLER, 2007). Dessa forma, novamente, ocorre uma facilitação da liberação de neurotransmissores na periferia, pois a sensibilização central contribui para o aumento do disparo de fibras (SCHAIBLE, 2014).

Pertinentemente, a inervação da membrana sinovial em ratos e humanos é marcada pela presença de fibras nervosas SP-positivas e CGRP-positivas na camada íntima e/ou subíntima, principalmente, ao redor dos vasos sanguíneos (IWASAKI; INOUE; HUKUDA, 1995; SAXLER et al., 2007). Além disso, as fibras SP-positivas estão presentes na medula óssea, algumas das quais em comunicação com a membrana sinovial. E ao redor dessas fibras, em estreita relação, estão as células mastocitárias (IWASAKI; INOUE; HUKUDA, 1995).

A presença de fibras SP e CGRP-positivas no tecido articular normal sugere fortemente que esses neuropeptídeos poderiam ser lançados na articulação doente causando efeitos benéficos à gênese de processos articulares inflamatórios crônicos, como a AR. Todavia, essa arquitetura na disposição da inervação da membrana sinovial e os efeitos desses neuropeptídeos na periferia e centralmente seriam de pouca significância nos mecanismos implícitos dessas doenças articulares inflamatórias crônicas, caso não houvesse o aumento da expressão desses mediadores inflamatórios nas artrites ou se o neuropeptídeo exógeno não fosse capaz de induzir efeitos pró-inflamatórios nas articulações.

Entretanto, e como presumível, é visto que ocorre o aumento de SP e CGRP nas articulações de pacientes com AR (HERNANZ et al., 1993; MARABINI et al., 1991; WAYNE MARSHALL; CHIU; INMAN, 1990) e em modelo de artrite induzida por adjuvante (BULLING et al., 2001; GARRETT et al., 1995), com alterações, inclusive, na expressão de NK1 (KAR; REES; QUIRION, 1994). A administração de

SP, em articulação sadia, promove vasodilatação e aumento de permeabilidade (FERRELL; LOCKHART; KARIMIAN, 1997), contribui para a hipóxia da sinóvia e estimula angiogênese (SEEGERS, 2003). Mais recentemente, alguns estudos voltaram a relatar a importância dos neuropeptídeos SP e CGRP no desenvolvimento e manutenção das artrites, tanto em humanos como em animais (BULLING et al., 2001; KEEBLE; BRAIN, 2004).

Contudo, além dessas fibras sensoriais e seus neuropeptídeos promoverem inflamação neurogênica, efeitos artritogênicos, sensibilização periférica (BURGESS; PERL, 1973) e central (HERRERO, 2000) no lado do insulto inflamatório, existem achados instigantes de alterações periféricas (DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995) e centrais (MAPP et al., 1993) no lado contralateral, por exemplo, de uma monoartrite experimental.

1.5 ESTIMULAÇÃO IPSILATERAL: ALTERAÇÕES CONTRALATERAIS

Especificamente, com estímulo inflamatório experimental unilateral, os aferentes primários contralaterais homólogos apresentam um aumento nos níveis de RNA_m e das próprias proteínas SP e CGRP (BILEVICIUTE et al., 1993; DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; MAPP et al., 1993). Por consequência, aos efeitos desses neuropeptídeos, a permeabilidade, infiltrado inflamatório, extravasamento plasmático e padrão de disparo das fibras nociceptivas também são alterados, contralateralmente (DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; KELLY; DUNHAM; DONALDSON, 2007; KIDD et al., 1995). Essa consequente degeneração articular na contralateral pode ser inibida por antagonista NK1 (DECARIS et al., 1999). A injeção ipsilateral de peptídeos pró-inflamatórios conduzem a mudanças na síntese contralateral de neuropeptídeo (AMANN et al., 1996) e no edema (BILEVICIUTE et al., 1998).

De forma coerente, essas alterações contralaterais relacionadas aos neurônios são dependentes de inervação sensorial intacta. A denervação sensorial pela axotomia (COURTRIGHT; KUZELL, 1965) ou lesão química sistêmica com capsaicina (JANCSÓ; KIRALY; JANCSÓ-GÁBOR, 1977; LEVINE et al., 1986b) atenuou, em modelo

experimental, os danos na articulação, o edema e a hiperalgesia, contralateralmente. Além dessa dependência de uma inervação sadia, é pressuposto que exista uma dependência de mecanismos locais, específicos e adequados para essas alterações contralaterais, pois o processo de síntese, regulação e liberação dos neuropeptídeos é controlado através, apenas, do próprio gânglio de cada fibra peptidérgica nociceptiva (CASTRO-LOPES et al., 1994a, 1994b; JI et al., 1994; LESLIE et al., 1995; SCHÄFER et al., 1993) comprovadamente, na medula espinhal as quantidades de SP e CGRP estão aumentadas somente na altura de L4, e não L3 em modelo de artrite na pata ou joelho (MAPP et al., 1993; MINAMI et al., 1989).

A vista disso, essa influência neurogênica na patogênese de uma artrite parece ser resultante de uma ação medular local e não sistêmica e, mais ainda não podendo ser atribuída somente a um reflexo axonal regional de fibras sensoriais na periferia (HAGAINS et al., 2010). O reflexo axonal resulta de um impulso induzido por um estímulo ortodrômico em um ramo de um nervo periférico para o seu ponto de divisão, onde se produz um impulso antidrômico no ramo adjacente liberando os mediadores inflamatórios nas imediações do campo desse ramo (HAGAINS et al., 2010). Dessa forma, esse mecanismo não seria capaz de provocar alterações em articulações contralaterais homólogas.

Nesse ponto, vale introduzir que a transmissão de uma informação sensorial não ocorre somente da periferia para o SNC através da medula espinhal, mas que sob algumas circunstâncias patológicas (BURKE, 2006; CASEY; OAKLEY, 1972; KELLY; DUNHAM; DONALDSON, 2007; REES et al., 1996) ou fisiológicas (BARRON; MATTHEWS, 1935; BROOKS; KOIZUMI, 1956; ECCLES; KOZAK; MAGNI, 1961; TEN BRUGGENCATE; LUX; LIEBL, 1974; TOENNIES, 1939) e, inclusive, durante a locomoção (LIN; FU, 1998), a transmissão pode ser registrada emergindo da medula espinhal através das raízes dorsais, ou seja, percorrendo de forma antidrômica as fibras sensoriais primárias (fibras C e A δ) e, mais ainda, em algumas circunstâncias de forma **BILATERAL** como registrado em modelo de CFA (DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; KELLY; DUNHAM; DONALDSON, 2007; KIDD et al., 1995).

1.6 O MECANISMO DE DEFLAGRAÇÃO DO REFLEXO DA RAIZ DORSAL E A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA

Essa descarga direta para trás, vista, primeiramente, por Gotch e Horsley em 1891, tem sido alvo de investigações, sendo relatada como Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) (BARRON; MATTHEWS, 1935). Esse reflexo de origem medular modula a inflamação, pois assim como o reflexo axonal, libera os peptídeos vasoativos nos tecidos periféricos (AVERBECK; REEH; MICHAELIS, 2001; CHOPRA et al., 2000; SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995).

Quanto ao mecanismo anatomofisiológico para a deflagração do RRD, necessariamente, deve haver uma despolarização das fibras aferentes nociceptivas a partir da medula espinhal, denominada PAD (*“primary afferent depolarization”*). A PAD, por sua vez, ocorre quando um impulso ortodrômico (da periferia para a medula) em uma fibra aferente primária despolariza o terminal central de outra fibra aferente através de um interneurônio GABAérgico com ligação axo-axônica pré-sináptica (WILLIS JR., 1999). Essa despolarização do terminal central pelo neurotransmissor GABA é possível pois, a ligação do GABA no receptor GABA_A induz um efluxo de cloreto (Cl⁻) através da abertura do canal iônico associado, favorecendo o potencial de ação e não a hiperpolarização que, comumente, ocorre pelo influxo de Cl⁻ por esse canal. Esse efluxo é resultante de um padrão de expressão dos transportadores de Cl⁻ nos aferentes primários que é diferente dos demais neurônios centrais.

No corno dorsal da medula espinhal, os aferentes primários expressam, em níveis elevados, um **cotransportador** de sódio / potássio / cloreto (Na⁺ - K⁺ - Cl⁻), o NKCC1 (BLAESSE et al., 2009). O NKCC1 carrega dois íons Cl⁻, um Na⁺ e um K⁺ através da membrana celular para dentro do citoplasma utilizando a energia do gradiente de Na⁺ pela bomba de Na⁺- K⁺-ATPase (ALVAREZ-LEEFMANS et al., 2001). Em contrapartida, o KCC2 que cotransporta Cl⁻ e K⁺ para fora do citoplasma é expresso em níveis baixos ou, em alguns casos, completamente ausente (KANAKA et al., 2001; PRICE; HARGREAVES; CERVERO, 2006). Uma vez que NKCC1 transporta íons Cl⁻ do espaço extracelular para o citoplasma (BLAESSE et al., 2009) e a expressão do extrator para o meio externo é baixa ou nula,

a concentração de Cl^- intracelular ($[\text{Cl}^-]_i$) em neurônios sensoriais primários permanece acima do equilíbrio eletroquímico (SCHERRER et al., 2009) e, assim, com os efeitos excitatórios da atividade do receptor GABA_A nestes neurônios (ALVAREZ-LEEFMANS et al., 2001; PRICE; HARGREAVES; CERVERO, 2006; SUNG et al., 2000). Essa corrente de Cl^- para fora, mediada pelo GABA, devido o gradiente de concentração, está ausente em ratos *knockout* NKCC1 (SUNG et al., 2000).

Contudo, a PAD, mesmo causando uma despolarização, é, normalmente, um evento inibitório quando a sua magnitude é “normal”, pois promove uma despolarização somente do terminal central do aferente primário. Por consequência, há uma redução da amplitude dos potenciais de ação que invadem os terminais pré-sinápticos por encontrarem canais de Na^+ e de cálcio (Ca^{2+}) já inativados. A redução do tamanho do potencial de ação pré-sináptico resulta em um menor influxo de íons Ca^{2+} para dentro do terminal pré-sináptico e, assim, diminui a quantidade de neurotransmissor a ser liberado na sinapse entre o terminal aferente primário e o neurônio de segunda ordem, caracterizando uma inibição pré-sináptica (Figura 3 B). Revisado por: (CERVERO; LAIRD; GARCÍA-NICAS, 2003; WILLIS JR., 1999; WILLIS, 2006).

A inibição pré-sináptica estaria impedindo que os *inputs* fracos excitem os neurônios de segunda ordem e uma vez que, apenas os *inputs* mais potentes poderiam excitar os neurônios de segunda ordem esse mecanismo estaria eliminando o ruído e aumentando o contraste sensorial (BURKE, 2006). A inibição pré-sináptica do influxo aferente é uma das formas mais poderosas de inibição sendo mais potente do que a inibição pós-sináptica no bloqueio de informações a partir de uma variedade de fibras aferentes e, está difundido ao longo de toda medula espinal (BURKE, 2006). Essa supressão na entrada de algumas das informações sensoriais, teoricamente, maximiza a capacidade de processamento intrínseco.

Todavia, quando a magnitude da PAD é aumentada, há uma superação da inibição pré-sináptica e o RRD ocorre, bem como uma hiperatividade dos neurônios de segunda ordem na medula espinal (Figura 3 C).

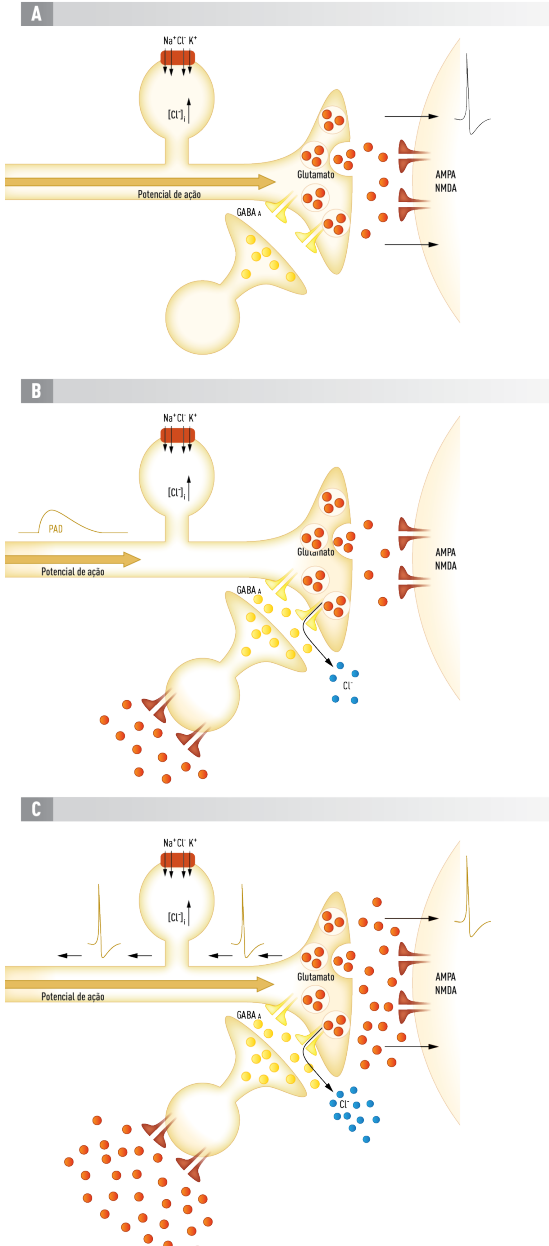


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo da PAD, inibição pré-sináptica e RRD.

(A) Sem liberação interneuronal de GABA, potenciais de ação são transmitidos ao longo da fibra aferente. (B) A partir de uma despolarização de interneurônios gabaérgicos de sinapse axo-axônica com aferentes primários ocorre a liberação de GABA, o neurotransmissor se liga aos receptores GABA_A permitindo abertura do canal iônico acoplado ao seu receptor e o fluxo de Cl⁻ é dirigido para o exterior da célula devido ao acúmulo de Cl⁻ no meio interno dependente do cotransportador NKCC1 e, assim, uma ligeira despolarização de baixa intensidade ocorre. Por conseguinte, um impulso aferente ortodrômico ao ascender irá encontrar um terminal em despolarização sublimiar inviabilizando a transmissão nociceptiva para a fibra pós-sináptica, ou seja, ocorre uma inibição pré-sináptica. (C) Sob condições específicas, a PAD é intensificada a ponto de propagar potenciais de ação de forma bidirecional. Fonte: autoria própria.

Além da participação do GABA, sugere-se o envolvimento de aminoácidos excitatórios na PAD. Um exemplo é o bloqueio da PAD observado com o antagonista do receptor glutamatérgico não-NMDA (não- N-metil-D-aspartato), o CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) (EVANS; LONG, 1989; HACKMAN; DAVIDOFF, 1991). Nesse caso, as fibras aferentes primárias estariam liberando aminoácidos excitatórios os quais ativam os receptores não-NMDA em interneurônios gabaérgicos, causando, assim, liberação de GABA nas sinapses axo-axônicas ou axo-dendríticas nos terminais aferentes primários na medula espinhal (SLUKA et al., 1995), como está demonstrado esquematicamente na figura 4.

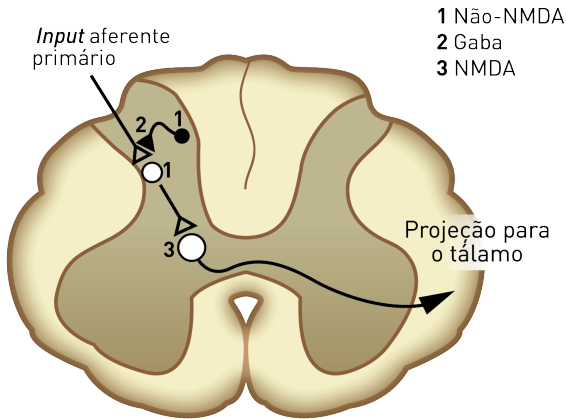


Figura 4: Ilustração da Circuitaria do Reflexo da Raiz Dorsal.

Os terminais de duas fibras aferentes primárias entram no corno dorsal. O circuito que produz a despolarização aferente primária envolve receptores glutamatérgicos não-NMDA (1) e receptores GABA_A (2), enquanto a transmissão da informação nociceptiva para neurônios de projeção envolve receptores glutamatérgicos NMDA (3). Nesse esquema, os terminais centrais dos aferentes primários liberam aminoácidos excitatórios, como o glutamato, o qual ativa receptores não-NMDA em interneurônios GABAérgicos, causando, então, liberação de GABA que irá agir em receptores localizados nos terminais centrais dos aferentes primários que despolarizam em direção antidrômica. Fonte: Modificado de (WILLIS JR., 1999).

Esse circuito medular recebe, também, interferências de estruturas do cérebro, pois o corno dorsal da medula espinhal é um ponto convergente da entrada de informação dos aferentes periféricos e de provenientes supraespinhais. Essa influência supraespinhal pode resultar em PAD e inibição pré-sináptica na medula espinhal, como por exemplo, a estimulação da região do *locus coeruleus* (RIDDELL; JANKOWSKA; EIDE, 1993), caracterizando o neurotransmissor noradrenalina (NA) como um inibidor da transmissão sináptica de fibras aferentes para neurônios de segunda ordem (BELCHER; RYALL; SCHAFFNER, 1978; BRAS et al., 1990; HEADLEY; DUGGAN; GRIERSMITH, 1978; JANKOWSKA et al., 1997; NOGA; BRAS; JANKOWSKA, 1992).

Assim sendo, a PAD é, comumente, uma indutora de efeitos inibitórios pré-sinápticos. Entretanto, em circunstâncias inflamatórias desencadeia eventos excitatórios por mecanismos favoráveis ao aumento da magnitude da PAD e da probabilidade de deflagração da atividade antidrômica.

1.7 MECANISMOS DESENCADEADOS PELA INFLAMAÇÃO QUE FACILITAM O REFLEXO DA RAIZ DORSAL E A INFLAMAÇÃO NEUROGÊNICA

De fato, na inflamação articular, as fibras aferentes primárias tornam-se mais excitáveis do que o normal e passam a contribuir para o desenvolvimento de alodinia (dor evocada por estímulo não nocivo) e hiperalgesia (percepção exacerbada do estímulo nocivo), respondendo, por exemplo, à movimentação da articulação, ou até mesmo à pressão e ao contato (COGGESHALL et al., 1983; REES et al., 1995; SCHAIBLE; SCHMIDT, 1986; SLUKA; LAWAND; WESTLUND, 1994). Esses fenômenos patológicos ocorrem através da interação entre as fibras A β da medula espinhal, que percebem sensações táteis, com as fibras A δ e C envolvidas na nocicepção, conectadas por um interneurônio gabaérgico (CURTIS; LODGE, 1982) nos terminais pré-sinápticos (CERVERO; LAIRD; GARCÍANICAS, 2003; CERVERO; LAIRD, 1996).

Em condições normais, a estimulação mecânica nas fibras A β , agindo através do interneurônio GABA, desencadeia a PAD nos

terminais nociceptivos e, assim, desvia a percepção da dor através do mecanismo de inibição pré-sináptica descrito. Em um processo inflamatório, existe um aumento de informações aferentes pelas fibras A δ e C. Essas informações acabam convergindo para os interneurônios espinhais gabaérgicos e quando as fibras A δ são estimuladas desencadeia uma excitabilidade no interneurônio capaz de produzir uma PAD, muito mais intensa e indutora de despolarização bidirecional no aferente primário (SLUKA et al., 1995).

Dessa forma, o campo receptivo cutâneo do neurônio nociceptivo expande, porque já não reflete somente a entrada do nociceptor, mas também, dos aferentes para estímulos de baixo limiar (fibras A β), como o toque, fazendo uma sobreposição com campos receptivos de estímulos nocivos, até mesmo em um local remoto (KAWAMATA et al., 2005). Além disso, uma contribuição dos nociceptores mecanoinsensíveis que, em condições normais, são silenciosos, passam a responder à estimulação mecânica e térmica durante a inflamação articular (JI; WOOLF, 2001; SCHAIBLE; GRUBB, 1993; WEIDNER et al., 1999).

Esse *input* aumentado de informações em um processo inflamatório é capaz de promover uma regulação positiva de mecanismos GABAérgicos no corno dorsal (BURKE, 2006; MOKHA; MCMILLAN; IGGO, 1983; NISHI; MINOTA; KARCZMAR, 1974; SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995), comprovada pela aplicação espinhal de bicuculina, um antagonista de GABA_A que reverte o alargamento dos campos receptivos nociceptivos cutâneas de neurônios específicos de lâmina I bem como a entrada de informação cruzada pelas fibras de baixo limiar (fibras A β) em modelo de inflamação aguda (GARCIA-NICAS, 2006). Esse bloqueio espinhal de receptores GABA_A elimina quase que completamente os RRDs (SLUKA et al., 1995), reduz o edema articular e previne o *flare* (região avermelhada ao redor do sítio de lesão) causados por injeção intradérmica de capsaicina (LIN; WU; WILLIS, 1999). Logo, a manipulação espinhal desse neurotransmissor pode modular a despolarização antidrômica das fibras aferentes e, conseqüentemente, modificar um evento inflamatório periférico (REES et al., 1994).

Outro mecanismo que acontece de forma concomitante à

intensificação do importante mecanismo GABAérgico seria um aumento da atividade do cotransportador NKCC1.

Em processos inflamatórios esse aumento da frequência de impulsos aferentes induzem sensibilização central, que por sua vez aumentam a atividade de quinases no corno dorsal (CROWN et al., 2012; DAI et al., 2002; GALAN et al., 2002; PEZET, 2002) responsáveis por ativarem o NKCC1, como as quinases WNK e SPAK/OSR1 que fosforilam os sítios Thr¹⁸⁴ e Thr¹⁸⁹ no domínio N-terminal intracelular do cotransportador (DARMAN, 2002; FLEMMER, 2002; KLEIN; LAMITINA; O'NEILL, 1999) e, também, por desativarem o KCC2 (DARMAN, 2002; DELPIRE; AUSTIN, 2010; DOWD; FORBUSH, 2003; GAMBA, 2005; GARZON-MUVDI et al., 2006; KAHLE et al., 2005; KURIHARA et al., 2002; LIEDTKE; COLE, 2002; MORIGUCHI et al., 2005; RICHARDSON; ALESSI, 2008; VITARI et al., 2005). Essas alterações no funcionamento dos transportadores de Cl⁻ irão potencializar, ainda mais, o acúmulo desse íon em aferentes primários.

Outras quinases, presentes em processos patológicos, também, estão relacionadas com o aumento da [Cl⁻]_i através do NKCC1 como a JNK (KLEIN; LAMITINA; O'NEILL, 1999), p38 (CAPÓ-APONTE et al., 2007), ERK (LIEDTKE; COLE, 2000), PKC δ (LIEDTKE; COLE, 2000, 2002) e CaMKII α (SCHOMBERG et al., 2001). Da mesma forma, no processo inflamatório, o aumento da liberação do neurotransmissor glutamato no corno dorsal altera a atividade do NKCC1, tanto pelo receptor de glutamato metabotrópico (mGluR) do grupo I quanto pelos receptores AMPA (SCHOMBERG et al., 2001).

Logo, sistemas que são afetados por uma variedade de neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento ativam ou inibem o cotransportador e controlam o nível do potencial de equilíbrio do Cl⁻ (ALVAREZ-LEEFMANS, 2010) favorecendo, na maior parte, o acúmulo de Cl⁻ e, por consequência, a despolarização pelo GABA.

Em modelo de hiperalgesia mecânica com capsaicina, uma rápida fosforilação de NKCC1 foi observada, bem como um aumento de 50% na expressão do cotransportador na membrana plasmática de medula lombo-sacral 90 e 180 minutos após a instilação de capsaicina na mucosa intestinal de ratos (GALAN; CERVERO, 2005). De forma factual, a intervenção farmacológica nesse cotransportador é capaz de alterar um evento inflamatório

periférico. A administração intratecal de bumetanida (bloqueador seletivo de NKCC1) resultou na inibição da deflagração de RRDs induzido por GABA (JANG; JEONG; AKAIKE, 2001; VALENCIA-DE ITA, 2006) e do edema neurogênico em modelo de injeção intraplantar de capsaicina (VALENCIA-DE ITA, 2006); sendo relatado, também, a diminuição da migração celular e do aumento do diâmetro articular induzido por lipopolissacarídeo (LPS) com a administração intratecal de furosemida (bloqueador de transportadores de Cl⁻) (BRESSAN, 2005).

Resumidamente, em um processo inflamatório há um aumento da liberação de GABA de interneurônios GABAérgicos do corno dorsal (LINDEROTH et al., 1994). O GABA atuando no terminal do aferente primário promove um despolarização, a PAD, de maior intensidade devido a facilitação do efluxo de Cl⁻ pelo aumento da atividade do NKCC1, secundariamente, o reflexo da raiz dorsal irá promover inflamação neurogênica na periferia. Esse quadro, clinicamente, é caracterizado por hiperalgesia primária ou secundária e/ou alodinia com sensibilização periférica e central (CERVERO; LAIRD; GARCÍA-NICAS, 2003; CERVERO; LAIRD, 1996) (Figura 5).

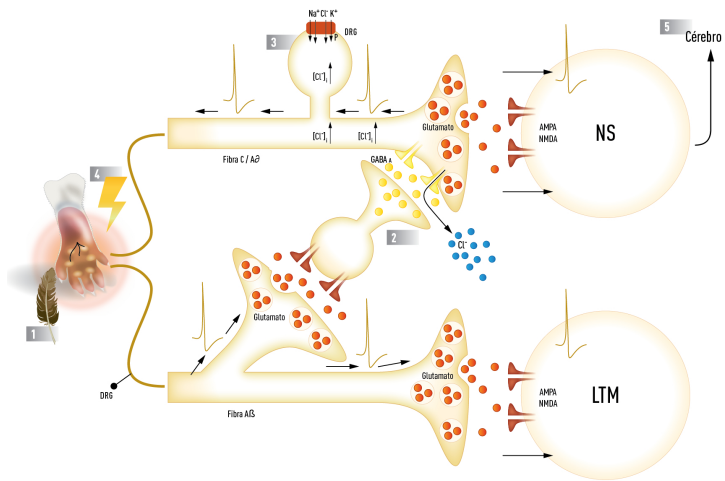


Figura 5: Desenho esquemático da despolarização do aferente primário (PAD) em um tecido inflamado.

Sob condições de inflamação, um estímulo aferente de baixo limiar (1) no campo receptivo de uma fibra de baixo limiar mecânico, ativa tanto este neurônio (LTM, *low threshold mechano-sensitive*) quanto, um interneurônio GABAérgico (2). A ativação de receptores GABA_A pré-sinápticos em fibras nociceptivas A δ /C, pelo GABA liberado dos interneurônios, conduz o efluxo de Cl⁻. Esse efluxo é favorecido pelo aumento da [Cl⁻]_i que está além, inclusive, do considerado normal nessas células devida a potencialização da atividade do NKCC1 (3) assim, a PAD ocorre com intensidade suficiente para gerar potenciais de ação ortodrômicos e antidrômicos (RRD). Potenciais de ação antidrômicos produzem inflamação neurogênica na periferia (4), enquanto potenciais de ação ortodrômicos ativam neurônios nociceptivos no corno dorsal (NS, neurônio segunda ordem), resultando em dor evocada ao toque (alodinia) (5). Fonte: autoria própria.

Dessa maneira, o impulsionamento do RRD envolve, de fato, mecanismos neuronais de sensibilização/aumento da atividade (SANDKÜHLER, 2007) de neurônios (LIN; PENG; WILLIS, 1996a; LIN et al., 1997) e interneurônios do corno dorsal (PENG; LIN; WILLIS, 1997). Nesse processo, as respostas inibitórias são reduzidas e quaisquer efeitos inibitórios pré ou pós-sinápticos

podem ser bloqueados pela ação de sistemas de segundo mensageiro (LIN; PENG; WILLIS, 1996b), principalmente, no sistema de transporte de Cl^- .

Todavia, a sensibilização das células neuronais não depende apenas de ações neuronais, mas também pode ser resultante de mecanismos não neuronais envolvendo, por exemplo, a ativação de células gliais (ARRUDA et al., 2000; BUDAI; LARSON, 1996; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). A glia pode interagir com esses neurônios, tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas (ARAQUE et al., 1999). Estudos mais recentes demonstraram que estímulos inflamatórios experimentais na periferia são capazes de induzir ativação das células gliais no SNC, particularmente, na medula espinhal (RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004). As células microgliais ativas secretam citocinas que aumentam a osmolaridade extracelular (ANKENY; POPOVICH, 2009) e promovem ativação de WNK1- uma quinase sensível a volumes (CAIN et al., 2007; KAHLE et al., 2005; OHTA et al., 2006; VITARI et al., 2005) e, como visto, responsável por ativação de NKCC1 e desativação de KCC2.

Em estudo experimental de processos inflamatórios e de neuropatias – onde uma dor altamente debilitante é induzida por aumento da atividade neuronal, ilustra-se uma sinalização onde a estimulação da microglia via ATP de neurônios da lâmina I evoca a liberação de BDNF na célula microglial. O BDNF desloca o potencial de reversão aniônica (E_{anion}) dependente de receptor TrkB, com diminuição da expressão do KCC2. A prevenção da liberação de BDNF microglial, antes da estimulação por ATP, inibe essa reversão E_{anion} (COULL et al., 2005, 2003). Em modelo de inflamação crônica em ratos por CFA, as alterações na expressão de KCC2 foram revertidas pelo bloqueio da produção endógena de BDNF (ZHANG; LIU; XU, 2008).

Com base nesses relatos, a figura 6 ilustra os possíveis mecanismos nos quais a microglia influenciaria o equilíbrio de Cl^- favorecendo a concentração intracelular desse íon e facilitação do RRD.

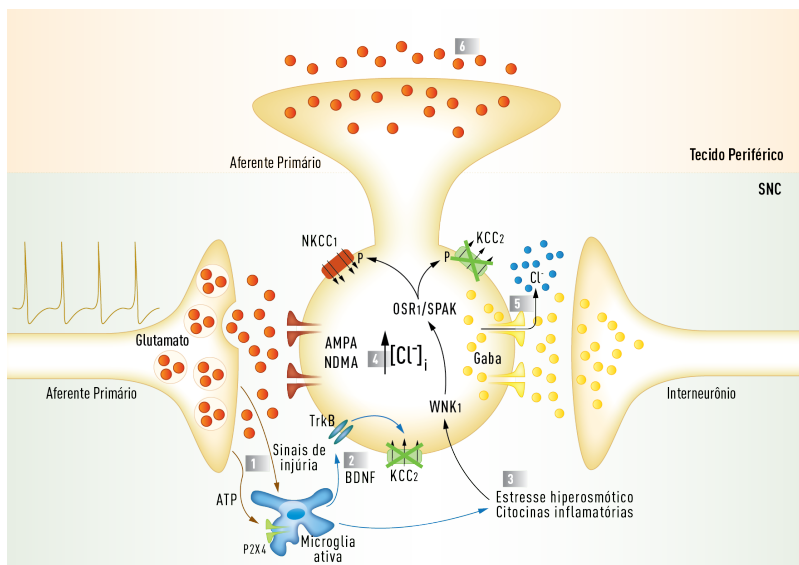


Figura 6: Possível mudança no equilíbrio de Cl^- pela microglia no corno dorsal durante estados de dor patológica.

(1) estímulos intensificados em aferentes periféricos (fibra A β /C) provocam liberação de neurotransmissores que alteram o fenótipo da microglia; (2) a liberação de BDNF pela microglia induz bloqueio do transportador para o meio externo de Cl^- (KCC2); (3) enquanto que outras citocinas liberadas pela microglia promovem um ambiente hiperosmótico e indutor de ativação de quinases e por consequente, de transportadores para o meio interno de Cl^- (NKCC1); (4) por consequência um aumento da $[\text{Cl}^-]_i$ reverte o gradiente aniônico e, (5) a liberação de GABA pelo interneurônio passa a ser estímulo suficiente para atingir o limiar do potencial de ação; (6) os peptídeos pró-inflamatórios, liberados através de potenciais de ação retrógrados, invadem a periferia. Fonte: autoria própria.

Além disso, uma vez que essas células são componentes-chave no recrutamento de leucócitos e apresentação de antígenos, a ativação da microglia está envolvida com o sistema imune adaptativo (ALOISI 2001) perfazendo o elo entre o sistema nervoso e imunológico.

Os estudos em nosso laboratório, com modelo de inflamação aguda, demonstraram que a microglia contribui para a geração e

manutenção da inflamação articular periférica em modelo de artrite por LPS. Um achado relevante é que esse aumento da atividade glial ocorreu, inclusive, em hemisfério **contralateral** na região lombar da medula espinhal (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010). Após injeção intra-articular unilateral de CFA, uma ativação robusta da microglia também foi observada na medula espinhal **bilateralmente** (SHAN et al., 2007; SUN et al., 2008).

Esquemáticamente, se o estado funcional da microglia pode ser alterado para um fenótipo ativo no hemisfério oposto ao estímulo flogístico, conseqüentemente, essas células podem estar envolvidas no processo de espelhamento de doenças inflamatórias crônicas na periferia como a artrite reumatoide, pois a microglia ativa libera substâncias capazes de promoverem redução do limiar de ativação e sensibilização, aumento da excitabilidade neuronal e por fim, facilitação da ocorrência de RRD nesses aferentes primários contralaterais. Conseqüentemente, os neuropeptídeos liberados na articulação homóloga contralateral produziram um cenário receptivo para as células circulantes e “imunologicamente” ativadas pelo evento ipsilateral.

Embora, já tenha sido amplamente relatado o envolvimento da glia na manutenção da dor persistente (INOUE, 2007; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001; WATKINS et al., 1997; XIE et al., 2006) e com os estudos realizados em nosso laboratório demonstrando que essas células participam, também, da inflamação periférica (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010; BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; BRESSAN, 2005), faz-se necessário demonstrar que na medula espinhal uma possível sinalização neurônio-glia e glia-neurônio estaria envolvida nas alterações inflamatórias contralaterais em modelo de artrite experimental. Os neurônios não são apenas alvos passivos da microglia, pois podem controlar a atividade dessa célula (CHAPMAN et al., 2000). O estudo dessa interação seria de extrema importância para eliciar o papel das células neuronais e não-neuronais no espelhamento de eventos periféricos.

1.8 INTERAÇÃO ENTRE NEURÔNIOS E GLIAS

Além da favorável proximidade na localização dessas células, a interação entre neurônios e células gliais inclui, primeiramente, a demonstração de que a atividade neuronal e a consequente liberação de neurotransmissores são capazes de induzirem aumento na concentração de Ca^{2+} na glia (ARAQUE et al., 1999). Esse aumento de Ca^{2+} provoca a liberação de glutamato dessas células, que irá ativar receptores nos neurônios, modulando a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (ARAQUE et al., 1999).

Da mesma forma, é possível inferir que essa comunicação pode se estabelecer tanto por vários outros receptores expressos nos neurônios da medula espinhal para as substâncias liberadas pela glia quando ativada, tais quais os aminoácidos excitatórios (LIU et al., 1994; TACHIBANA et al., 1994; WU; KO; ZHUO, 2007), IL-1 β (JELASO et al., 1998), IL-6 (HOLGUIN et al., 2004), BDNF (MANNION et al., 1999), PGE₂ (NAKAYAMA et al., 2004; SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002; ZHAO; WAXMAN; HAINS, 2007), TNF- α (VITKOVIC; BOCKAERT; JACQUE, 2000) e ATP (BUTT, 2011); quanto pelos receptores expressos na glia para as substâncias liberadas pelas fibras aferentes primárias como o glutamato (BESONG et al., 2002; NAGY et al., 1994; SNYDER, 2004; TSUDA et al., 2003), mas também ATP (ARAQUE et al., 1999; TSUDA et al., 2003), SP (MARRIOTT, 2004; SVENSSON et al., 2003), CGRP (PRILLER et al., 1995; REDDINGTON et al., 1995) e fractalcina (ASENSIO; CAMPBELL, 1999) e, ainda, pelos receptores das substâncias liberadas dos neurônios de segunda ordem da medula espinhal que conduzem informação dolorosa da medula espinhal para o cérebro, como as prostaglandinas, óxido nítrico e fractalcina (WATKINS; MAIER, 2002; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). Pertinentemente, esses neurotransmissores e neuromoduladores liberados pelos neurônios estão envolvidos na ativação glial (CAO; ZHANG, 2008) (Figura 7).

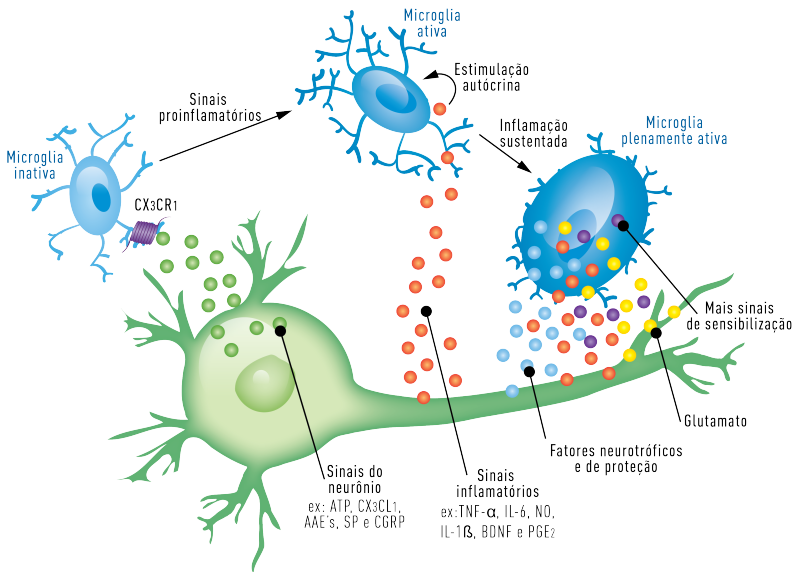


Figura 7: A interação entre microglia e neurônios.

O terminal do aferente primário quando ativo libera ATP, Fractalcina (CX3CL1), neurotransmissores excitatórios (AAEs), substância P, CGRP, entre outros como mediadores inflamatórios na medula espinal. Muitas dessas substâncias possuem receptores expressos em microglia e são capazes de alterar o estado funcional dessa célula para fenótipos com retração da extensão dos seus ramos e, assim, consideradas ativas. As microglia, por sua vez, liberam substâncias inflamatórias e excitatórias para neurônios e células adjacentes, como a própria microglia. Essas ações reduzem o limiar de ativação das células neuronais, promovendo excitabilidade ou mesmo, danos por excitotoxicidade. A microglia, entretanto, libera em determinados fenótipos, considerados de descanso ou reparativo após ativação, fatores neurotróficos e de proteção pela ação antiinflamatória que podem reparar o dano promovido no estado de neurodestruição. Fonte: autoria própria.

Notadamente, uma molécula vem recebendo grande importância como sinalizador neurônio-glia na medula espinal, a fractalcina (CX3CL1). A fractalcina é expressa, constitutivamente, nos terminais aferentes primários e neurônios espinais, como uma proteína neuroimune reguladora que fica normalmente presa à

membrana extracelular por uma haste de mucina (uma forma inativa ligada à membrana) (CHAPMAN et al., 2000). A liberação de glutamato ou TNF- α pelos aferentes sensoriais e neurônios intrínsecos da medula espinhal em um processo inflamatório ou por lesão nervosa, por exemplo, estimulam a clivagem da fractalcina (CHAPMAN et al., 2000; ERICHSEN et al., 2003). A fractalcina clivada é agora liberada para o fluido extracelular em sua forma solúvel e, assim, considerada ativa, atua em microglias próximas (CHAPMAN et al., 2000). A função portanto dessa citocina no SNC é enviar sinais de alerta para a microglia sob condições patológicas (HARRISON et al., 1998; RANSOHOFF; LIU; CARDONA, 2007).

Como já descrito, outras substâncias de origem neuronal também são capazes de ativar a glia (MILLIGAN et al., 2004; SHAN et al., 2007) porém, a fractalcina apresenta algumas características que a diferencia das demais, como ser singularmente liberada de neurônios (ASENSIO; CAMPBELL, 1999; LINDIA et al., 2005; VERGE et al., 2004), ser única em tamanho e estrutura (ASENSIO; CAMPBELL, 1999; HUGHES et al., 2002), que, exclusivamente, se liga em apenas um tipo de receptor (CX3CR1) e esse receptor liga-se apenas à fractalcina (HUGHES et al., 2002; JUNG et al., 2000). Mais ainda, o CX3CR1, do tipo acoplado à proteína G é expresso na medula espinhal apenas na microglia (LINDIA et al., 2005; MILLIGAN et al., 2004; VERGE et al., 2004; YANG et al., 2012) e a imunorreatividade para a fractalcina e seu RNA_m foram observados somente em neurônios, mas não em glia (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009; VERGE et al., 2004; YANG et al., 2012), sugerindo uma comunicação exclusiva entre essas células.

Na incubação de células glias do DRG com fractalcina, foi identificada uma liberação de TNF- α , IL-1 e PGE₂ (SOUZA et al., 2013). Estudos *in vivo* já comprovaram que a liberação prolongada de fractalcina pode contribuir para a manutenção da dor inflamatória por sensibilização central via ativação de células microgлияis (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; SOUZA et al., 2013). A administração intratecal de fractalcina exógena induz hiperalgesia térmica e alodinia mecânica em ratos naives, efeitos esses que foram revertidos pelo bloqueio da ativação microglial com minociclina intratecal (MILLIGAN et al., 2005). Além disso, o

anticorpo CX3CR1 neutralizante atenua o desenvolvimento desses estados exacerbados de nocicepção em modelo de dor neuropática (JOHNSTON, 2004; WATKINS; MAIER, 2003).

Na inflamação crônica, o nível de expressão do CX3CR1 foi significativamente aumentado na medula espinhal após o CFA em pata de rato (SHAN et al., 2007). Pertinentemente, o bloqueio do CX3CR1 inibe a ativação de microglia evocado no modelo de monoartrite por CFA (MILLIGAN et al., 2005; VERGE et al., 2004). Tomados em conjunto, a fractalcina neuronalmente liberada pode exercer os seus efeitos ativadores através do receptor CX3CR1 em microglia.

Por outro lado, a sinalização glia-neurônio na medula espinhal tem o TNF- α como uma das substâncias liberadas pelas células gliais com capacidade de alterar a excitabilidade neuronal (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; COULL et al., 2005; HIDE, 2003; WU; KO; ZHUO, 2007) e cujo receptor é expresso em neurônios da medula espinhal (HERMANN; HOLMES; ROGERS, 2005). Dessa forma, o TNF- α liberado de células gliais pode ativar os receptores presentes nos neurônios aumentando a excitabilidade dessas células e contribuindo para o processo de sensibilização central e facilitação do RRD (CERVERO; LAIRD, 1996; RUDOMIN; SCHMIDT, 1999; WILLIS JR., 1999). Além disso, TNF- α também atua na ativação das células gliais (CAO; ZHANG, 2008), estabelecendo a manutenção de um ciclo autorregulado de estimulação de neurônios e gliais.

1.9 NOVAS PERSPECTIVAS

Dentro dessa possibilidade de entendimento da progressão das patologias simétricas, isso inclui a lateralização da artrite reumatoide, é preciso elucidar a possível interação na medula espinhal entre as fibras C e A δ do sistema nervoso e as células da microglia do sistema imune que possa conduzir à destruição da cartilagem e osso contralaterais. O entendimento de que os neurônios interagem com a glia pode ser um grande passo favorável à aceitação, pela comunidade científica, de que o SNC e imune não podem ser considerados como unidades independentes, mas sim

que interagem e que dessa interação podem surgir novas estratégias terapêuticas para o controle mais eficiente da inflamação.

Por consequência, considerando o papel da medula na etiologia de enfermidades, o tratamento de muitas doenças não se resumiria apenas na inibição da atividade neuronal aferente, mas também poderia envolver igualmente estratégias para reduzir a atividade eferente das fibras sensoriais e do estado de interação neurônio-glia. A medula espinhal não seria apenas uma simples via de transmissão de uma informação sensorial da periferia para o cérebro, mas um local potencial para a modulação da resposta inflamatória durante um insulto periférico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a interação de fibras TRPV1 e a microglia, na medula espinhal, envolvida na ocorrência da simetria do modelo de artrite induzida por CFA em ratos.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo de artrite simétrica por *Mycobacterium tuberculosis* com adjuvante incompleto de Freund (IFA) - CFA, em patas de ratos.
- Verificar se a administração de NMDA na medula espinhal modifica o desenvolvimento do modelo de artrite simétrica induzida por CFA.
- Determinar o papel do terminal aferente das fibras TRPV-1 da medula espinhal no modelo de artrite simétrica induzida por CFA.
- Avaliar o papel do NKCC1 da medula espinhal no modelo de artrite simétrica induzida por CFA.
- Determinar a interferência do sistema descendente noradrenérgico da medula espinhal no modelo de artrite simétrica induzida por CFA.
- Avaliar o papel da microglia da medula espinhal no modelo de artrite simétrica induzida por CFA.
- Avaliar o papel do TNF- α e da Fractalcina da medula espinhal no desenvolvimento da simetria do modelo de artrite induzida por CFA.

3 DESENVOLVIMENTO DA HIPÓTESE

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E METODOLOGIA

3.1.1 Animais

A indução da artrite por CFA em animais tem revelado extensas variações na frequência e severidade das lesões de acordo com as diferentes espécies e linhagens. Os camundongos, geralmente, não são susceptíveis à indução de artrite por adjuvante (WHITEHOUSE, 2007). Por outro lado, os ratos desenvolvem com maior facilidade esse modelo de inflamação, sendo a severidade nas linhagens Wistar considerada eficiente (BANIK; KASAI; MIZUMURA, 2002). Quanto ao gênero há relatos de que não há diferenças significativas na suscetibilidade experimental quando comparados ratos machos e fêmeas (VAN EDEN; WAGENAAR-HILBERS; WAUBEN, 2001).

Entretanto, o sistema imunológico de machos e fêmeas diferem em aspectos importantes, especialmente após a puberdade. Em particular, respostas imunes mais brandas são frequentemente observados em machos em comparação com as fêmeas que geralmente são mais propensas as doenças que envolvem respostas imunes do tipo inflamatórias, como visto na AR em humanos, onde a prevalência em mulheres é relatada de 66% a 86% em relação aos homens (BIVER et al., 2009; K. PEDERSEN, 2011; LI et al., 2012; MYASOEDOVA et al., 2011; YAMANAKA et al., 2014). Os hormônios sexuais, genes codificados nos cromossomos sexuais e comportamentos específicos do gênero, provavelmente, contribuem para essas diferenças. Ao que observa-se os hormônios femininos possuem propriedades proinflamatórias enquanto que os masculinos possuem efeitos imunomoduladores potentes (BOUMAN et al., 2004; SCOTLAND et al., 2011). Apesar do conhecimento atual sobre o efeito dos hormônios sexuais sobre as células do sistema imunológico, a definição dos fatores que impulsionam essas diferenças entre os sexos em termos de resultados, como a diminuição da resposta à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* observada em machos e taxas mais elevadas nas fêmeas, permanece indefinida (DEMKOW et al., 2007). Recentemente, a abordagem de

sistemas para a função imune começaram a sugerir um caminho para estabelecer essa conexão. Tais estudos, prometem melhorar a nossa compreensão dos mecanismos subjacentes ao dimorfismo sexual observado no sistema imunológico humano e animal (NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014).

Em relação à idade, as diferenças na indução da artrite estão mais bem relatadas, sendo definidos como não suscetíveis os ratos de até 7 dias de idade, passando a suscetíveis os animais com mais de 21 dias de vida até o momento considerado ótimo, o período de 6 a 12 semanas após o nascimento. Por outro lado, os animais mais velhos (com 9 meses ou mais) foram considerados relativamente resistentes ao desenvolvimento da artrite por adjuvante (GLENN; GRAY, 1965; VAN EDEN et al., 1985). Essas diferenças conforme a idade, mostrando ser divergente a resposta de um jovem e de um adulto, correlacionam-se com o aumento da susceptibilidade a várias infecções e um maior risco de doença crônica impulsionada por inflamação. Os vários estudos em ratos e humanos têm demonstrado que as alterações relacionadas com o envelhecimento nas funções das células imunes inatas estão associados com um perfil de citocina inflamatória (BARTLETT et al., 2012) e a eficácia diminuída de ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, para agentes patogênicos (SHAW; GOLDSTEIN; MONTGOMERY, 2013).

Sendo assim, os experimentos foram realizados em ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar ("outbreed"), fêmeas, de 8 semanas de idade e pesando entre 200-250 gramas, procedentes do Biotério de Criação da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC), o qual enviava esses animais após o desmame para o Biotério de Manutenção do Departamento de Farmacologia, onde permaneciam por um curto período de dias, sendo em seguida, alojados no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN). Todos esses Biotérios são de classificação Classe I. Especificamente, no LANEN, eram mantidos em caixas de acrílico com cama de serragem em grupos de 5 animais cada, sob temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) e com água e ração *ad libitum*.

Como tratamento profilático para o controle de parasitoses, aos 45 dias de idade os animais recebiam uma solução de

ivermectina em água (48 mg/L), via oral, durante 72 horas consecutivas (FOLETTTO; MARTINS; TONUSSI, 2013). Esse tratamento era fornecido com o objetivo de promover condições de saúde adequadas para a melhor eficiência dos estudos neles realizados (BAKER, 1998; HOMBERGER; THOMANN, 1994; LIPMAN; PERKINS, 2002; MATISZ et al., 2011; PEARSON; TAYLOR, 1975). As parasitoses são causa comum de perda de reprodutibilidade nos experimentos, pois podem resultar em alterações dos valores nutricionais, imunológicos e hematológicas normais (CARTY, 2008), conduzindo a um aumento no número de animais utilizados.

Após um intervalo de 7 dias do término do tratamento antiparasitário, os experimentos com as amostras populacionais dessa espécie eram realizados em algum horário do período das 8:00 às 16:00 horas. Uma ambientação prévia ocorria por pelo menos 1 hora na sala de experimento.

Todos os experimentos foram realizados em salas de classificação NB1. A conduta ética foi baseada nos preceitos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor, nas Diretrizes Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA; 2013), nas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA; 2013b) e no Guia Nacional do Instituto de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publications No. 8023, revisado 1978). A concordância ética foi obtida pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo PP00723.

3.1.2 Indução da inflamação

Os modelos animais de doenças fornecem ferramentas inestimáveis para compreensão dos mecanismos biológicos básicos, para identificação e validação de vias moleculares implicadas na patogênese da doença e para rastrear e avaliar potenciais agentes preventivos e terapêuticos. No estudo da AR existem alguns modelos animais (BERG, 2009; KOLLIAS et al., 2011) e cada um representa melhor um aspecto da doença, contribuindo para a descoberta e avaliação de compostos para novas abordagens terapêuticas. Logo, não existe um "modelo universal", devido a

heterogeneidade molecular e a manifestação clínica complexa. Uma grande vantagem do uso desses modelos é que cada um permite a modulação de uma via fisiopatológica em particular, oferecendo assim, a possibilidade de congregar as descobertas para o entendimento da doença.

A escolha do modelo animal para o estudo do papel da medula espinhal na indução de simetrias considerou as características do modelo de indução por CFA (Pearson, 1956. Comentado em: WHITEHOUSE, 2007) na capacidade de promover uma doença artrítica imunopatológica em ratos que exhibe muitas das características da artrite reumatoide humana (BILLIAU; MATTHYS, 2001; COLPAERT, 1987; SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002), e mais ainda, com manifestações nas articulações contralaterais, como infiltração celular, aumento da permeabilidade vascular e alterações das articulações afetadas (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; WILSON et al., 2006) que, obviamente, dependem da evolução do quadro e de formas mais graves de inflamação (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993).

No modelo de CFA original, o mais antigo e utilizado pela maioria dos estudos, o agente é inoculado na base da cauda com o intuito de conduzir o desenvolvimento de uma artrite crônica envolvendo múltiplas articulações (BUTLER et al., 1992; COLPAERT, 1987; RAINSFORD, 1982; RUBENS-DUVAL; VILLIAUMEY; KAPLAN, 1966). Contudo, há limitações nessa forma do modelo, desde as graves alterações sistêmicas que incluem lesões dos olhos, ouvidos, nariz e genitais, bem como linfonodomegalias e comprometimento do metabolismo do fígado que provocam preocupações éticas pelas alterações no comportamento, na fisiologia e na bioquímica animal (KOLLIAS et al., 2011). Esses efeitos globais não são reflexo da patologia observada na AR clínica e, por conseguinte, o modelo foi modificado para restringir a exposição de uma pequena área ao mediador inflamatório. Essa adaptação de refinamento escolheu, então, a inoculação do agente somente na pata, sem exposição do animal a uma dose de CFA sistêmica, o que permitiria que o CFA promove-se uma monoartrite localizada, menos grave e sem fatores que complicam a mobilidade e o ganho de peso bem como, a grave anquilose, permanecendo as características da AR tal como, a importante formação do *pannus* com complexos imunes (KOLLIAS

et al., 2011). Um processo artrítico limitado a pata é estável ao longo de 6 semanas e adequado para estudos comportamentais e neuroquímicos de vários métodos de tratamento da inflamação (BUTLER et al., 1992).

Os eventos precoces, após a exposição ao CFA (ou micobactéria), incluem uma rápida captação dos adjuvantes pelas CDs e MPCs e a secreção de quimiocinas e citocinas, como TNF- α , IL-12 e IL-6 importantes na condução à inflamação crônica (FIRESTEIN; ALVARO-GRACIA; MAKI, 1990; SAXNE et al., 1988a, 1988b). As DCs e MPCs migram com as partículas desses constituintes aos linfonodos regionais sinalizando a polarização dos linfócitos T para um perfil T_H1 (pela IL-12), o qual direciona o sistema imune para o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade tardia contra autoantígenos e não somente a produção de anticorpos, como ocorre nos modelos com Adjuvante Incompleto de Freund (Incomplet Freund Adjuvante-IFA), ou seja, sem a presença da micobactéria a polarização tende para um perfil T_H2 (BILLIAU; MATTHYS, 2001).

As alterações que ocorrem como resultado da injeção de CFA na pata estendem-se, a partir das fibras aferentes periféricas, para o corno dorsal da medula espinhal e centros superiores e medeiam alterações plásticas que evocam e sustentam a hipersensibilidade, indicativo de um padrão de resposta crônica após um insulto inflamatório. Os relatos de mudanças que ocorrem em aferentes primários e neurônios de segunda ordem são comuns na literatura. SCHAIBLE e SCHMIDT, (1988) encontraram um aumento na sensibilidade dos nervos mecanossensíveis que ocorreu poucas horas depois do insulto inflamatório por CFA.

3.1.3 Medida indireta da inflamação

Medidas indiretas de artrite, como mensuração da circunferência da articulação ou da dimensão do local, escalas de inflamação, ou ainda, limiar nociceptivo, estão intimamente relacionadas com o estado histológico da articulação, o que suporta o uso desses parâmetros (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; FOLETTTO; MARTINS; TONUSSI, 2013). Sendo assim, foi avaliado o

aumento no volume da pata ipsilateral e contralateral após a injeção de CFA.

Para tal, a pata do animal era submersa até a altura da articulação tibiotársica, em uma cubeta preenchida com solução de sulfato de lauril em água (10 ml a 2,5 %), colocada sobre uma balança eletrônica de precisão (Figura 8). A variação volumétrica foi calculada pelo aumento do peso da coluna líquida, considerando-se que 1 ml de água corresponde a 1 g (Princípio de Arquimedes). A primeira medida desse edema (medida basal = tempo 0 h) foi realizada antes da injeção de CFA e as demais medidas em tempos subsequentes (7, 14, 21 e 35 dias) após a administração de CFA na pata. Para isso, as ratas foram imobilizadas em um cone de borracha macio, apenas o período necessário para a aferição.

Para os estudos comparativos com os animais que desenvolveram a artrite de forma simétrica, foi considerado o valor de 30% de aumento do volume basal como critério de lateralização (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993).

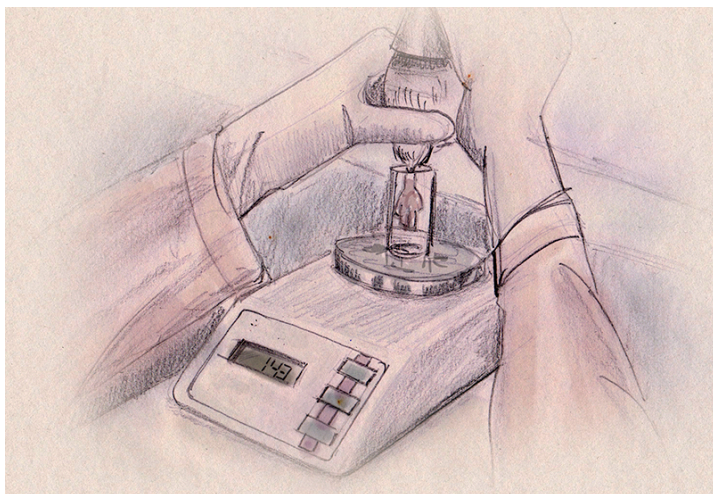


Figura 8: Foto ilustrativa da mensuração do volume da pata.

3.1.4 Medida direta da inflamação

As mensurações preliminares do aumento de volume de pata, neste estudo, demonstraram o desenvolvimento de uma artrite crônica bilateral somente após 21 - 28 dias da injeção de CFA. Com o objetivo de avaliar o processo inflamatório completo, aos 35 dias após a injeção de CFA, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (15%) até parada completa de movimentos respiratórios e batimentos cardíacos, onde então, eram decapitados em guilhotina e, as excisões das patas posteriores direita e esquerda foram realizadas. Por conseguinte, os fragmentos eram ocluídos em paraformoldeído 4% por 24 horas e, após esse período, era realizada a divulsão da pele na superfície plantar da pata, sendo o tecido removido e a pata ocluído novamente em paraformoldeído 4% por 12 horas. Essas amostras foram preservadas em álcool 70% até o processamento histológico.

Para o processamento, os segmentos teciduais foram colocados em cápsulas de plástico e transferidos para solução descalcificadora de ácido nítrico 5%, onde permaneceram por 7 dias. As amostras foram, sucessivamente desidratadas em etanol (70° GL, 80° GL e 90° GL e absoluto, respectivamente), durante 30 min em cada graduação de concentração. Em seguida, foram incubados, consecutivamente, em solução de xilol por 90 min para posterior solidificação em parafina a 70° C. Cada fragmento foi envolto em um suporte quadrado metálico (de Leuckart) e, imediatamente, embebido em parafina líquida. Os quadrados foram então armazenados em geladeira para a completa solidificação. Os fragmentos teciduais foram cortados à espessura de 4 µm. Posteriormente, fez-se a desparafinação em banho-maria, e o material foi transferido para uma lâmina de vidro. Essas lâminas foram submersas 3 vezes em xilol por 5 min cada e mergulhadas em álcool absoluto por 5 vezes em 4 cubas diferentes e, por fim, eram lavadas em água corrente por 3 min, secadas em estufa à 50° C durante 24 h e armazenadas à temperatura ambiente para posterior coloração pela hematoxilina-eosina.

Os parâmetros histopatológicos avaliados foram densidade de infiltrado inflamatório na membrana sinovial e espaço articular, edema tissular, alterações vasculares, presença de fibrina e fibrose,

grau de hiperplasia sinovial e de erosão em cartilagem e ossos. No momento da avaliação, um observador independente, quantificou esses parâmetros descritos atribuindo uma escala contínua de 0 a 4 para o grau de inflamação (0 = ausência de inflamação, 1 = inflamação em tecido conjuntivo, 2 = inflamação articular leve, 3 = inflamação articular moderada e 4 = inflamação articular severa) e para o grau de erosão em cartilagem e ossos (0 = ausência de erosão, 1 = erosão até 10%, 2 = erosão entre 10 a 25%, 3 = erosão entre 26 a 50% e 4 = erosão acima de 50%), baseado em metodologias propostas por: (BOETTGER et al., 2008; FOLETTTO; MARTINS; TONUSSI, 2013; LOSSOS et al., 2000; MOTOHIRO et al., 1986; VIEIRA et al., 2010). A partir da atribuição desse escore, um padrão histológico de cada grupo pôde ser identificado, contribuindo para a escolha da imagem de microscopia óptica representativa de cada grupo.

3.1.5 Quantificação da atividade microglial

A ativação glial constitui um processo multidimensional (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001) e está envolvida na defesa, no reparo e na regeneração do tecido neuronal exposto a doenças infecciosas, inflamação, trauma, tumores ou neurodegeneração (KREUTZBERG, 1996; TSUDA; INOUE; SALTER, 2005; VILA et al., 2001). Após o aumento da atividade do nervo periférico, por exemplo, a glia altera sua forma ramificada para uma forma hipertrofiado e ameboide (GARRISON; DOUGHERTY; CARLTON, 1994). Com isso, essa célula passa a expressar uma variedade de moléculas de superfície celular, incluindo molécula 1 adaptadora de ligação do Ca^{2+} ionizado, ou do inglês *Ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1), uma proteína exclusiva de microglia como produto final de cascatas intracelulares que fornecem "registros" de que algum tipo de ativação glial ocorreu (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de ativação da microglia por ensaios de *Western Blotting* nos hemisférios ipsi e contralateral da medula espinhal das ratas e, assim, elucidar o envolvimento dessas células no processo de lateralização da artrite pelo CFA unilateral, em determinados protocolos experimentais,

grupos de animais (n= 4 f=0,99) eutanasiados com hidrato de cloral (15%) e decapitados manualmente por guilhotina tiveram o segmento L4-L5 removidos e seccionados em lado direito (ipsilateral) e lado esquerdo (contralateral) nos dias 3 e 24 após CFA.

Em modelo de CFA, uma robusta ativação microglial é observada após a administração intraplantar unilateral do agente na pata, com o pico máximo da ativação de forma bilateral no terceiro dia (CAO; ZHANG, 2008; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004). Concomitantemente, é observado um aumento significativo dos níveis espinhais da proteína ativadora de célula microglial, o TNF- α e seu RNA_m 3 e 21 dias após o CFA (BAO et al., 2001; KÖNIG et al., 2014). Sendo assim, as datas para coleta de medula neste estudo foram escolhidas para contemplar a visualização do estado ativacional da célula no relatado pico de ativação com o CFA e 3 dias após o aumento de TNF- α .

Para o corte transversal da medula era utilizada uma placa de Petri com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4°C) e as hemimedulas eram colocadas imediatamente sob refrigeração, e posteriormente, armazenadas a -80°C até o preparo das amostras. No momento do preparo foram adicionados 200 μ l de tampão RIPA gelado (4°C) composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, pepstatina A 20 μ g/ml e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Com o auxílio de um pistilo, as amostras foram homogeneizadas manualmente e incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 10.000 rpm em temperatura de 4°C por 10 min, preservando o sobrenadante final. Esse extrato celular, contendo as proteínas dissolvidas no meio, foi armazenado a -80°C.

A fim de padronizar a concentração de proteínas em todas as amostras para um valor entre 3-5 μ g por ml, o total de proteínas de cada amostra armazenada foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop® 1000 protocolo de dosagem protéica A280 (Wilmington, USA) e adicionou-se água destilada conforme a concentração inicial. Após este passo, esse homogenato de amostra e água destilada

recebeu 30 µl de solução tampão 5 vezes concentrado (tris-HCl 150 mM – pH 6,8, β-mercaptoetanol 15%, SDS 6%, azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 25% e foi mantido à 100°C por 5 minutos em banho maria.

Para quantificar a expressão de Iba-1 e β-actina, foram utilizados 15 µg da proteína previamente preparada como descrito. As proteínas foram submetidas à eletroforese de 125V durante 90 minutos em gel de poliacrilamida (15%) contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sob voltagem constante de 100V por 60-90 minutos em ambiente refrigerado. As membranas com as proteínas foram bloqueadas em solução de BSA (10%) por 60 minutos sob leve agitação à temperatura de 4-8 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas sob leve agitação em temperatura de 4-8 °C por um período de 12-16 h em solução contendo os seguintes anticorpos primários: o anticorpo policlonal feito em cabra contra a proteína Iba1 (anti-iba1; Abcam, Cambridge, MA, USA; ab5076; 1:1000) ou o anticorpo monoclonal feito em camundongo contra a proteína β-actina (Santa Cruz Biotech, CA, USA; sc-81178; 1:1000). No dia seguinte, as membranas por cinco vezes foram lavadas por 5 min em cada vez, com TBS-T e sob leve agitação. Na sequência foram incubadas com anticorpo secundário anti-cabra ou anti-camundongo (Cell Signaling Tech, MA, USA) na concentração de 1:25000 por 90-120 minutos à temperatura ambiente e sob leve agitação. Após a incubação com o secundário, as membranas foram lavadas da mesma forma que ocorreu após a incubação com o anticorpo primário.

Os conjugados imunocomplexos foram visualizados usando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente, SuperSignal West Femto® (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) observados em Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, USA) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia I do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. As imagens dos imunocomplexos são representativas de um grupo (n= 3-4) com três avaliações independentes e normalizadas pelo valor obtido com a quantificação dos imunocomplexos gerados pelo anticorpo anti-β-actina que foi utilizado como controle de carga. Os níveis de

proteína foram quantificados por análises da densitometria por densidade óptica usando o programa ImageJ® Software (NIH, MD, USA) e os dados dos gráficos para o Western Blotting serão apresentados como unidades arbitrárias (U.A.).

3.1.6 Administração de fármacos pela via intratecal

A injeção de fármacos pela via intratecal (IT) foi realizada segundo o método descrito por (MESTRE et al., 1994). Dessa forma, os animais eram previamente anestesiados com isofluorano (2% em oxigênio hospitalar) e, em seguida, uma agulha 29 gauge com 12,7 mm de comprimento (Seringa BD Ultra Fine®, New Jersey, USA) era cuidadosamente inserida, perpendicularmente, entre as vértebras L5 e L6 (Figura 9). Um leve bater de cauda (*flick*) era observado quando a agulha entrava no espaço subaracnóideo indicando que o canal vertebral havia sido atingido corretamente e assim, a injeção era concluída. O procedimento de injeção IT era experimentado apenas uma vez. Caso não houvesse *flick* na primeira tentativa de injeção, o animal era excluído do experimento. O volume máximo injetado no espaço intratecal foi de 10 μ l.

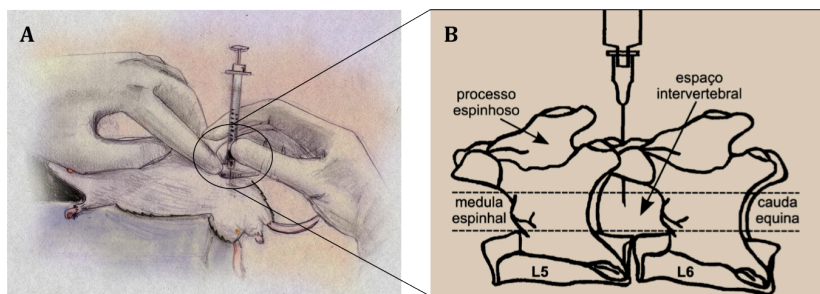


Figura 9: Injeção Intratecal.

A: Figura ilustrativa do local anatômico da injeção intratecal. O diagrama mostra o ponto de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6. Adaptado por Bressan, 2010 de MESTRE et al., 1994. **B:** Foto ilustrativa da administração intratecal em ratos.

3.1.7 Protocolos experimentais

Os protocolos experimentais foram desenhados conforme os objetivos dessa pesquisa. Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre os animais, essa randomização dos grupos por todas as caixas de alojamento é essencial, pois muitas vezes há fontes de variação, conhecidas ou não, o que poderia enviesar os resultados. O observador era cego para a atribuição de cada grupo, quando possível. Contudo, o edema das articulações injetadas com CFA, principalmente, na ipsilateral, era óbvio e todos os animais no estudo receberam os mesmos procedimentos de contenção e aferição e, tiveram os seus valores registrados nos mesmos dias.

O cálculo da amostra em cada protocolo, considerando o poder de um teste estatístico pela probabilidade de rejeitar a sua hipótese nula (H_0), foi calculado com auxílio do software G Power® (versão 3.1.9.2, Universitat Dusseldorf, Germany) com base nos valores obtidos a partir da padronização do modelo de CFA simétrico ou referências prévias, definindo como probabilidade de erro (α) o valor de 0,05 e de força (β) em 0,95.

3.1.8 Apresentação dos dados e análises estatísticas

O edema inflamatório é apresentado pelo aumento de volume da pata, ipsilateral e contralateral, a partir da diferença da medida do volume basal realizado anteriormente a administração de CFA. Cada quadrante no gráfico representa a concentração da tendência central dos valores de aumento de volume das patas de cada grupo durante os 35 dias após a administração de CFA, com demonstração da mediana no traçado horizontal delimitando assim os quartis inferior e superior e as barras verticais representando valores de máxima e mínima. Esses valores entretanto, representam o total de 5 aferições por animal com intervalo de 7 dias cada. As comparações entre os grupos e o nível de significância demonstrado (P) na seção de resultados foram obtidos pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney ou Kruskal-Wallis. O pós teste Dunn foi aplicado sempre que a diferença de $p < 0,05$ foi detectada na comparação em mais de 2 grupos. O relevante neste estudo foi verificar o efeito dos protocolos sobre o edema no período de tempo total do modelo, ou

seja, após os 35 dias. Desta forma, considerou-se apenas uma variável, o que justifica a escolha do método estatístico. Todavia, na avaliação temporal do modelo de inflamação simétrica as comparações entre os grupos e o nível de significância (P) foi calculado pelo teste de ANOVA 2 vias seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni. A correlação entre o aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral de animais simétricos foi calculada pelo teste de correlação de Pearson.

Os comportamentos nocifencivos induzidos pela capsaicina são representados pela média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos e o nível de significância demonstrado (P) na seção de resultados foi obtido pelo teste Mann-Whitney.

Em relação aos graus de inflamação e de degeneração da cartilagem e ossos, vistas na análise histológica, uma tabela gráfica demonstra a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximos e mínimos de cada grupo (n=5). A representação dos grupos por uma imagem de microscopia óptica corresponde ao escore de sua mediana.

Para as comparações entre os grupos da quantificação por densidade óptica da ativação microglial e integridade neuronal utilizou ANOVA de uma via para medidas simples e o Teste T de Student, conforme o número de grupos a serem comparados. O pós teste Bonferroni foi aplicado sempre que a diferença de $p < 0,05$ foi detectada na comparação da variabilidade entre e no grupo, quando mais de 2 grupos eram testados. A representação gráfica reflete a média \pm EPM de cada grupo.

A análise estatística, os gráficos e as tabelas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, California, USA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE CFA INTRAPLANTAR PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA

Com o objetivo de determinar um modelo de artrite simétrica por CFA unilateral foram preparadas doses crescentes (250 µg, 500 µg e 1 mg) da bactéria inativada *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Ra, Difco®, New Jersey, USA) diluída em IFA (0,1 ml) (Difco®, New Jersey, USA) e injetadas com auxílio de uma agulha de 22 gauge (0,70 x 30 mm) (BD®, New Jersey, USA) na superfície plantar da pata direita de animais (n = 11) contidos fisicamente com a ajuda de um cone de borracha maleável. Para uma perfeita distribuição e homogeneização da solução, esta era aquecida e agitada antes do procedimento de inoculação no subcutâneo. As doses testadas buscaram a gravidade suficiente para que ocorressem mudanças contralaterais em articulação homóloga, relatadas como dependentes da intensidade do estímulo e semelhantes às observadas no lado inflamado, mas, muitas vezes, com diferentes cinéticas ou menores em magnitude (DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993).

As amostras de medula e patas foram obtidas de todos os grupos para o ensaio de *Western Blotting* e histologia, respectivamente. O desenho experimental desse protocolo está representado na Figura 10.



Figura 10: Desenho experimental do protocolo de avaliação de doses crescentes de CFA unilateral.

A bactéria inativada (250 µg, 500 µg e 1 mg) diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 µl) foi administrada via subcutâneo na região plantar de ratos no dia 0 (n=11). O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21, 28 e 35. O segmento medular (L5-L6) foi retirado nos dias 3 e 24 (n=4) e as patas no dia 35 (n=5).

A avaliação do volume das patas ipsilaterais e contralaterais até 35 dias após a administração de doses crescentes de *M. tuberculosis* demonstrou que, a dose de 250 µg da bactéria inativada promove aumento de volume da pata contralateral em comparação aos animais do grupo naive (Figura 11). Havendo uma porcentagem de ocorrência de simetria de $\pm 70\%$.

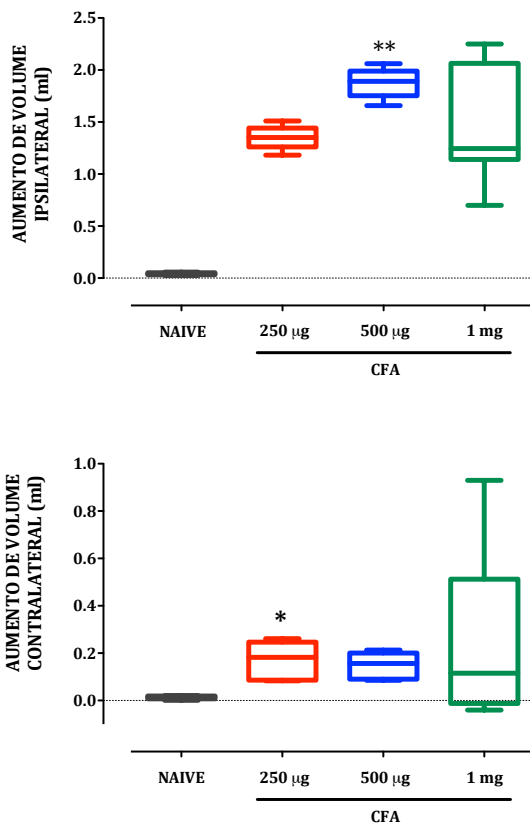


Figura 11: Efeito do *M. tuberculosis* no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral.

A bactéria inativada (250 µg, 500 µg e 1 mg) diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 µl) ou o PBS (100 µl) foram administradas por via subcutânea na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores (n = 11) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * e ** indicam a diferença estatística em relação ao grupo naive com $p < 0,05$ e $0,01$ (Kruskal-Wallis seguido de teste de comparação múltipla Dunn).

Em relação ao comportamento animal no desenvolvimento da inflamação, os animais que receberam 250 µg de *M. tuberculosis* demonstraram pouco ou algum desconforto aparente e, atividade locomotora com momentos ocasionais de guarda do membro afetado ou normal. Nos grupos com as doses de 0,5 e 1 mg de *M. tuberculosis* a pata posterior direita não era utilizada para andar, havia presença de necrose tecidual, perda de peso, artrite generalizada e lesões viscerais, principalmente, na dose de 1 mg (dados não demonstrados).

Quanto ao aumento do volume da pata contralateral, a representação temporal revela que existe uma dependência de tempo para o processo de lateralização, observado, somente, após 21 dias da administração do CFA (Figura 12).

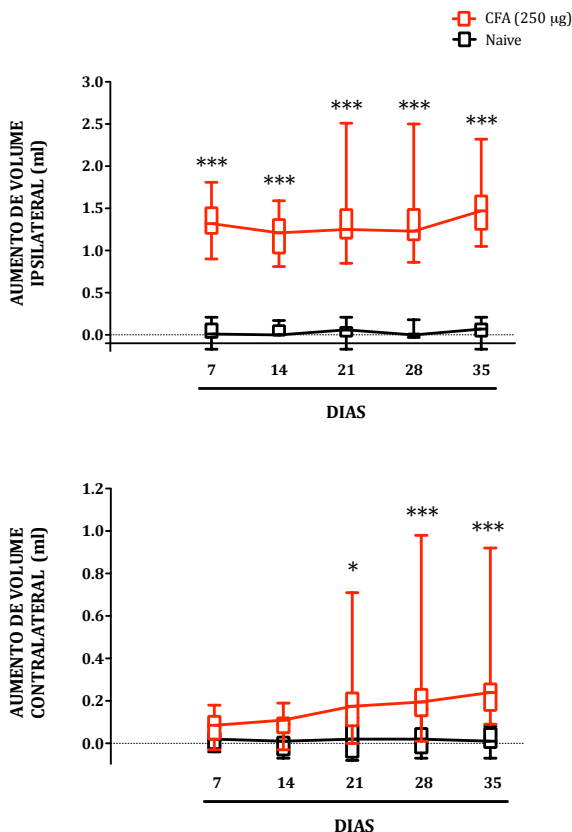


Figura 12: Efeito do tempo no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral na dose de 250 µg de *M. tuberculosis*.

A bactéria inativada diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 µl) foi administrada por via subcutânea na região plantar de rato Wistar (fêmea) ou somente o PBS (100 µl). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores (n = 11) de aumento de volume total das patas após a administração de CFA com demonstração da mediana no traçado horizontal, sendo o traçado vertical inferior e superior a representação da distribuição dos quartis com a delimitação dos valores máximo e mínimo pelos traçados horizontais. * e *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo PBS (controle) com p < 0, 05 e 0,001 (ANOVA de 2 vias seguido de teste de comparação múltipla Bonferroni).

Além disso, é possível constatar que existe, também, uma inter-relação entre o aumento de volume da pata ipsilateral com o aumento da contralateral nos animais onde a lateralização ocorreu, considerando simétricos os animais que aos 21 dias do modelo tiveram um aumento de volume na pata contralateral $\geq 30\%$ em relação ao seu volume basal (Figura 13 Painel A). Logo, o aumento de volume da pata ipsilateral constrói uma correlação com a variável de aumento de volume contralateral nos indivíduos simétricos ($p = 0,0004$) (Figura 13 Painel B).

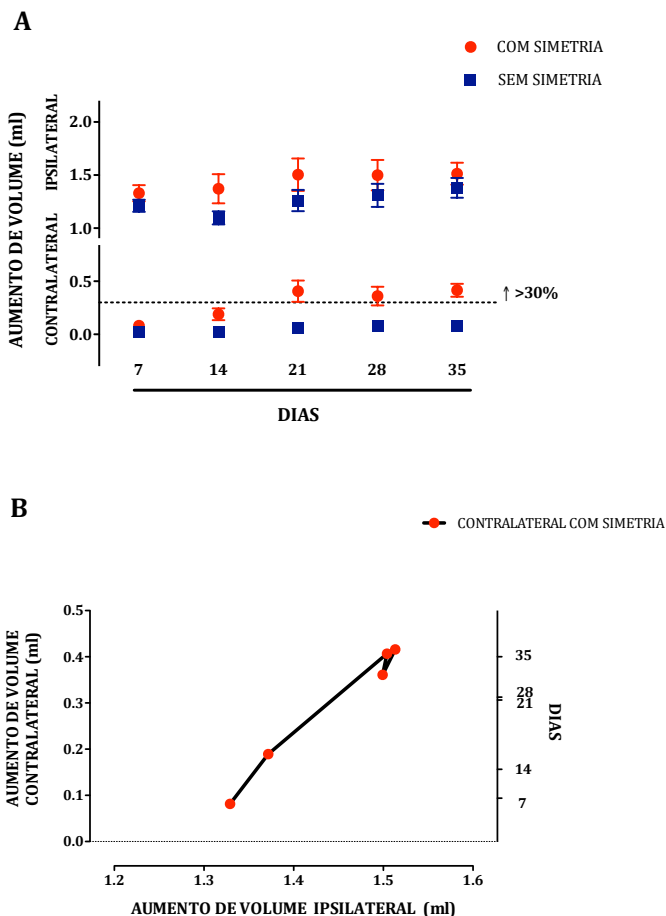


Figura 13: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral no modelo de CFA.

A: Os valores representam o aumento médio \pm EPM do volume da pata ipsilateral e contralateral de animais que apresentaram ou não simetria ($n = 8$) no modelo de CFA simétrico ($250 \mu\text{g}$). O traçado delimita o aumento de volume na pata contralateral $\geq 30\%$ em relação ao seu volume basal. **B:** Os pontos representam a média do aumento de volume contralateral pela correlação de Pearson r ($p = 0,0004$) em animais que desenvolveram inflamação articular bilateral ($n = 8$).

Quanto ao grau de atividade da microglia, na medula espinhal, 3 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, um aumento no imunoconteúdo de Iba-1 foi observado nos animais que receberam 250 μg de *M. tuberculosis* em comparação aos animais naives ou 500 μg , tanto para a contagem total quanto para a diferencial dos hemisférios ipsilaterais e contralaterais (Figura 14. Painel A). Na dose de 500 μg , a quantificação diferencial para os hemisférios medulares, revelou, principalmente, uma redução da ativação no lado contralateral em comparação aos animais naives e CFA (250 μg) (Figura 14. Painel B).

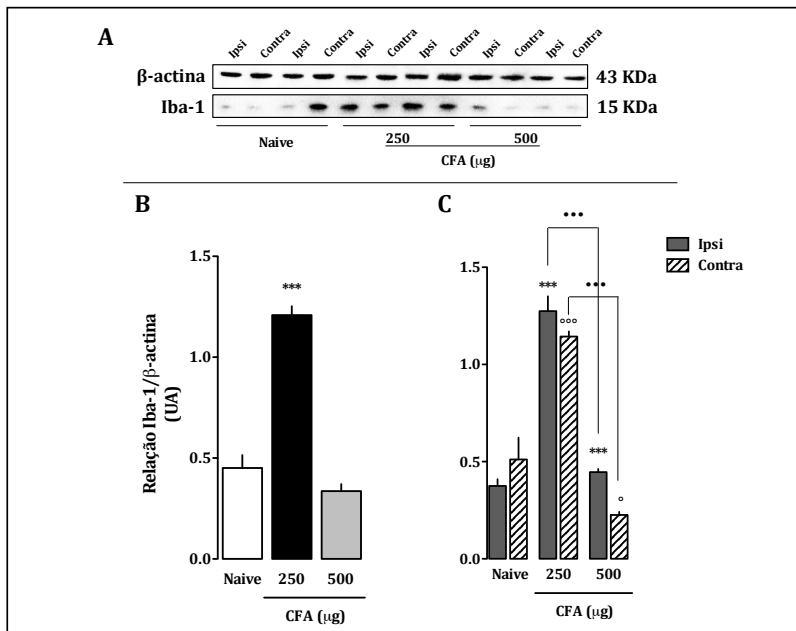
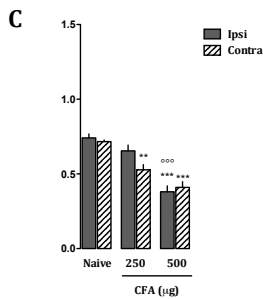
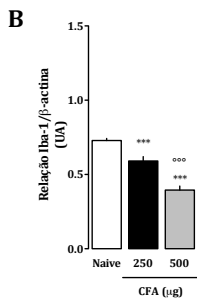
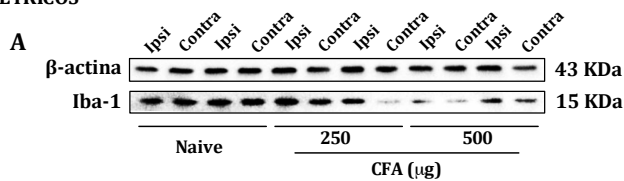


Figura 14: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g ou 500 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** representa os valores do Pannel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo naive ipsilateral com $p < 0,001$. ° e °°° indicam a diferença estatística em relação ao grupo naive contralateral com $p < 0,05$ e $0,001$. *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo CFA 250 μ g com $p < 0,001$ (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

A mesma quantificação aos 24 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, porém de forma diferenciada entre animais simétricos e assimétricos do modelo, revelou uma menor imunodeteção da ligação do anticorpo Iba-1 por Western Blotting nos animais simétricos e em ambas as doses, sendo essa diferença mantida no hemisfério contralateral do grupo CFA 250 μg e nos dois hemisférios do grupo CFA 500 μg em comparação aos animais naives (Figura 15. Painel Simétricos). Em relação aos animais assimétricos, essa redução na imunodeteção foi encontrada, porém, somente no grupo do CFA 500 μg e em ambos os hemisférios (Figura 15. Painel Assimétricos).

SIMÉTRICOS



ASSIMÉTRICOS

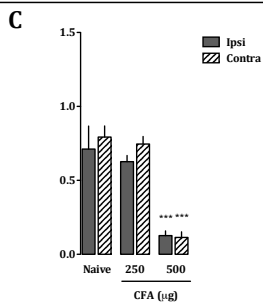
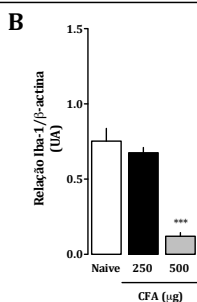
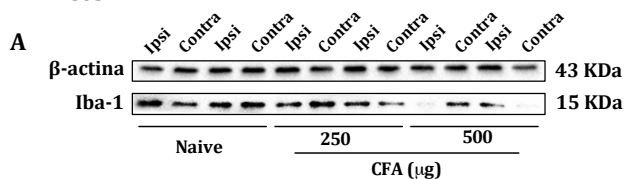


Figura 15: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata.

Painel Simétricos. A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g ou 500 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** representa os valores do Painel B diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo naive com $p < 0,001$. °°° indicam a diferença estatística em relação ao grupo CFA 250 μ g com $p < 0,001$. (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

Painel Assimétricos. A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g ou 500 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** representa os valores do Painel B diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). ** e *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo naive com $p < 0,01$ e $0,001$. (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

Por conseguinte, na avaliação histológica das patas, ipsilateral e contralateral, da dose de 250 μg de *M. tuberculosis* foi possível observar, em ambos os membros, muitas das mudanças patológicas presentes em processos artríticos crônicos. Essas mudanças incluem indicativos de inflamação e degeneração como: abundante extensão do infiltrado leucocitário mononuclear, edema tissular disperso pelo tecido conjuntivo, hiperplasia sinovial, degeneração de cartilagem e de ossos com presença de uma matriz óssea fragmentada e desorganizada e, um aumento do espaço medular. Na pata ipsilateral o grau de inflamação e degeneração foi maior em relação a contralateral homóloga. Em contrapartida, as patas de animais naives demonstraram ausência de processos inflamatórios com preservação da integridade da matriz óssea, da superfície articular, dos osteócitos, dos condrócitos, dos espaços medulares e articulares.

Os valores qualitativos dos escores histológicos para as patas ipsilateral e contralateral de animais naive e CFA estão indicados na Tabela 1. As imagens de microscopia óptica de ambas as patas representativas de cada grupo estão nas figuras 16 e 17.

	Grau de inflamação				Grau de degeneração			
	Ipsi		Contra		Ipsi		Contra	
	Naive	CFA	Naive	CFA	Naive	CFA	Naive	CFA
Mínimo	0	3	0	0	0	2	0	2
25%	0	3,5	0	0,75	0	2,75	0	2
Mediana	0	4	0	1,5	0	3,5	0	2,5
75%	0	4	0	2	0	4	0	4
Máximo	0	4	0	2	0	4	0	4

Tabela 1: Valores dos escores histológicos de patas ipsilateral e contralateral de animais naive e CFA (n = 5 por grupo) (250 μg de *M. tuberculosis*) após 35 dias da inoculação do agente.

IPSILATERAL

NAIVE

CFA

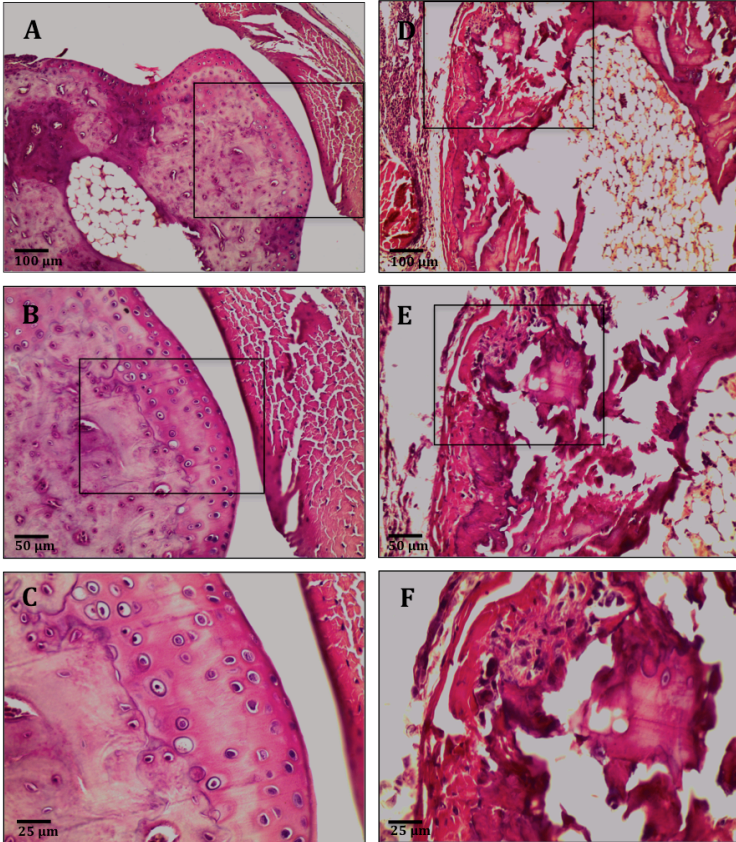


Figura 16: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores direitas de ratos naive e CFA.

A: O corte histológico representativo do grupo naive ou controle negativo demonstra tecido integro com preservação da cartilagem, ossos e medula. Os painéis **B** e **C** correspondem as imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel A e B. **D:** O corte histológico representativo do grupo CFA revela acentuado infiltrado inflamatório mononuclear, edema tissular, destruição da cartilagem e erosão óssea. Os painéis **E** e **F** correspondem as imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel D e E. Coloração Hematoxilina-eosina.

CONTRALATERAL

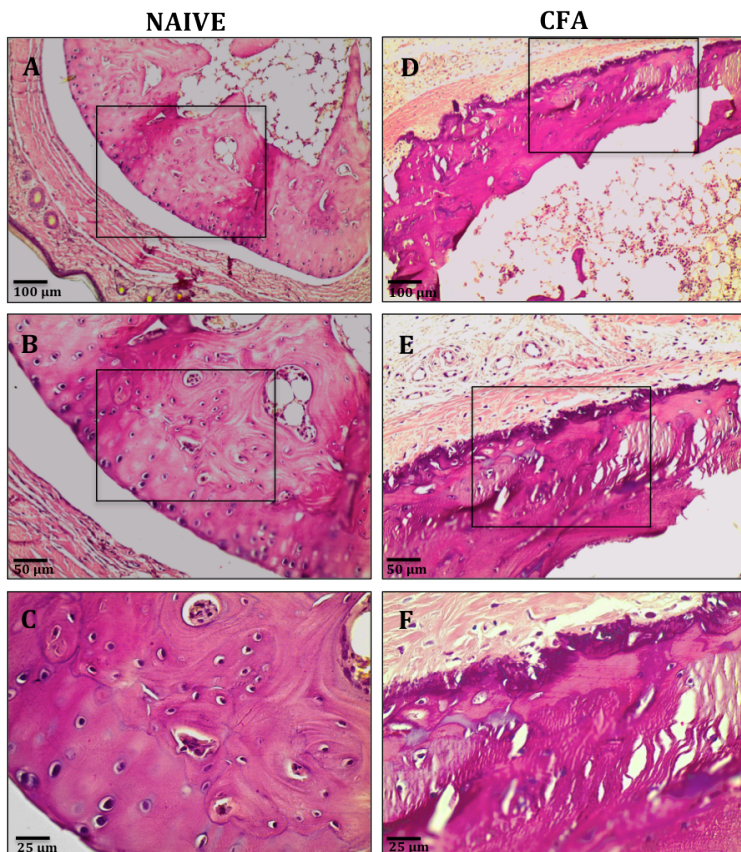


Figura 17: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores esquerdas de ratos naive e CFA. .

A: O corte histológico representativo do grupo naive ou controle negativo demonstra tecido íntegro com preservação da cartilagem, ossos e medula. Os painéis **B** e **C** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel A e B. **D:** O corte histológico representativo do grupo CFA revela infiltrado inflamatório mononuclear moderado, destruição da cartilagem, erosão óssea de padrão fibrilar e morte de condrócitos com lacuna aparente. Os painéis **E** e **F** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel D e E. Coloração Hematoxilina-eosina.

Essas alterações patológicas, observadas pela histologia do tecido, assemelham-se aos processos degenerativos dos quadros artríticos e associam-se com o aumento do volume de membro, corroborando para a utilização do edema como representativo da magnitude dos danos teciduais encontradas neste modelo.

A dose de 250 µg de *M. tuberculosis* foi considerada ideal para os diferentes protocolos subsequentes, pois permitiria induzir tanto potencialização quanto inibição do edema articular contralateral sem provocar danos excedentes na pata ipsilateral e ainda, com presença de ativação microglial ipsi e contralateral para o estudo do papel dessa célula na lateralização da artrite no modelo de CFA.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE NMDA PARA VERIFICAR O PAPEL DA HIPEREXCITABILIDADE NEURONAL NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA POR CFA

O envolvimento de aminoácidos excitatórios na transmissão da informação nociceptiva a partir dos neurônios aferentes primários da medula espinhal é suportado por um número considerável de estudos (CARPENTER; DICKENSON, 2001; DICKENSON; CHAPMAN; GREEN, 1997; YOSHIMURA; JESSELL, 1990). Esses circuitos neuronais entretanto, além de transmissão, estão envolvidos na modulação do desenvolvimento e manutenção da sensibilização de neurônios da medula espinhal (CODERRE; MELZACK, 1992; DICKENSON; SULLIVAN, 1987) e com o RRD (REES et al., 1994, 1996). Conseqüentemente, interferem em processos inflamatórios (XU et al., 2007; YOSHIMURA; JESSELL, 1990), especialmente através dos receptores NMDA (NMDAR) amplamente distribuídos pelo sistema nervoso (MONAGHAN; COTMAN, 1985; MONYER et al., 1994). Essa sensibilização, decorrente da ativação de receptor NMDA, tem sido relacionada ao fenômeno de *wind-up*, um aumento na atividade elétrica dos neurônios da medula espinhal e `a sensação de dor, independente da entrada de informação no nociceptor primário (HERRERO, 2000).

A identificação de receptores glutamatérgicos na membrana pré-sináptica de fibras aferentes primárias associadas `a nocicepção e `a hiperalgesia criam a hipótese de que o glutamato liberado na

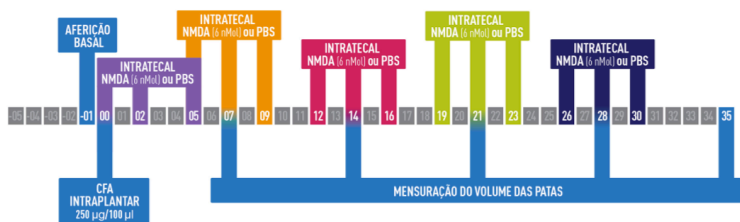
fenda sináptica (CARLTON; HARGETT; COGGESHALL, 1995; MA; HARGREAVES, 2000) pode, também, ativar os receptores expressos nos terminais centrais desses neurônios (LI et al., 2004), um conceito denominado de sensibilização retrógrada pelo glutamato (FERREIRA; LORENZETTI, 1994) que é verificado pela despolarização neuronal induzida pelo próprio glutamato (LOVINGER; WEIGHT, 1988) e de maneira retrógrada (FERREIRA; LORENZETTI, 1994, 1996; PARADA et al., 2003), reforçando o papel glutamatérgico na hiperalgesia mecânica inflamatória aguda e persistente em pata de rato (LI et al., 2004; ZHOU; BONASERA; CARLTON, 1996).

Enquanto a injeção IT de glutamato, NMDA ou AMPA induz hiperalgesia mecânica nas patas posteriores de ratos, em um modo dependente de dose, a administração IT dos antagonistas de NMDA, mas não do antagonista do receptor de AMPA, inibiu essa hiperalgesia induzida por PGE2 ou carragenina (FERRARI et al., 2014). Esses resultados sugerem que a manutenção da sensibilização do nociceptor por estímulos inflamatórios depende de uma ação contínua do glutamato na medula, provavelmente, através dos receptores pré-sinápticos do tipo NMDA (FERREIRA; LORENZETTI, 1994, 1996).

Assim, considerando essa possibilidade de uma sensibilização retrógrada nos neurônios primários por NMDA na medula (FERREIRA; LORENZETTI, 1994, 1996), levantou-se a hipótese de um aumento da indução da lateralização da artrite induzida por CFA com a administração IT de NMDA (Sigma, Missouri, USA) na dose indutora de alodinia e hiperalgesia em pata de ratos (6 nMol) (SATO et al., 2003) em diferentes dias ($n=8$ $f=0,99$). Posteriormente, ampliou-se essa avaliação para doses crescentes (10 e 100 fMol, 1 pMol e 500 pMol, 1, 6, 12 e 24 nMol) em tempos diferentes do modelo (0, 2 e 5 dias). A dose máxima utilizada foi inferior a dose conhecida por causar hiperexcitabilidade de tecido nervoso (32 nMol), identificada por movimentos em círculos e aumento da locomoção (CODERRE; MELZACK, 1992; FERREIRA; LORENZETTI, 1994; PARADA et al., 2003; SATO et al., 2003).

Os desenhos experimentais dos protocolos estão representados na Figura 18.

A



B



Figura 18: Desenho experimental do protocolo de NMDA intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

A: Os animais foram tratados com NMDA (6 nMol em 10 µl de PBS) ou PBS (10 µl) (n=8) em esquemas independentes nos dias 0, 2 e 5; 5, 7 e 9; 12, 14 e 16; 19, 21 e 23 ou 26, 28 e 30 após a injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0. O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21 e 35. **B:** Os animais foram tratados com NMDA (10 ou 100 fMol, 1 ou 500 pMol e 1, 6, 12 ou 24 nMol) ou PBS (10 µl) (n=8) nos dias 0, 2 e 5 após a injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0. O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21, 28 e 35.

A administração intratecal de NMDA (6 nMol), nas diversas variações de tempo, não interferiu no aumento de volume de ambas as patas posteriores comparada com a administração do veículo (PBS, 10 µl) (Kruskal-Wallis) (Figura 19).

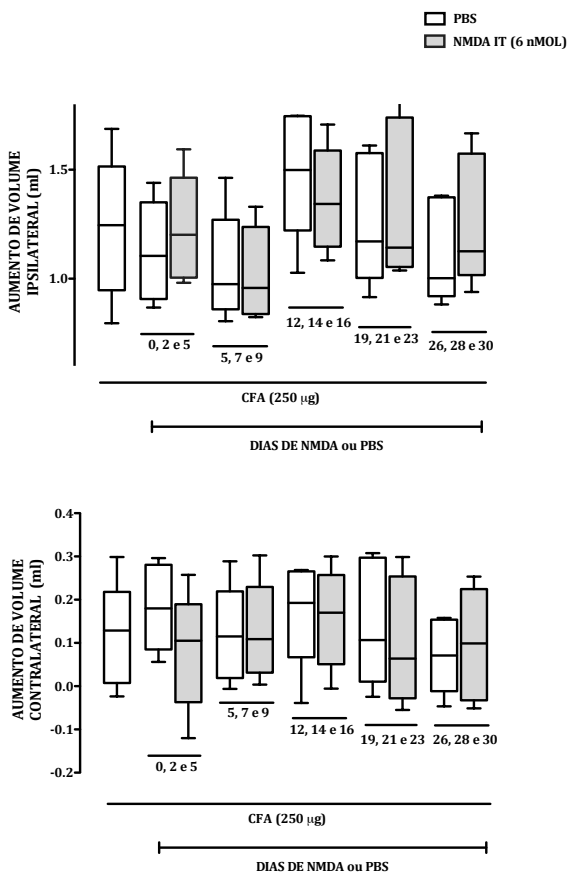


Figura 19: Efeito da administração intratecal de NMDA no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral.

Os animais foram tratados com NMDA (6 nMol em 10 µl de PBS) ou PBS (10 µl) em esquemas independentes nos dias 0, 2 e 5; 5, 7 e 9; 12, 14 e 16; 19, 21 e 23 ou 26, 28 e 30 após a injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo.

O esquema de administração de NMDA IT nos dias 0, 2 e 5, mesmo que não tenha interferido no modelo de CFA, foi novamente testado com doses crescentes do aminoácido excitatório (10 ou 100 fMol, 1 ou 500 pMol e 1, 6, 12 ou 24 nMol). Não houve diferença entre o controle e os animais tratados nas patas direita e esquerda (Kruskal-Wallis) (Figura 20).

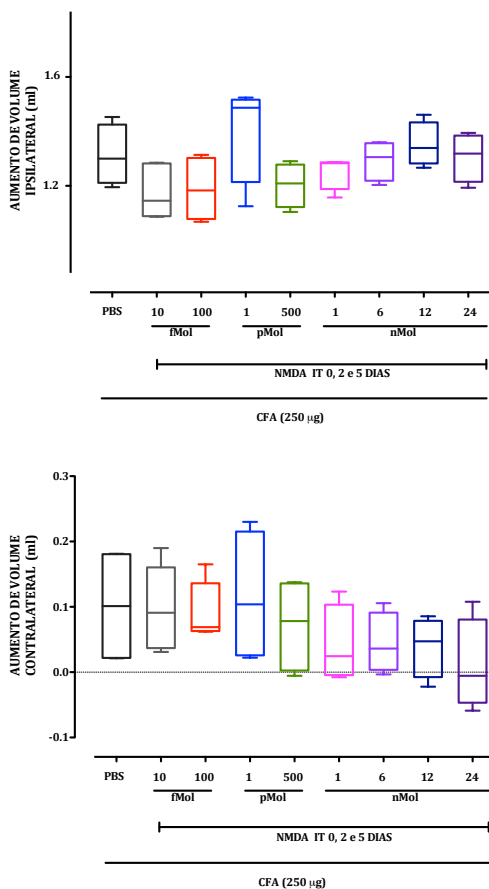


Figura 20: Efeito da administração intratecal de doses crescentes de NMDA no aumento do volume da pata ipsilateral e contralateral.

Os animais foram tratados com NMDA (10 ou 100 fMol, 1 ou 500 pMol e 1, 6, 12 ou 24 nMol em 10 µl de PBS) ou PBS (10 µl) nos dias 0, 2 e 5 após a injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE RESINIFERATOXINA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DAS FIBRAS TRPV1 NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA POR CFA

O TRPV1 é um canal de cátion não seletivo com elevada permeabilidade ao Ca^{2+} , sendo, predominantemente, expresso em uma população de neurônios de pequeno calibre (fibras C e A δ) responsáveis pela transmissão de estímulos dolorosos polimodais da periferia para o SNC (CATERINA et al., 1997) e pelo RRD (WILLIS JR., 1999). Mais ainda, a maioria das fibras que expressam TRPV1 coexpressam SP e CGRP (KOMURA et al., 2005). A dessensibilização dessas fibras por agonistas TRPV1 tem contribuído para a compreensão das funções fisiológicas dos neuropeptídeos liberados, uma vez que a excitotoxicidade pelo excesso de Ca^{2+} via esse receptor, nos terminais nervosos periféricos ou centrais, previne a geração de potenciais de ação e impossibilita a sua capacidade de transmissão (JEFFRY et al., 2009; OLAH, 2001; PREMKUMAR, 2010; RAISINGHANI; PABBIDI; PREMKUMAR, 2005).

A resiniferatoxina (RTX), um diterpeno obtido a partir do látex da *Euphorbia resinifera cacto* (Euphorbiaceae), é o mais potente agonista conhecido do canal TRPV1 (APPENDINO; SZALLASI, 1997). Em neurônios do DRG, esse agonista ativa correntes de forma robusta com uma $\text{EC}_{50} = 39$ nM enquanto um outro agonista, a capsaicina, ativa TRPV1 em concentrações muito mais elevadas ($\text{EC}_{50} = 710$ nM) (CATERINA et al., 1997). Esse potente agonista TRPV1 foi isolado, pela primeira vez, por Hergenhahn e colaboradores em 1975 (HERGENHAHN; ADOLF; HECKER, 1975). Apesar de apresentar uma estrutura análoga a promotores de tumor (DRAY; BETTANEY; FORSTER, 1990), a RTX não parece ser um promotor tumoral (ELLIS et al., 1987), pois não compete com ésteres de forbol pelo sítio de ligação de PKC (DRIEDGER; BLUMBERG, 1980a, 1980b) devido à substituição de um grupo hidroxila importante para essa atividade (HECKER, 1978). Essa substituição é muito semelhante à encontrada também, na capsaicina (SZOLCSÁNYI; JANCÓS-GÁBOR, 1975).

Em culturas de células primárias de DRG, a administração de RTX tem sido relatada por produzir influxo prolongado de Ca^{2+} ,

resultando em citotoxicidade e morte seletiva de neurônios que expressam TRPV1 (OLAH, 2001). A RTX é uma droga altamente lipofílica e esta, talvez, é a característica responsável pela lenta, mas prolongada ativação de seu receptor (JEFFRY et al., 2009; KISSIN, 2008; SIKAND; PREMKUMAR, 2007). Os estudos anteriores demonstraram que a administração intratecal de RTX induzia analgesia de longa duração, confirmando essa possibilidade de ablação do terminal nervoso (BROWN et al., 2005; JEFFRY et al., 2009; KISSIN, 2008; MISHRA; HOON, 2010; NEUBERT et al., 2008; PREMKUMAR, 2010). Os estudos mais recentes relatam que, com doses mais baixas (1,9-3,8 µg/kg) de RTX via IT, é possível abolir a imunorreatividade para TRPV1, SP e CGRP na medula espinhal no segmento administrado (L4—L6). Entretanto, a imunorreatividade no DRG correspondente não é diminuída, mantendo, assim, as funções eferentes de liberação basal e evocada de SP e CGRP na periferia (BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011; JEFFRY et al., 2009). Esses efeitos na imunorreatividade e nos comportamentos nocifencivos relacionados à ativação desse receptor permanecem por longos períodos, continuando após 5 meses do tratamento IT (JEFFRY et al., 2009).

Sendo assim, a fim de, avaliar o papel do terminal aferente de fibra capsaicina sensível da medula espinhal na indução de simetria do modelo de artrite por CFA, os animais (n=8 f=0,96) receberam, 5 dias antes do CFA, uma administração IT de RTX (Tocris, Bristol, UK) na dose de 3,8 µg/kg que com base no peso médio dos animais desse protocolo (200 g) foi de 760 ng de RTX diluído em 9,4 µl de PBS e 0,6 µl de Tween 7% ou somente o veículo (10 µl). Esse protocolo respeita a dosagem que, teoricamente, proporciona a ablação somente do terminal central (BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011; JEFFRY et al., 2009). À vista disso, o resultado contribuiria para o entendimento do envolvimento das fibras sensoriais TRPV1 nesse processo de simetria do modelo de CFA unilateral incluindo aspectos sobre a origem medular desse evento.

Para o controle da eficácia da ablação nervosa TRPV1 positiva, 3 dias após a administração IT de RTX ou veículo, um grupo de animais (n=6 f=0,99) receberam uma injeção na região plantar direita de capsaicina (2 mM) (Fluka Analítica pela Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) em 20 µl de etanol. A ativação de TRPV1, pela

injeção de capsaicina, resulta em comportamentos nocifencivos característicos como chacoalhar, lamber e levantar a pata que foram utilizados como referência para validar a indução da dessensibilização. Para tal, na sequência da injeção de capsaicina, os animais foram colocados por 5 minutos em uma caixa de acrílico transparente (28,5 cm X 28,5 cm e 29,5 cm de altura) com espelhos externos que refletem uma imagem da parte inferior da caixa, ou seja, da região plantar das patas. Essa caixa estava instalada em uma sala de captação de imagem com iluminação incandescente (16W). No intervalo entre as sessões de teste e/ou de ambientação, a caixa era limpa com álcool 10%. A análise posterior das imagens quantificou os comportamentos nocifencivos evocados pela capsaicina em ambos os grupos.

As amostras de patas foram obtidas para a histologia. O desenho experimental desse protocolo está representado na figura 21.



Figura 21: Desenho experimental do protocolo de resiniferatoxina intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com RTX (760 ng) ou veículo (n=14) 5 dias antes da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl). Aos 3 dias, também anteriores ao CFA, foi realizado o teste comportamental de capsaicina na pata (2 mM) (n=6). O CFA (250 µg/100 µl) foi administrado no dia 0 (n=8). O volume das patas foi mensurado nos dias -5, 7, 14, 21, 28 e 35. As patas foram coletadas no dia 35 (n=5).

A administração de RTX reduziu o número de comportamentos evocados pela injeção de capsaicina (2 mM) como levantar ($p = 0,0001$), chacoalhar ($p = 0,0009$) e lamber ($p = 0,004$) de pata em comparação ao grupo veículo (Figura 22) demonstrando que, o efeito mediado pela ativação de TRPV1 pode ser afetado pela administração de RTX IT, validando o tratamento de ablação química empregado.

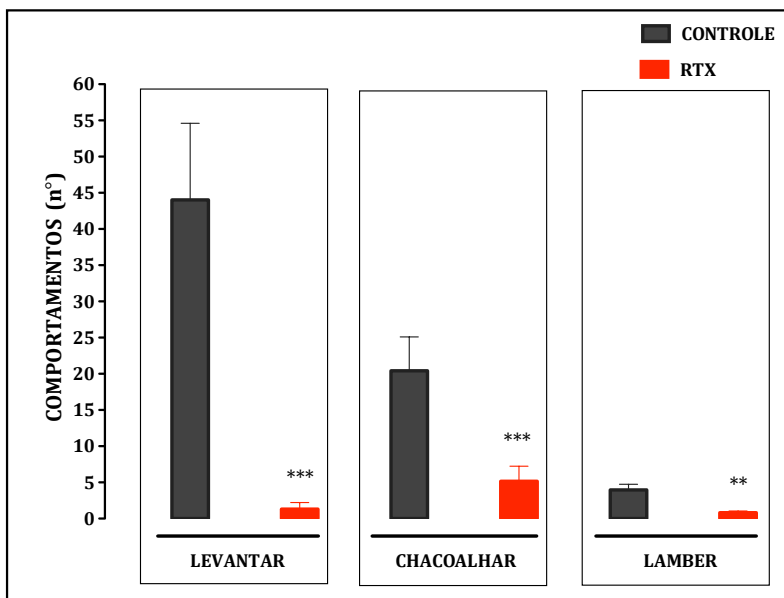


Figura 22: Efeito da administração de resiniferatoxina intratecal nos comportamentos nocifêncios induzidos pela capsaicina na pata de ratos Wistar (fêmeas).

A neurotoxina (760 ng de RTX em 10 μ l de Tween 7% e PBS, na proporção de 6% de Tween e 94% de PBS) ou veículo (10 μ l) foram administrados pela via IT 3 dias antes do teste comportamental de capsaicina na pata (2 mM). Cada coluna representa os valores médios ($n = 6$) \pm EPM de comportamentos nocifêncios evocados pela capsaicina. ** e *** indicam a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,01$ e 0,001 (Mann-Whitney).

Por conseguinte, no modelo de relação do estímulo ipsi e alterações inflamatórias contralaterais, o protocolo RTX resultou num aumento de volume da pata ipsilateral ($p = 0,03$) e uma redução do volume na contralateral comparado ao grupo controle ($p = 0,03$) no período total de 35 dias após CFA, conforme está demonstrado na figura 23.

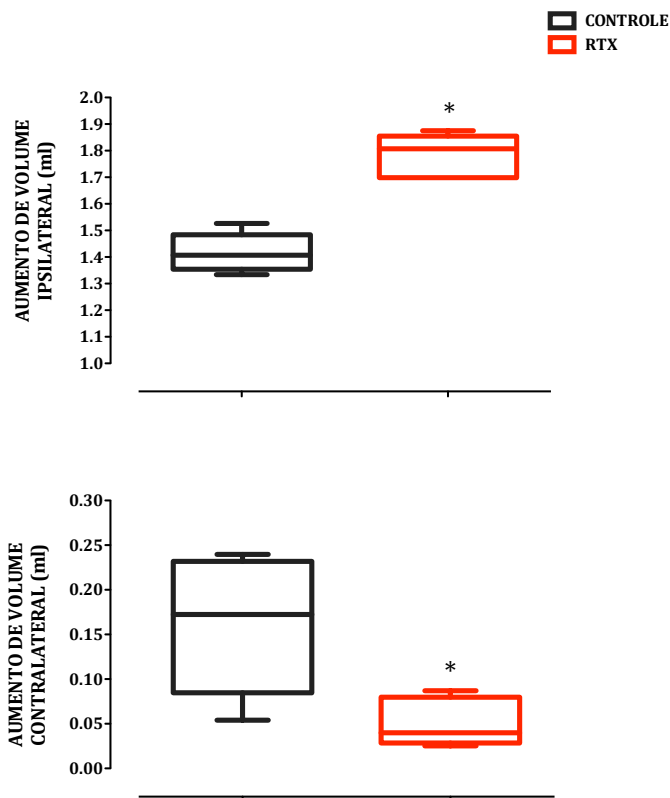


Figura 23: Efeito da administração da resiniferatoxina intratecal no aumento de volume de pata ipsi e contralateral.

A ablação do terminal nervoso de fibras TRPV1 contribuiu para o aumento de volume de pata ipsilateral e redução do aumento da contralateral. Os animais foram tratados com RTX (760 ng em 10 μ l de Tween 7% e PBS, na proporção de 6% de Tween e 94% de PBS) ou veículo (10 μ l) 5 dias antes da injeção intraplantar de CFA (250 μ g/100 μ l). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,05$ (Mann Whitney).

A avaliação histológica das patas ipsilaterais de animais tratados previamente com RTX identificou um processo inflamatório intenso, caracterizado por extenso infiltrado inflamatório e edema tissular abundante, a degeneração de ossos e cartilagens ocorreu com invasão do tecido conjuntivo no tecido ósseo e, o aumento do canal medular caracterizou-se pela perda de tecido adiposo (Figura 24. Painel A, B e C). Entretanto, a pata contralateral, diferentemente, da pata contralateral de animais controle (Figura 17. Painel D,E e F), demonstraram um padrão de tecido do tipo íntegro sem ou com poucos sinais de inflamação (Figura 24. Painel D, E e F).

Os valores qualitativos dos escores histológicos para as patas ipsilaterais e contralaterais de animais RTX estão indicados na Tabela 2.

	Grau de inflamação		Grau de degeneração	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Mínimo	2	0	1	0
25%	2,75	0	1	0
Mediana	4	0	2	0
75%	4	0,25	3,5	0,25
Máximo	4	1	5	1

Tabela 2: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais pré-tratados (24 horas antes do CFA com resineratoxina intratecal.

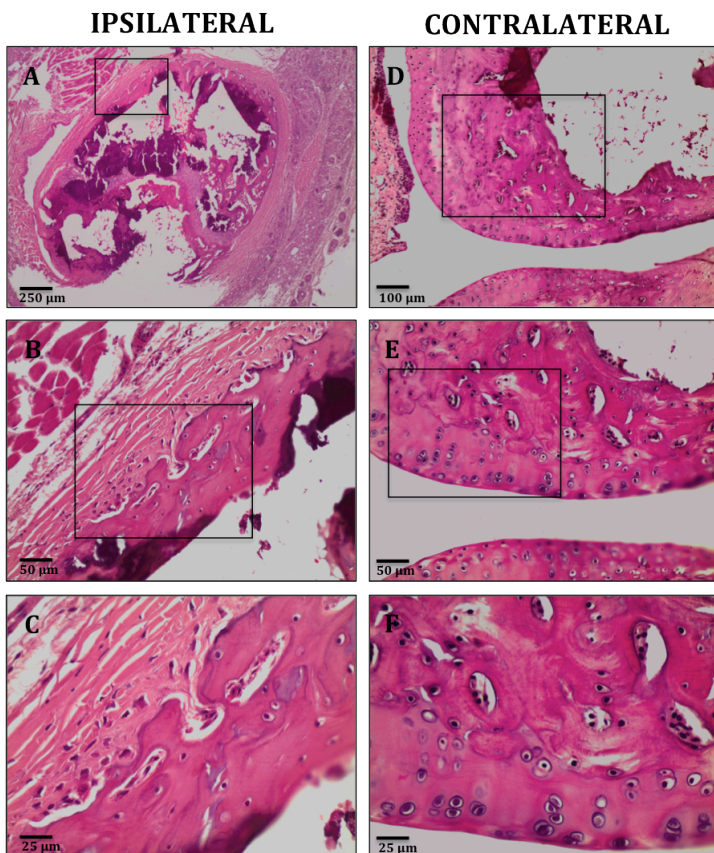


Figura 24: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos pré-tratados com resiniferatoxina intratecal.

A: O corte histológico representativo do grupo RTX demonstra presença marcante de infiltrado inflamatório mononuclear, edema tissular abundante, tecido ósseo danificado com perda da matriz óssea e ossos sendo invadidos por tecido conjuntivo do tipo sinovial. Os painéis **B** e **C** correspondem a imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Paineis **A** e **B**. **D:** O corte histológico representativo do grupo RTX contralateral revela ausência de infiltrado inflamatório mononuclear, de destruição da cartilagem e de erosão óssea. Os painéis **E** e **F** correspondem a imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Paineis **D** e **E**. Coloração Hematoxilina-eosina.

4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE BUMETANIDA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DO NKCC1 NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA POR CFA

Mesmo considerando a diversidade de fatores que interferem na expressão do NKCC1 (GILBERT et al., 2007), algumas características favorecem a interpretação dos achados experimentais relacionados a essa proteína, como a expressão, quase que exclusiva, no sistema nervoso (BALLANYI; GRAFE, 1985; HARA et al., 1992; JANG; JEONG; AKAIKE, 2001; MISGELD et al., 1986) nas regiões fundamentais para o processamento nociceptivo, o corno dorsal da medula espinhal e o DRG (CHABWINE et al., 2009; GILBERT et al., 2007; KANAKA et al., 2001; PRICE; HARGREAVES; CERVERO, 2006; TOYODA et al., 2005), mais especificamente, com predomínio nos neurônios de pequeno e médio calibre, coexpressando TRPV1, SP e CGRP (PRICE; HARGREAVES; CERVERO, 2006), elementos essenciais para a deflagração do RRD. Além do que, o NKCC2 é expresso, exclusivamente, no rim (CASTROP; SCHNERMANN, 2008) e não está envolvido com sistemas sensoriais.

Quanto aos quatro tipos de KCC (KCC1 a KCC4), somente KCC2 recebe a maior atenção da comunidade científica por ser expresso na retina, córtex, cerebelo e no corno dorsal da medula espinhal (KARADSHEH et al., 2004; PAYNE; STEVENSON; DONALDSON, 1996; PEARSON et al., 2001), bem como em tipos de células não neuronais, tais como as células gliais e os oligodendrócitos (KARADSHEH et al., 2004; PEARSON et al., 2001). Vale citar que o RNAm de KCC2 não foi observado no corno dorsal da medula espinhal (KANAKA et al., 2001), porém, funcionalmente, o bloqueio de KCC2, no processamento nociceptivo, transformou a compreensão do papel da inibição da medula espinhal em estados de dor crônica (COULL et al., 2003). O KCC1, o 3 ou o 4, até o momento, não estão envolvidos no processamento nociceptivo. No nascimento, os KCCs são geralmente expressos em níveis baixos e, eventualmente, aumentam para os níveis mais elevados encontrados nos adultos logo após a primeira semana pós-natal (STEIN et al., 2004).

A fim de elucidar a importância do NKCC1, no modelo de simetria do CFA unilateral e por convergência o papel do RRD no

modelo de artrite simétrica, o cotransportador foi bloqueado seletivamente por um composto diurético, a bumetanida, que tem até 500 vezes mais afinidade para NKCC1 (Ki 0,1 μM) do que para KCC2 (PAYNE et al., 2003) e em baixas concentrações ($\approx 10 \mu\text{M}$), é considerado específico para NKCC1 (RUSSELL, 2000). A solubilidade é favorecida em soluções alcalinas e aquecidas (BUCKLEY, 1989). Sendo assim, nos dias 0 e 1 ou 0, 1 e 2 ou 0, 1, 2 e 3 ou 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA na pata, os animais ($n=8$ $f=0,99$) receberam uma administração IT de bumetanida (BMT) (Suzhou Lixin Pharmaceutical, Jiangsu, China) na dose de 60 μg (1,16 μM) diluída em bicarbonato de sódio 1,29% e aquecida conforme a necessidade para evitar a formação de cristais ou somente o veículo. A administração do dia 0 foi realizada 30 min após o CFA. Essa dose utilizada é conhecida por inibir a atividade do RRD, a inflamação neurogênica, a alodinia mecânica e a hiperalgesia secundária (contralateral) em modelo de capsaicina (VALENCIA-DE ITA, 2006). As datas de administração foram escolhidas para contemplar o período total registrado de ocorrência do RRD de forma bilateral no modelo de CFA (KELLY; DUNHAM; DONALDSON, 2007; MORALES-AZA et al., 2004; ZHANG; LIU; XU, 2008).

As amostras de medula e patas foram obtidas de todos os grupos, para o ensaio de *Western Blotting* e histologia, respectivamente. O desenho experimental desse protocolo está representado na Figura 25.

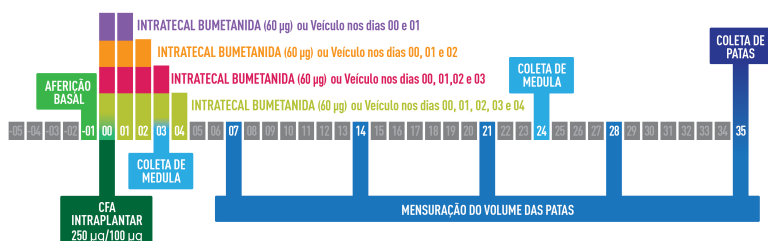


Figura 25: Desenho experimental do protocolo de bumetanida intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com BMT (60 µg) ou veículo (10 µl) nos dias 0 e 1 ou 0, 1 e 2 ou 0, 1, 2 e 3 ou 0, 1, 2, 3 e 4 após 30 min da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0 (n=8). O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21, 28 e 35. O segmento medular (L5-L6) foi retirado nos dias 3 e 24 (n=4) e as patas no dia 35 (n=5).

O efeito, no aumento de volume de pata, dos diferentes protocolos de bloqueio do cotransportador NKCC1, pela administração de bumetanida IT (60 µg/10µl bicarbonato sódio 1,29%), apresentou cinéticas diferentes nas patas ipsi e contralateral no modelo de inflamação simétrica (Figura 26 e 27. Painel A).

O efeito máximo de redução do aumento de volume da pata ipsilateral ocorreu no protocolo de 3 aplicações de bumetanida IT (Figura 26. Painel C), enquanto que na contralateral todos os protocolos reduziram o aumento de volume, sendo visualizado o efeito máximo com 5 administrações a cada 24 horas (Figura 27. Painéis B, C, D, E).

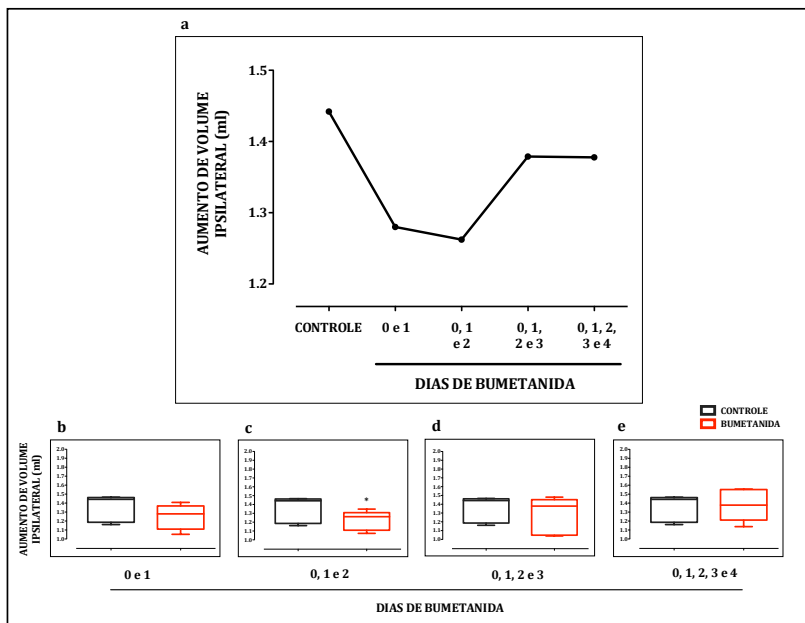
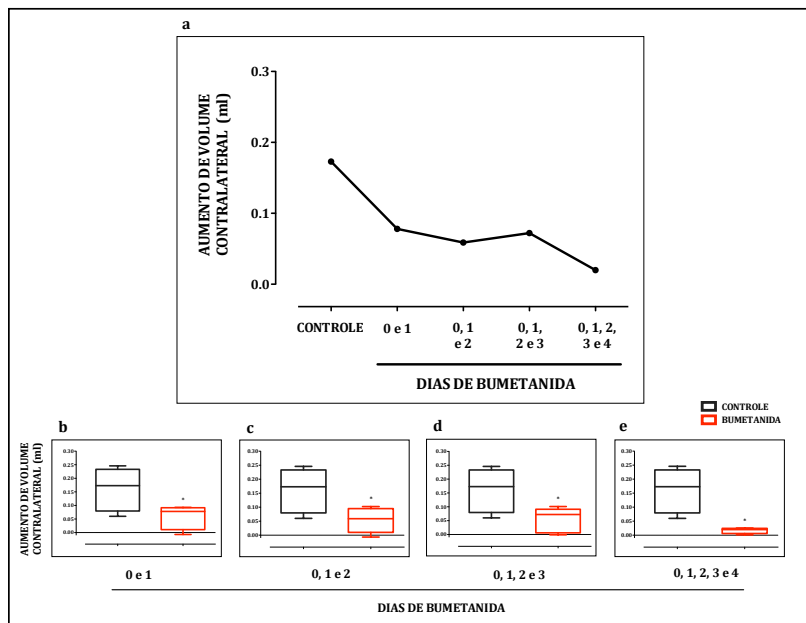


Figura 26: Comparação dos protocolos de bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral.

Os animais foram tratados com BUM (60 μg em 10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) ou veículo (10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) nos dias 0 e 1 ou 0, 1 e 2 ou 0, 1, 2 e 3 ou 0, 1, 2, 3 e 4 após a injeção intraplantar de CFA (250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). **A:** Os pontos representam a mediana do aumento de volume de pata de cada protocolo de administração de bumetanida IT em ratos Wistar (fêmeas) ($n = 8$). **B, C, D e E:** Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,05$ (Mann Whitney).



Comparativamente e de forma pontual, a representação do protocolo que resultou em efeito em ambas as patas está representado na figura 28. A administração de BUM IT, nos dias 0, 1 e 2 após o CFA, foi capaz de reduzir o aumento de volume de pata em relação ao grupo controle ($p = 0,03$) no modelo de inflamação simétrica por CFA.

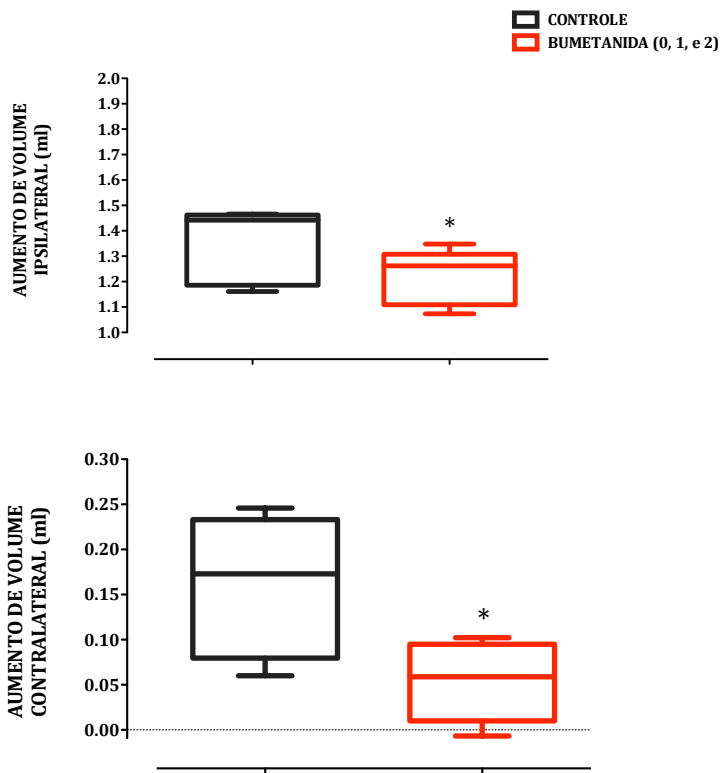


Figura 28: Efeito da administração da bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

O bloqueador do cotransportador NKCC1 reduziu o aumento de volume de pata ipsi e contralateral. Os animais foram tratados com BUM (60 μg em 10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) ou veículo (10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) nos dias 0, 1 e 2 após a injeção intraplantar de CFA (250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,05$ (Mann Whitney).

O protocolo com efeito máximo de inibição do aumento de volume na pata contralateral em relação ao grupo controle ($p = 0,03$), bem como, a falta de efeito na pata ipsilateral estão representados na Figura 29.

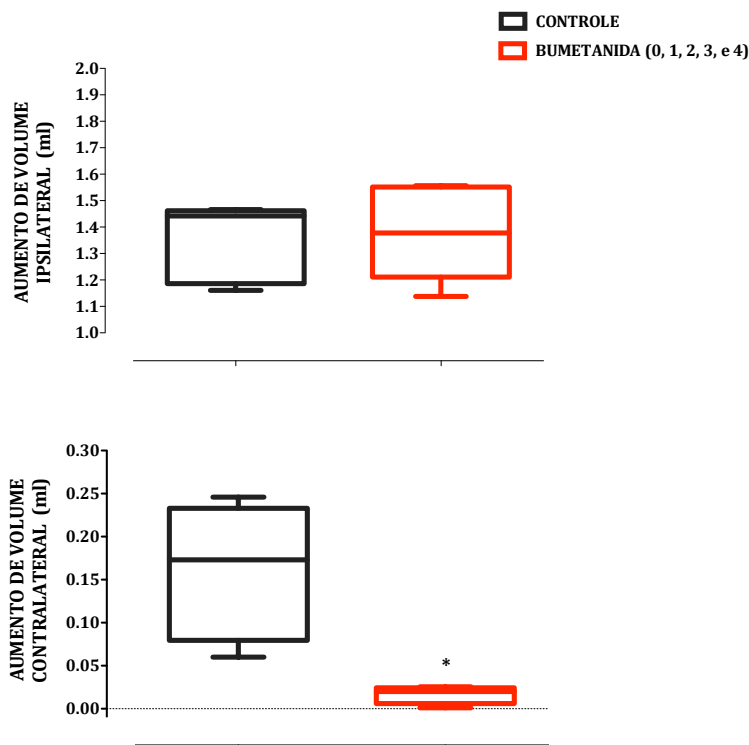


Figura 29: Efeito da administração da bumetanida intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

O bloqueador do cotransportador NKCC1 reduziu o aumento de volume de pata contralateral. Os animais foram tratados com BUM (60 μg em 10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) ou veículo (10 μl de Bicarbonato de Sódio 1,29%) nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após a injeção intraplantar de CFA (250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Cada quadrante representa a concentração da tendência central dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,05$ (Mann Whitney).

A avaliação histológica das patas ipsilaterais de animais tratados, continuamente, com bumetanida nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após a injeção intraplantar de CFA, identificou um processo inflamatório intenso, caracterizado por extenso infiltrado inflamatório mononuclear em membrana sinovial e vasos e, ainda, edema tissular abundante. Entretanto, a degeneração de ossos e cartilagens não foi proporcional ao processo inflamatório (Figura 30. Painel A, B e C) (Tabela 3), seguindo a apresentação dos animais controle (CFA) (Tabela 1). Na pata contralateral, diferentemente da pata ipsilateral, os animais demonstraram um padrão de tecido do tipo íntegro sem sinais de inflamação (Tabela 3) (Figura 30. Painel D, E e F).

Os respectivos valores qualitativos dos escores histológicos para as patas ipsilaterais e contralaterais de animais tratados com bumetanida estão indicados na Tabela 3.

	Grau de inflamação		Grau de degeneração	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Mínimo	3	0	0	0
25%	3,75	0	0	0
Mediana	4	0	1	0
75%	4	0	1	0,25
Máximo	4	0	1	1

Tabela 3: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral 35 dias após o CFA de animais tratados com bumetanida intratecal nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA .

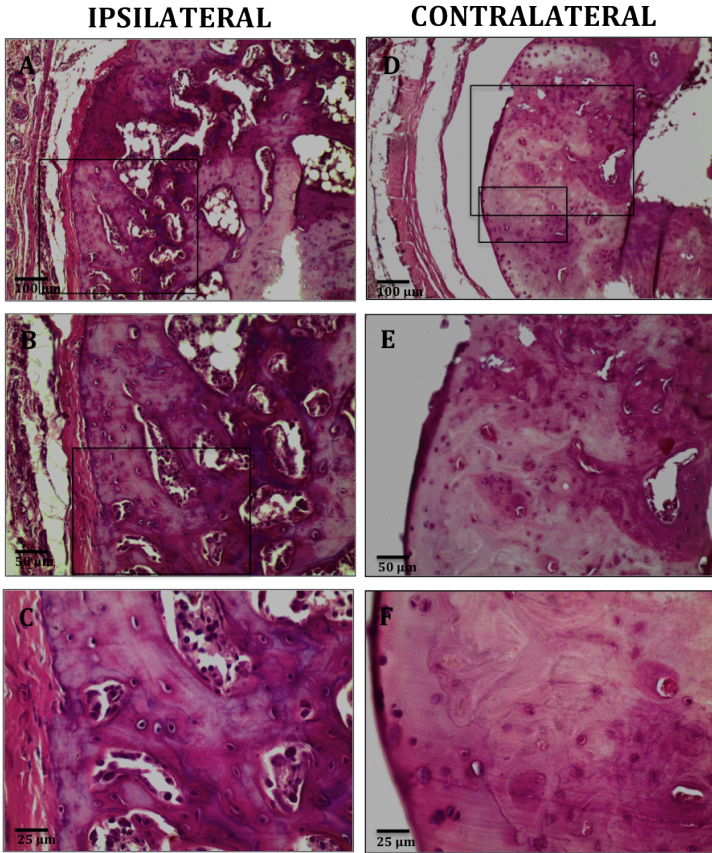


Figura 30: Imagens de microscopia óptica de articulações da pata posterior ipsilateral e contralateral de ratos tratados com bumetanida intratecal.

A: O corte histológico representativo do grupo bumetanida ipsilateral demonstra presença marcante de infiltrado inflamatório mononuclear em membrana sinovial, vasos e ossos; tecido ósseo danificado com perda da matriz cartilaginosa. Os painéis **B** e **C** correspondem as imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel **A** e **B**. **D:** O corte histológico representativo do grupo bumetanida contralateral revela ausência de infiltrado inflamatório mononuclear, de destruição da cartilagem ou de erosão óssea. Os painéis **E** e **F** correspondem as imagens ampliadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel **D** e **E**. Coloração Hematoxilina-eosina.

Quanto ao grau de atividade da microglia, na medula espinhal, houve uma redução no imunoconteúdo de Iba-1 3 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata dos animais que receberam por injeção intratecal o tratamento de bumetanida (60 µg) nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA (Figura 31. Painel A), sendo o hemisfério ipsilateral o representativo dessa redução (Figura 31. Painel C).

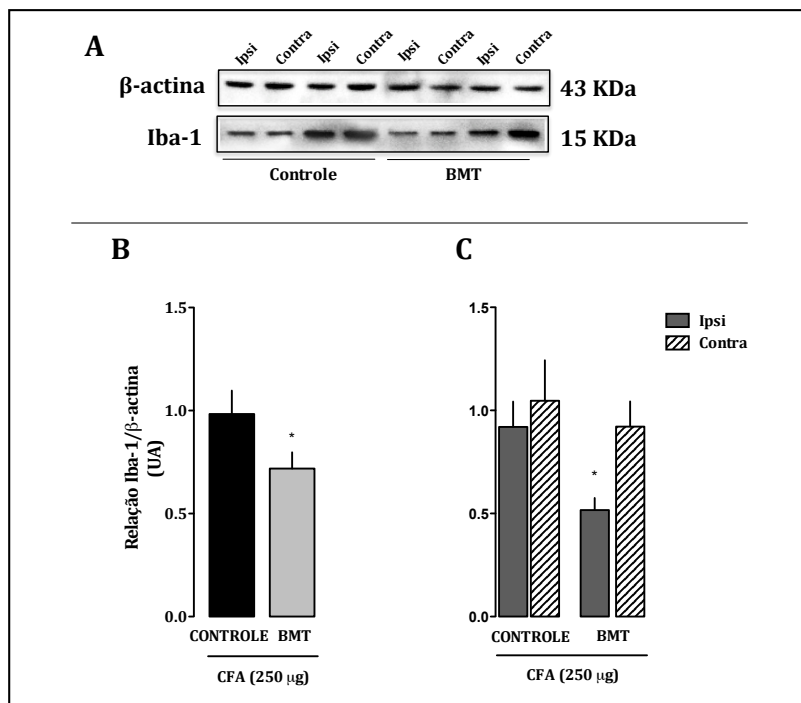


Figura 31: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de bumetanida nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). * indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ por Teste T de Student no quadro B e ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni no quadro C.

A quantificação, aos 24 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, nos animais simétricos do modelo, revelou não haver diferenças entre os tratamentos e entre os hemisférios medulares (Figura 32. Painéis B e C).

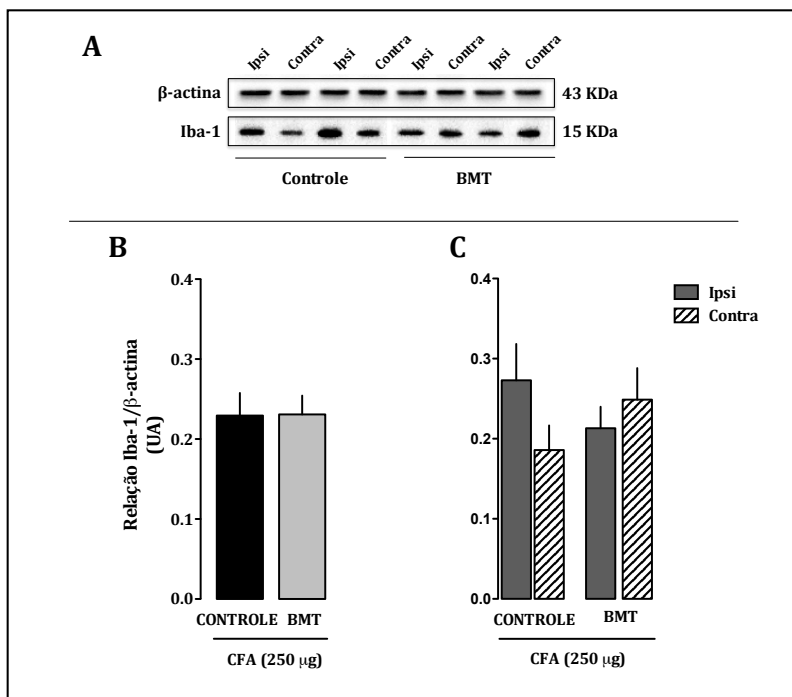


Figura 32: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de bumetanida nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após o CFA.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4).

4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE 6-ODHA INTRATECAL PARA VERIFICAR O PAPEL DA NORADRENALINA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA

Dentre as várias funções importantes do sistema noradrenérgico está a regulação da dor. Essa modulação, na medula espinhal, ocorre pelas projeções noradrenérgicas originárias em quatro regiões do cérebro: (1) o *locus coeruleus* (LC); (2) o *subcoeruleus* (SC) e (3) as células do grupo A5 e (4) A7, denominadas de células do grupo noradrenérgico dos núcleos pontinos (BLESSING et al., 1981; BYRUM; STORNETTA; GUYENET, 1984; MOORE; BLOOM, 1979; SATOH et al., 1977; SWANSON, 1976; WESTLUND et al., 1983).

O LC, por sua vez, representa a maior fração de NA cerebral, com 91% de suas células marcadas para NA. Essa região representa, aproximadamente, 45-50% do número total de células de NA no cérebro (NYGREN; OLSON, 1976; SWANSON, 1976). Estudos de marcação retrógrada na medula espinhal de ratos indicaram que uma porcentagem de neurônios do complexo *coeruleus-subcoeruleus* (58%-63%, respectivamente) enviam as projeções para a medula e, na maioria, para o corno dorsal e não ventral (COMMISSIONG; HELLSTRÖM; NEFF, 1978; GUYENET, 1980). Acredita-se, então, que a NA liberada a partir desses núcleos e via projeções descendentes atenua a dor, tanto pela ação inibitória sobre receptores α_{2A} -adrenérgicos em terminais centrais de nociceptores aferentes primários (inibição pré-sináptica), como por ação direta em receptores α_2 -adrenérgicos nos neurônios de segunda ordem de transmissão da dor (inibição pós sináptica) e/ou pela ativação de receptores α_1 -adrenérgicos de interneurônios inibitórios (MILLAN, 2002; PERTOVAARA, 2006).

Embora havendo uma série de comentários um pouco mais abrangentes do papel da NA no controle da dor, existe pouco conteúdo sobre os aspectos de integração na regulação da inflamação neurogênica, particularmente, em condições experimentais. A princípio, especula-se que os receptores α_{2A} -adrenérgicos, cuja maior densidade é encontrada no corno dorsal, especialmente, lâminas I e II, estejam envolvidos na modulação da PAD (WILLIS JR., 1999) e, por conseguinte, poderiam influenciar um evento periférico.

A neurotoxina catecolamina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) tem sido extensamente utilizada para provocar uma lesão de fibras noradrenérgicas e dopaminérgicas do SNC e SNP, sendo considerada a neurotoxina mais efetiva na denervação química em comparação aos compostos relacionados que têm sido sintetizados e testados como ferramenta de estudo do papel desses neurotransmissores (SCHWARTING; HUSTON, 1996). A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica e injeções IT em ratos adultos resultaram em perda de fibras descendentes NA distais à injeção (NYGREN; OLSON; SEIGER, 1971), com destruição de terminais contendo catecolaminas e redução dos níveis de NA em ratos fêmeas em comparação aos animais controles logo durante a primeira semana após a administração (LEI et al., 2011). Esse efeito da neurotoxina atinge o seu desempenho máximo aos 4 dias do tratamento, com o número de fibras catecolaminérgicas permanecendo baixo (8-10% dos valores de controle) mesmo depois de 6 meses após a lesão (LEI et al., 2011). As perdas das propriedades e da capacidade de gerar potenciais de ação nessas fibras também ocorrem num curto período de tempo. Os sinais de degeneração ultraestruturais são vistos 1 a 4 horas depois da administração da 6-OHDA, muito semelhantes aos observados após axotomia cirúrgica (IVERSEN; URETSKY, 1970).

Os neurônios noradrenérgicos são mais sensíveis a 6-OHDA que os neurônios dopaminérgicos (BREESE; HOWARD, 1971; BREESE; TRAYLOR, 1970; IVERSEN; URETSKY, 1970). Essa afinidade relativamente alta ocorre pela captura eficiente da neurotoxina pelo neurônio através do exclusivo sistema de captação de amina localizada na membrana axonal e nos terminais de neurônios catecolaminérgicos que agem, normalmente, para capturar e inativar as catecolaminas liberadas (THOENEN; TRANZER, 1968).

Uma vez que o mecanismo de captação está presente na membrana plasmática de todo o neurônio, o ataque citotóxico pode, em princípio, ser em qualquer parte do neurônio, dependendo do método de administração da 6-OHDA (local de injeção e concentração). Entretanto, os dados experimentais mostraram que os terminais dos nervos axonais são as estruturas mais sensíveis à ação neurotóxica, seguida dos axônios e, por último, dos corpos

celulares (BLOOM et al., 1969; HÖKFELT; UNGERSTEDT, 1973; JONSSON; SACHS, 1970; MALMFORS; SACHS, 1968).

Um outro mecanismo para a eficácia da 6-OHDA está na característica de ser facilmente auto-oxidada devido a um baixo potencial redox, essencial para a inativação de várias espécies moleculares potencialmente citotóxicas que rompem as membranas celulares e outras organelas intracelulares (HEIKKILA; COHEN, 1973). Observou-se que o consumo de oxigênio, durante a auto-oxidação da 6-OHDA, é tão rápida que a hipoxia ocorre, rapidamente, dentro do neurônio. Além disso, a 6-OHDA revelou-se um desacoplador muito potente da fosforilação oxidativa (LATCHOUMYCANDANE et al., 2011).

Resumidamente, a captação de 6-OHDA é responsável pela seletividade, enquanto que as reações de oxidação estão relacionados com a eficácia das ações citotóxicas e degenerativas da neurotoxina (SACHS; JONSSON, 1975).

Por fim, a injeção de 6-OHDA, na medula, pode ser utilizada para explorar as funções das fibras de NA espinhais, e, particularmente, foi empregada para verificar a participação dessas fibras na simetria do modelo de CFA unilateral. Para isso, 3 dias antes do CFA, os animais ($n=8$ $f=0,99$) receberam uma administração IT de 6-OHDA (Sigma, Missouri, USA) na dose de 10 μ l diluído em PBS e ácido ascórbico (10 μ l a 0, 2 mg/ml) ou somente o veículo.

O desenho experimental desse protocolo está representado na Figura 33.

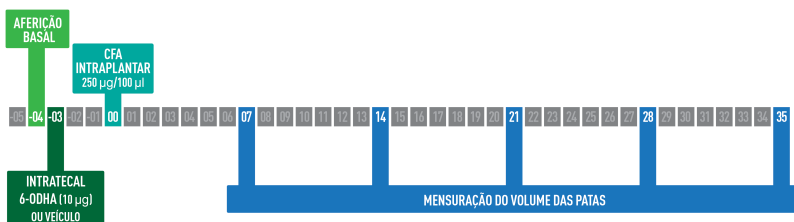


Figura 33: Desenho experimental do protocolo de 6-ODHA intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

As injeções de 6-ODHA (10 µg) ou veículo (10 µl) IT foram administradas 3 dias antes da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0 (n=8). O volume das patas foi mensurado nos dias -4, 7, 14, 21, 28 e 35.

A ablação das fibras noradrenérgicas pela neurotoxina 6-ODHA IT (10 µg em 10 µl de solução de ácido ascórbico a 0,2 µg/ml) promoveu um aumento da ocorrência de simetria no modelo de CFA com estímulo unilateral em relação aos animais que receberam somente o veículo (p=0,04) (Figura 34).

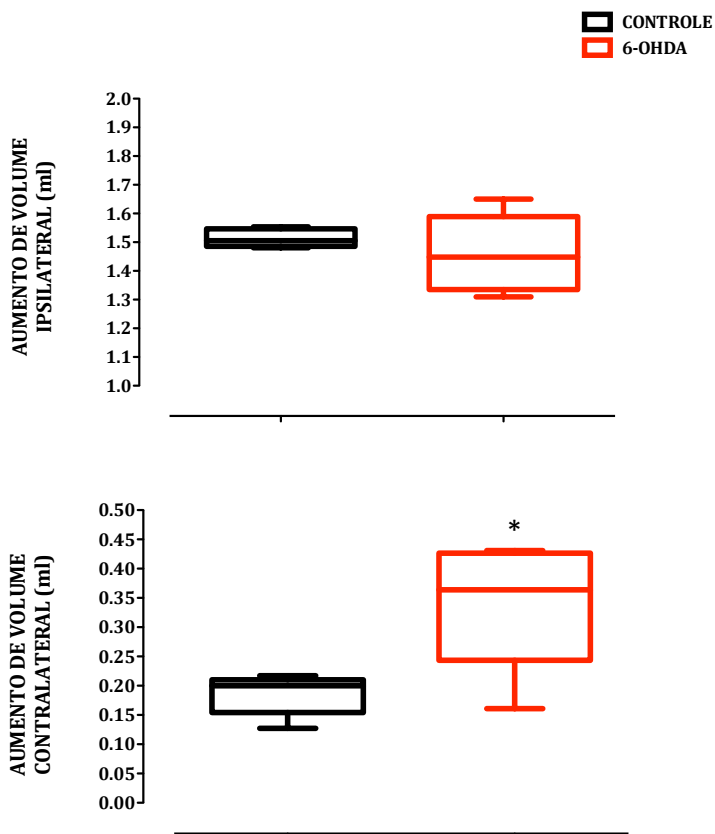


Figura 34: Efeito da administração intratecal de 6-ODHA no aumento de volume de patas em modelo de inflamação simétrica por CFA unilateral.

As injeções de 6-ODHA (10 μ g em 10 μ l de solução de ácido ascórbico a 0,2 μ g/ml) ou o veículo (10 μ l) IT foi administrada 3 dias antes do CFA na pata direita. Cada quadrante representa a concentração dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo (controle) com $p < 0,05$ (Mann Whitney).

4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ZYMOSAN INTRATECAL E MINOCICLINA INTRATECAL OU INTRAPERITONEAL PARA AVALIAR O PAPEL DA MICROGLIA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA

Os macrófagos ou microglias iniciam a resposta imune inata reconhecendo e fagocitando patógenos, o que conduz à secreção de mediadores inflamatórios, caracterizando o estado ativo dessas células. Para tal, essas células reconhecem padrões moleculares associados aos agentes patogênicos (PAMPs) para que haja uma distinção entre os agentes infecciosos do que é próprio do organismo, inclusive, são capazes de discriminarem os vários tipos de patógenos (JANEWAY, 1989, 1992).

Os dois membros de receptores da família tipo Toll (TLR), que têm demonstrado participação intensa neste processo de reconhecimento, são: o TLR4, que reconhece LPS expresso na membrana de bactérias Gram-negativas e o TLR2, que reconhece vários fungos, bactérias Gram-positivas e componentes de micobactérias (ALIPRANTIS, 1999; BRIGHTBILL et al., 1999; HOSHINO et al., 1999; MEANS et al., 1999; OZINSKY et al., 2000; TAKEUCHI, 2000; UNDERHILL et al., 1999). O amplo espectro de componentes reconhecidos por TLR2, em conjunto com os demais oito TLRs, sugere que estes receptores, especificamente, participam de um complexo sistema de reconhecimento de padrões (ROCK et al., 1998).

Esse reconhecimento conduz a um processo de ativação microglial que, entretanto, não é um efeito único, nem todas as microglias ativadas são igualmente hábeis em causar reparação tecidual ou morte celular, por exemplo. As diferentes abordagens experimentais reforçam a noção de que essas células exercem efeitos polarizados (CHHOR et al., 2013). E, ao que parece, um conjunto de dados ilustra que um único modo de ativação, através de um componente da parede celular de leveduras, o Zymosan (ZYM) (UNDERHILL et al., 1999), é capaz dessa ativação que, simultaneamente, promove regeneração e citotoxicidade, assemelhando-se à complexidade dos efeitos da ativação nessas células.

O ZYM é um agonista de TLR2 (BRIGHTBILL et al., 1999;

LIEN et al., 1999) ou ainda do heterodímero de TLR2 / TLR6 (TAKEUCHI et al., 1999), cujo resultado dessa interação conduz a robusta indução de liberação de TNF pelas microglias (OZINSKY et al., 2000). A administração de injeções intraparenquimatosas de ZYM foram usadas, originalmente, para modelar os efeitos prejudiciais de microglias ativadas por trauma em SNC sem levar em conta o seu potencial pró-regenerativo (FITCH et al., 1999; POPOVICH et al., 2002). Outros estudos demonstraram que essas células ativadas por ZYM promovem a regeneração de axônios no gânglio da retina (YIN et al., 2003). Da mesma forma, com o ZYM, houve regeneração funcional de axônios lesionados no DRG (STEINMETZ, 2005). Sem esse efeito, o LPS - via TLR4 não conseguiu aumentar o crescimento de axônio, sendo apenas levemente neurotóxico (GENSEL et al., 2009).

Neste estudo, por pretendemos investigar o papel da ativação de células gliais na simetria da artrite, foi administrado nos animais ($n=8$ $f=0,96$) por via IT 0,01 e 100 ng de Zymosan A (Sigma, Missouri, USA), de origem dos *Saccharomyces cerevisiae*, em volume de 10 μ l de PBS ou somente o veículo, 24 horas antes do CFA na pata direita. A dose foi escolhida com base em estudo prévio de uso de zymosan para inflamação do DRG, localmente (XIE et al., 2013).

O desenho experimental está representado na Figura 35.

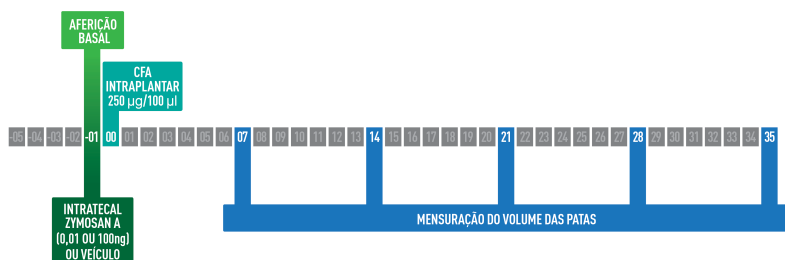


Figura 35: Desenho experimental do protocolo de zymosan intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com Zymosan A (0,01 ou 100 ng) ou PBS 1 dia antes da injeção intraplantar de CFA (250 μ g/100 μ l) no dia 0 ($n=8$). O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21, 28 e 35.

O aumento de volume da pata comparado aos animais controle, ou mesmo, o aumento da incidência de lateralização do processo inflamatório foi observado com a administração IT prévia (24h antes do CFA) do ativador imunológico, Zymosan A (0,01 e 100 ng) (Figura 36).

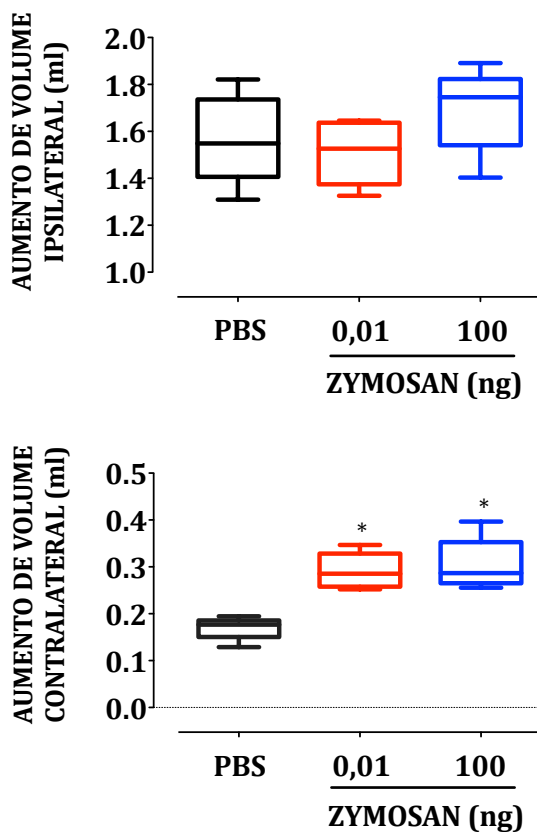


Figura 36: Efeito da administração intratecal de indutor de atividade microglial no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

O ativador de microglia aumentou o volume da pata contralateral. Os animais foram tratados com Zymosan A (0,01 ou 100 ng em 10 μ l de PBS) ou PBS (10 μ l) 24 horas antes da injeção intraplantar de CFA (250 μ g/100 μ l). Cada quadrante representa a concentração dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo PBS (controle) com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

De forma inversa, a inibição dessas células também contribuiria para elucidar o papel das mesmas nesse modelo de inflamação articular simétrico. Um potente inibidor da ativação da microglia surgiu da descoberta dos efeitos neuroprotetores da minociclina hidrocloreada (AMIN et al., 1996; YRJANHEIKKI et al., 1998, 1999) que, obviamente, não são atribuíveis às propriedades antimicrobianas dessa tetraciclina semissintética de segunda geração. O mecanismo anti-inflamatório da minociclina ainda está sendo investigado e nunca foi claro desde o início dos primeiros estudos com essa droga. No entanto, uma via comum envolvendo a inibição da proteína p38 (MAPK) explica a função neuroprotetora da minociclina (TIKKA et al., 2001). Ao inibir essa quinase em microglia, a minociclina é eficaz tanto como anti-inflamatória como antiapoptótica, em que atenua a morte neuronal (STIRLING et al., 2005). Mais especificamente, a minociclina demonstra inibir a produção de IL-1 β , TNF- α e IL-6, mas também iNOS, COX e as metaloproteinases de matriz (DUNSTON et al., 2011; LEE et al., 2004; SUK, 2004).

Finalmente, 50 μ g de minociclina hidrocloreada (Sigma, Missouri, USA) foram administradas nos animais (n=8 f=0,99) por via IT em volume de 10 μ l de PBS ou somente o veículo, no dia 0 ou nos dias 0 e 2 ou 0, 2 e 4 após o CFA na pata direita. Nos dias 0, a administração ocorreu 30 minutos antes do CFA. A dose de minociclina escolhida está dentro da faixa conhecida por inibir ativação de microglia (20-100 μ g) e o tempo de administração contempla o pico máximo de ativação dessas células em modelo de CFA de forma bilateral (SHAN et al., 2007). Uma vez que a minociclina é particularmente lipofílica, com uma melhor solubilidade em lipídeos do que as outras tetraciclinas (ZEMKE; MAJID, 2004), o protocolo efetivo de dose e tempo foi realizado pela via intraperitoneal, a fim de verificar se os efeitos da minociclina intratecal poderiam ser resultantes da sua difusão para os tecidos periféricos.

As amostras de medula e patas foram obtidas de todos os grupos, para o ensaio de *Western Blotting* e histologia, respectivamente. O desenho experimental desse protocolo está representado na Figura 37.

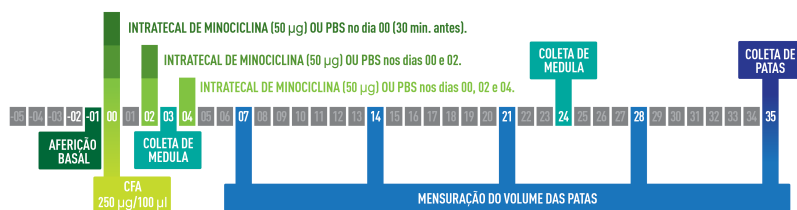


Figura 37: Desenho experimental do protocolo de minociclina intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com Minociclina (50 µg IT ou IP) ou PBS (IT ou IP) no dia 0 ou nos dias 0 e 2 ou 0, 2 e 4 da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl). O volume das patas foi mensurado nos dias -1, 7, 14, 21, 28 e 35. O segmento medular (L5-L6) foi retirado nos dias 3 e 24 (n=4) e as patas no dia 35 (n=5).

A inibição da função glial por administração IT no dia 0, 2 e 4 de minociclina (50 µg) reduziu a ocorrência do aumento de volume de pata homóloga ao CFA (Figura 38).

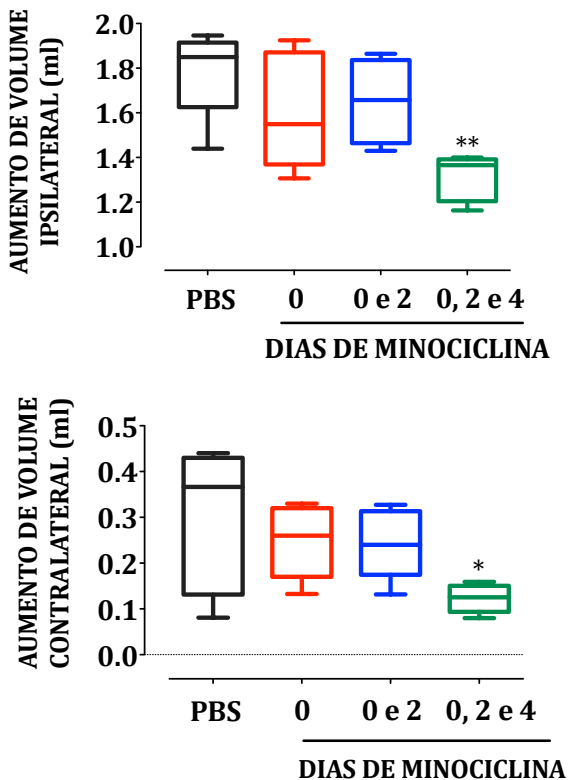


Figura 38: Efeito da administração de minociclina intratecal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

O inibidor de microglia IT impediu o aumento de volume de pata contralateral quando administrado no dia 0, 2 e 4. Os animais foram tratados com Minociclina (50 μg em 10 μl de PBS) ou PBS (10 μl) no dia 0 ou nos dias 0 e 2 ou 0, 2 e 4 após injeção intraplantar de CFA (250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Cada quadrante representa a concentração dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * e ** indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo com $p < 0,05$ e $0,01$ (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

O protocolo no qual a minociclina possibilitou evidenciar essa diminuição do aumento de volume de pata ipsi e contralateral (50 μg nos dias 0, 2 e 4) foi repetido com a concomitante administração intraperitoneal (IP) das mesmas doses e tempo, não havendo diferenças no tratamento intraperitoneal em relação ao controle (PBS + PBS) (Figura 39).

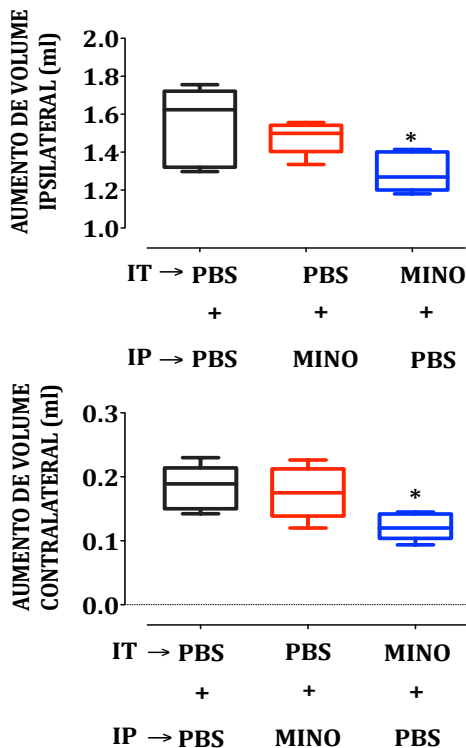


Figura 39: Efeito da administração intratecal e intraperitoneal de minociclina no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

O inibidor de microglia **via intratecal** impediu o aumento de volume de pata contralateral. Os animais foram tratados com Minociclina (50 μg em 10 μl de PBS; IT ou 50 μg em 100 μl de PBS; IP) ou PBS (10 μl IT ou 100 μl IP) no dia 0, 2 e 4 após injeção intraplantar de CFA (CFA 250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Cada quadrante representa a concentração dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

A avaliação histológica das patas ipsilaterais de animais tratados, continuamente, com minociclina nos dias 0, 2 e 4 após a injeção intraplantar de CFA identificou um processo inflamatório intenso, caracterizado por extenso infiltrado inflamatório mononuclear e edema tissular abundante. Entretanto, a degeneração de ossos e cartilagens não foi proporcional ao processo inflamatório (Figura 40. Painel A, B e C) (Tabela 3), como visto nos animais controle (CFA) (Tabela 1). Na pata contralateral, diferentemente da pata ipsilateral, os animais demonstraram um padrão de tecido do tipo íntegro sem sinais de inflamação, na sua maioria, e com ausência de degeneração de osso ou cartilagem (Tabela 4) (Figura 40. Painel D, E e F).

Os respectivos valores qualitativos dos escores histológicos para as patas ipsilateral e contralateral de animais tratados com minociclina estão indicados na Tabela 4.

	Grau de inflamação		Grau de degeneração	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Mínimo	2	0	0	0
25%	2,75	0	0	0
Mediana	4	0	1	0
75%	4	0	4,25	0
Máximo	4	0	5	0

Tabela 4: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias após CFA, de animais tratados com minociclina intratecal nos dias 0, 2 e 4 após CFA.

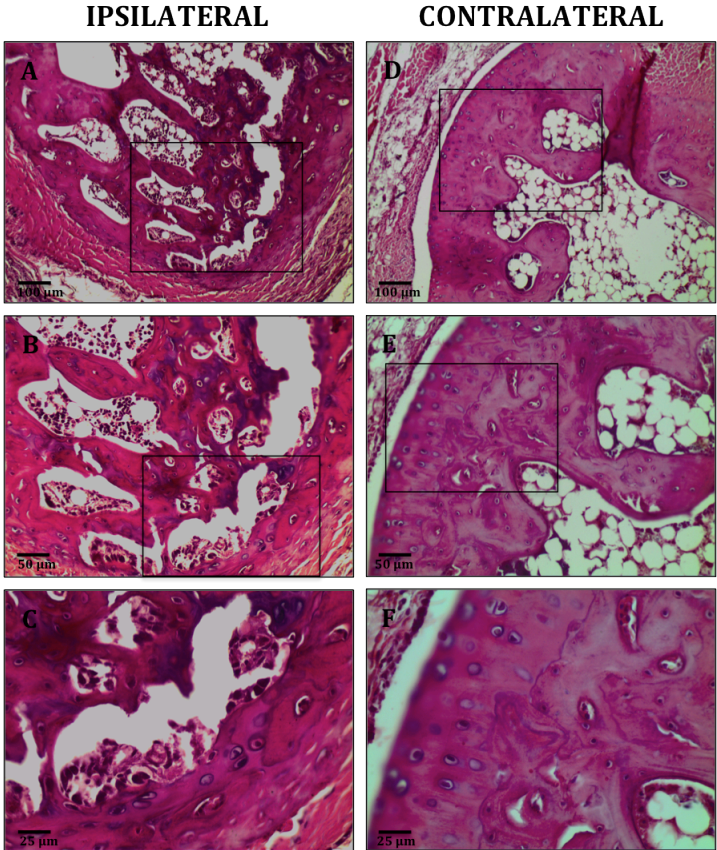


Figura 40: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com minociclina intratecal.

A: O corte histológico representativo do grupo minociclina ipsilateral revela acentuado infiltrado inflamatório mononuclear, destruição da cartilagem e erosão óssea com redução das respectivas trabéculas. Os painéis **B** e **C** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel A e B. **D:** O corte histológico representativo do grupo minociclina contralateral demonstra tecido íntegro com preservação da cartilagem, ossos, medula e de camada monocelular da membrana sinovial. Os painéis **E** e **F** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel D e E. Coloração Hematoxilina-eosina.

Quanto ao grau de atividade da microglia, na medula espinal, houve uma redução no imunocnteuído de Iba-1 3 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata dos animais que receberam por injeção intratecal o tratamento de minociclina nos dias 0, 2 e 4 após o CFA (Figura 41. Painel B).

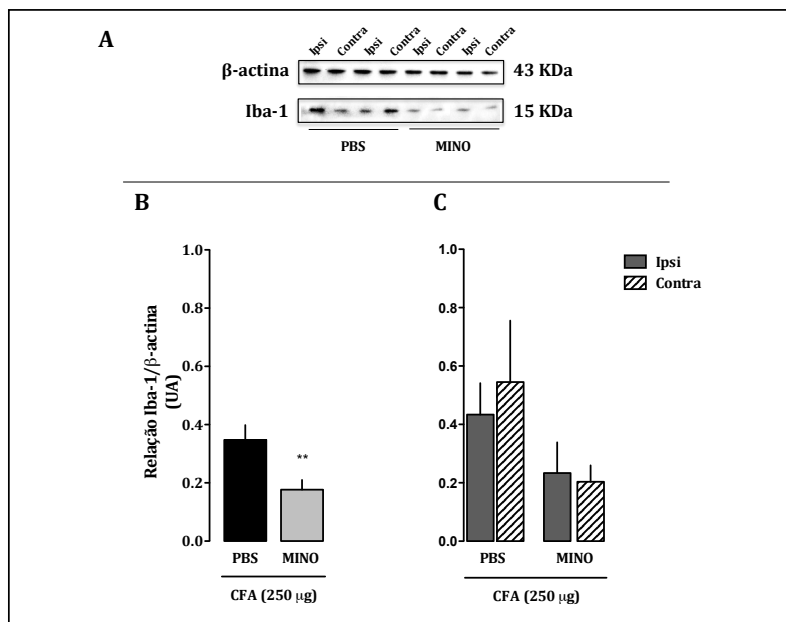


Figura 41: Imunocnteuído de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de minociclina nos dias 0, 2 e 4 após CFA.

A: Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **B:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). ** indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,01$ (Teste T de Student).

A quantificação aos 24 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, de forma diferenciada entre animais simétricos e assimétricos do modelo, revelou uma redução do imunoconteúdo de Iba-1 no hemisfério contralateral de animais assimétricos que receberam minociclina (50 µg IT nos dias 0, 2 e 4) (Figura 44. Painel Assimétricos C).

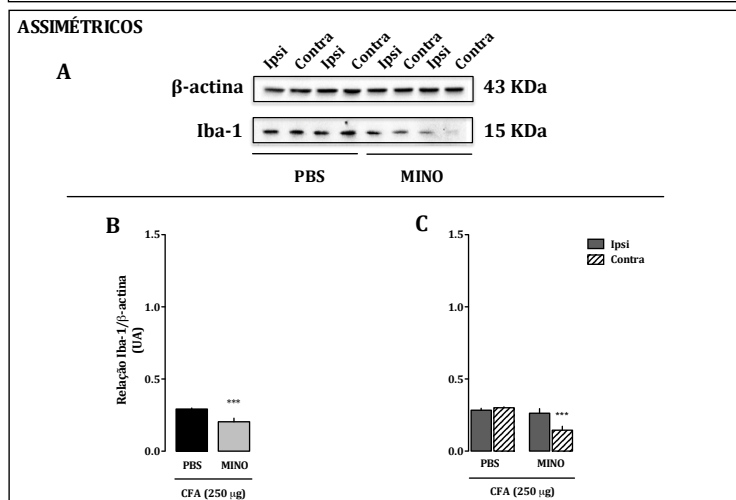
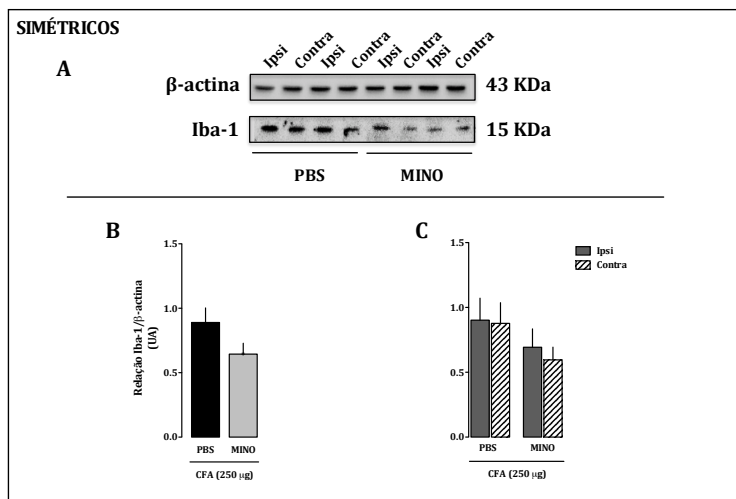


Figura 42: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de minociclina nos dias 0, 2 e 4 após CFA.

O quadrante superior representa os animais que desenvolveram **simetria** sendo em **A**: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B**: a representação em cada barra da razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas) e **C**: os valores do painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. O quadrante inferior relata os mesmos valores, porém de animais **assimétricos** onde **A**: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B**: Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g ou 500 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C**: Cada barra representa os valores do Painel B diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,001$ (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE FRACTALCINA (CX3CL1) INTRATECAL E TNF- α INTRATECAL OU INTRAPERITONEAL PARA EVIDENCIAR POSSÍVEIS SINALIZADORES DA INTERAÇÃO NEURÔNIO E MICROGLIA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA SIMÉTRICA

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o envolvimento da ativação de microglia na geração e manutenção do edema articular induzido pelo CFA. Nessa etapa o objetivo foi avaliar possíveis substâncias que poderiam estar mediando a interação neurônio-glia na medula espinhal.

Estudos sugerem que, em condições neuropáticas, o estímulo nocivo em fibras aferentes primárias induz a liberação de catepsina S (CatS) da microglia (CLARK et al., 2007). A CatS é responsável por liberar a fractalcina da membrana de neurônios que induz a fosforilação da p38 em microglia espinhal através da sinalização CX3CL1/CX3CR1 (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009). A fractalcina é, portanto, susceptível de conduzir diretamente a fosforilação de p38 MAPK na microglia e, assim, contribui para a amplificação da atividade neuronal através das citocinas pronociceptivas resultantes. A atividade proteolítica da CatS é aumentada nas células microgliais ativas 3 dias após a lesão do nervo periférico e com o pico de concentração aos 7 dias. O aumento na concentração de fractalcina solúvel é impedido quando a enzima CatS é inibida (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009).

Por outro lado, somente estímulos do tipo nocivo, em fibras aferentes primárias, são insuficientes para ativar marcadores microgliais ou liberar fractalcina solúvel e CatS no corno dorsal (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009). Da mesma forma, somente a ativação da microglia no corno dorsal com lesão do nervo não está associada a um aumento mensurável na atividade da fractalcina solúvel e CatS (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009). Esses dados em conjunto sugerem que a combinação de um estímulo nociceptivo em fibras aferentes primárias e a ativação da microglia pela lesão nervosa induzem a liberação de CatS que conduz a presença de fractalcina solúvel no corno dorsal. Inclusive, o aumento da concentração de CatS coincide temporalmente com o aumento da atividade microglial (CLARK; YIP; MALCANGIO, 2009).

Em relação à especificidade dessa comunicação, é demonstrado que, em modelo de monoartrite por CFA, ocorre um aumento na quantidade de fractalcina e seu receptor (CX3CR1) na medula espinhal de forma bilateral (SHAN et al., 2007; YANG et al., 2012), porém a distribuição de ambos permaneceu a mesma, ou seja, nenhuma mudança do local de expressão da proteína e de seu receptor foi observada (LINDIA et al., 2005), mantendo, assim, a integridade da sintonia dessa comunicação. Em contrapartida, em modelo de dor neuropática, foram observadas mudanças dramáticas na expressão após lesão do nervo, onde a fractalcina não foi observada apenas nos neurônios, mas, também, em astrócitos no corno dorsal da região lombar (LINDIA et al., 2005). Os astrócitos, agora positivos para CX3CL1, foram detectados em todo o corno dorsal com maior distribuição nas lâminas I-IV e puderam ser identificados, logo após a indução da lesão nervosa, permanecendo assim até dois meses (LINDIA et al., 2005).

Considerando, então, que a exclusividade na comunicação neurônio-glia pela fractalcina em modelo de CFA é mantida e que, possivelmente, a liberação aumentada de fractalcina solúvel vai ser induzida somente por um estímulo nocivo após ativação microglial, vislumbramos que a administração prévia de fractalcina exógena em região L5-L6 poderia potencializar a ativação microglial, mimetizando e intensificando a interação entre as células neuronais e as não neuronais. A avaliação dos efeitos na simetria do modelo de artrite por CFA, desse protocolo, poderia sugerir uma possível via da comunicação entre essas células. Para tal, 30 ng de fractalcina (Peprotech®, NJ, USA) foi administrada, por via IT, 24 horas antes do CFA (n=8 f=0,99). Uma vez que a fractalcina exibe atividade quimiotática para células monocitárias, linfócitos T e B e células *natural killer* (BAZAN et al., 1997; CORCIONE et al., 2009), os efeitos da fractalcina intratecal poderiam ser resultantes da ação da proteína na atividade dessas células com efeito em tecidos periféricos. A fim de verificar essa possibilidade, o mesmo protocolo de dose e tempo foi realizado pela via endovenosa.

As amostras de medula e patas foram obtidas de todos os grupos, para o ensaio de *Western Blotting* e histologia, respectivamente. O desenho experimental está representado na Figura 43.



Figura 43: Desenho experimental do protocolo de fractalcina (CX3CL1) intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com Fractalcina (CX3CL1) (30 ng IT ou IV) ou PBS (IT ou IV) 01 dia antes da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0. O volume das patas foi mensurado nos dias -2, 7, 14, 21, 28 e 35. O segmento medular (L5-L6) foi retirado nos dias 3 e 24 (n=4) e as patas no dia 35 (n=5).

A fractalcina IT (30 ng), 24 horas antes do CFA, promoveu aumento do volume da pata contralateral em comparação aos animais controle que receberam somente PBS (10 µl). Não houve diferença significativa entre os animais com fractalcina IT e IV (Figura 44).

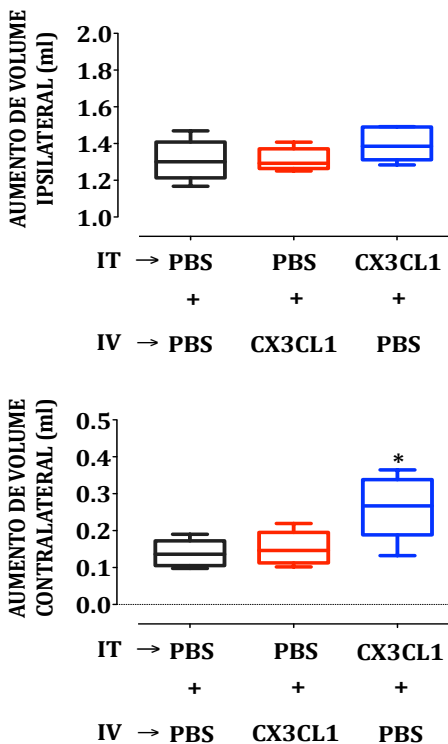


Figura 44: Efeito da administração de fractalcina (CX3CL1) intratecal ou intravenosa no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

A citocina de liberação neuronal via intratecal aumentou a incidência de aumento de volume de pata contralateral. Os animais foram tratados previamente (24 h antes do CFA) com Fractalcina (30 ng em 10 μ l de PBS; IT ou 30 ng em 10 μ l de PBS; IV) ou PBS (10 μ l IT ou 10 μ l IV). Cada quadrante representa a concentração dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo com $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

A avaliação histológica das patas ipsilaterais de animais pré-tratados (24 horas antes CFA) com CX3CL1 identificou um processo inflamatório extremamente intenso, caracterizado por grandes extensões de edema tissular e infiltrado inflamatório leucocitário (Figura 45. Painel A, B e C) (Tabela 5). Na pata contralateral, o processo degenerativo foi marcante com um padrão de tecido do tipo tissular, com poucos sinais de inflamação aguda, mas com presença de fibrose e hiperplasia sinovial (Figura 45. Painel D, E e F) (Tabela 5).

Os respectivos valores dos escores histológicos para as patas ipsilateral e contralateral de animais tratados com CX3CL1 estão indicados na Tabela 5.

	Grau de inflamação		Grau de degeneração	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Mínimo	4	0	1	2
25%	4	0	1	2
Mediana	4	1,5	2	3
75%	4	3,25	2	3
Máximo	4	4	2	3

Tabela 5: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais tratados com fractalcina intratecal 24 horas antes do CFA.

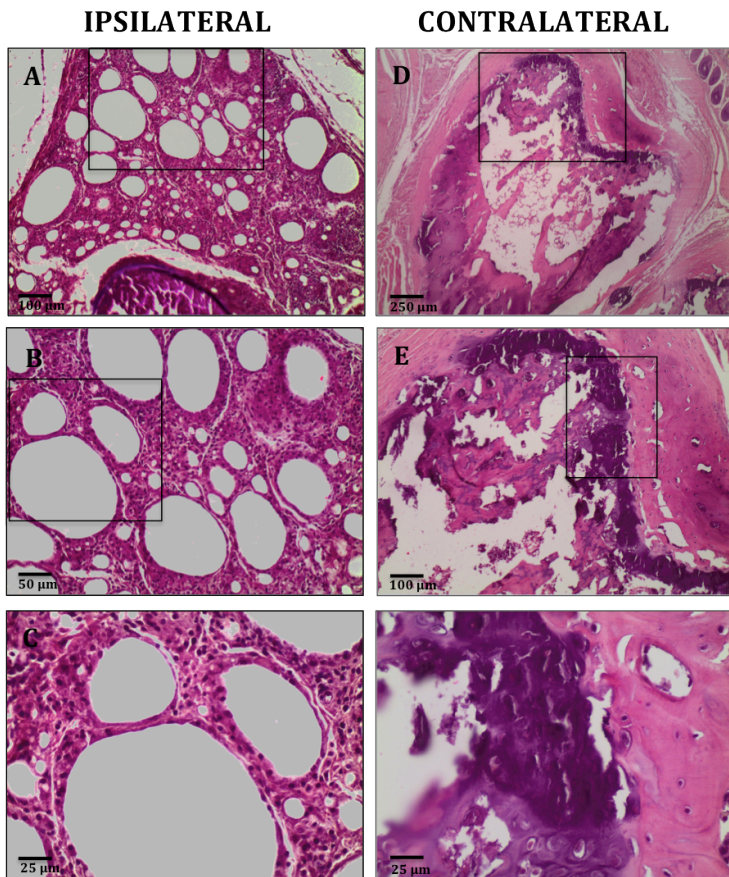


Figura 45: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com fractalcina intratecal.

A: O corte histológico representativo do grupo CX3CL1 ipsilateral revela acentuado infiltrado inflamatório mononuclear e edema tissular, predominante. Os painéis **B** e **C** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel A e B. **D:** O corte histológico representativo do grupo CX3CL1 contralateral demonstra tecido ósseo fragmentado sem preservação da cartilagem, ossos, medula. Os painéis **E** e **F** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel D e E. Coloração Hematoxilina-eosina.

Quanto ao desenvolvimento da simetria, a representação temporal do volume das patas de animais tratados com 30 ng de Fractalcina (CX3CL1), 24 horas antes do CFA, revela que, em comparação aos animais controle (PBS IT), a lateralização ocorre antes dos 21 dias da administração do CFA (Figura 46).

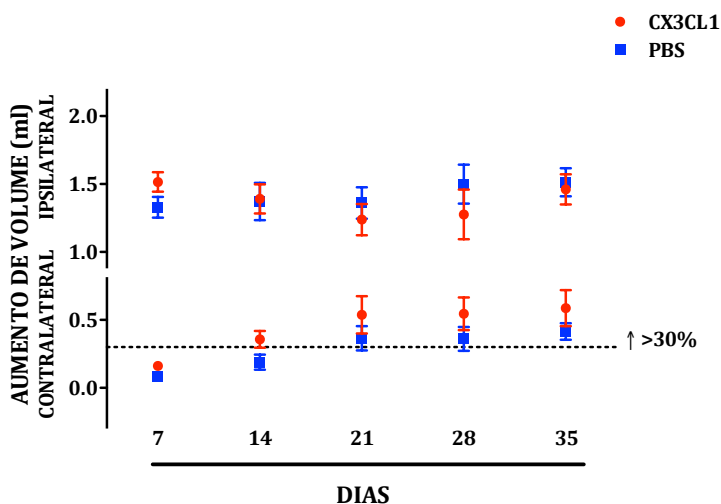


Figura 46: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral nos animais simétricos com fractalcina (CX3CL1) intratecal.

Os valores representam o aumento médio \pm EPM do volume da pata ipsi e contralateral de animais tratados com 30 ng de CX3CL1 IT e que apresentaram simetria ($n = 6$) no modelo de CFA (250 μ g). O traçado delimita o aumento de volume na pata contralateral $\geq 30\%$ em relação ao seu volume basal.

A quantificação da ativação microglial na medula espinhal ipsi e contralateral dos animais que, previamente, receberam uma injeção intratecal de PBS ou de 30 ng de fractalcina demonstra que, aos 3 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, um aumento do imunoconteúdo de Iba-1 ocorreu nos animais que receberam a citocina neuronal (Figura 47. Painel B), sendo o hemisfério ipsilateral o de maior ativação (Figura 47. Painel C).

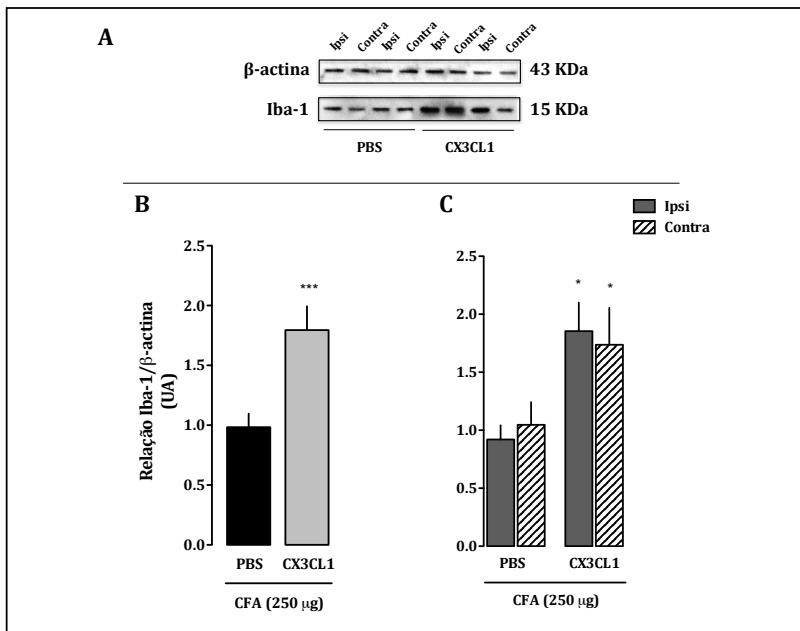


Figura 47: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de fractalcina (CX3CL1) 24 horas antes do CFA.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 kDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,001$ (Teste T de Student) e * indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

A quantificação aos 24 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, dos animais simétricos, revelou um aumento do imunoconteúdo de Iba-1 no hemisfério contralateral de animais que receberam a fractalcina (CX3CL1) (30 ng 24 horas do CFA) (Figura 48. Painel C).

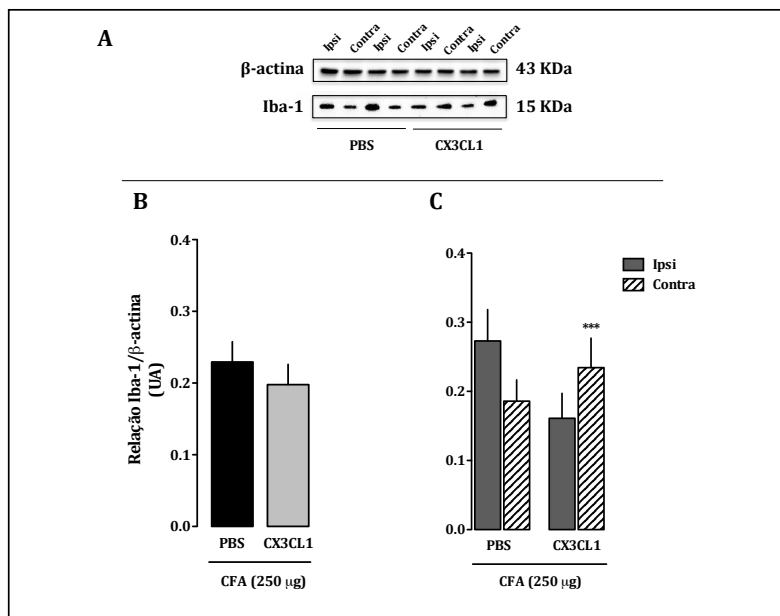


Figura 48: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de fractalcina (CX3CL1) 24 horas antes do CFA.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indica a diferença estatística em relação ao lado ipsilateral com $p < 0,001$ (Teste T de Student).

Ademais, a importante fosforilação da p38 MAPK pela presença de CatS e da sinalização CX3CL1/CX3CR1 é um fator chave na transdução de sinais envolvidos na produção de TNF- α (GUESDON et al., 1993; RAINGEAUD et al., 1995; ROUSE et al., 1994). O TNF- α resultante da fosforilação de p38, principalmente, nas células da microglia (BOYLE et al., 2006), é indutor de aumento da atividade neuronal. A administração de TNF- α , na medula espinhal, exacerba as respostas dos neurônios para estímulos inócuos e nocivos em animais naive ou com hipersensibilidade induzida por processo inflamatório articular (KÖNIG et al., 2014). Notavelmente, o TNF- α evoca um aumento drástico na expressão de NMDA (ZHANG et al., 2011) e de correntes de Na⁺ (JIN, 2006) em neurônios do corno dorsal, promovendo aumento na frequência espontânea de corrente pós-sináptica excitatória (ZHANG et al., 2011) e de *wind-up* (REEVE et al., 2000).

Periféricamente e no SNC, as citocinas proinflamatórias são, frequentemente, formadas de forma sequencial, numa cascata em que o TNF- α é, normalmente, liberado em primeiro lugar, na sequência o TNF- α induz IL-1 que, por sua vez, faz com que haja a indução de IL-6 (DINARELLO, 1999). Por consequência, sendo o TNF- α essa molécula chave, é possível formar uma imagem em que a fractalcina é capaz de fosforilar p38 MAPK e essa levar à produção de TNF- α apto de ações diretas e indiretas na atividade neuronal, o que possibilita especular que a administração de TNF- α , na medula, implicaria em efeitos na simetria do modelo de CFA unilateral.

Estudos envolvendo a mensuração temporal de TNF- α em modelo de artrite por adjuvante revelam que um pico de expressão da proteína ocorre nos dias 3 e 21 do modelo (BAO et al., 2001; KÖNIG et al., 2014). Doses baixas dessa molécula, biologicamente muito potente, produzem grandes efeitos quando administradas no SNC (KÖNIG et al., 2014; WATKINS et al., 1999). Por conclusão, o TNF- α (Peprotech, NJ, USA) foi administrado por via IT (n=8 f=0,99) na dose de 1, 5 e 10 ng 24 horas antes, 7 ou 14 dias após o CFA, a fim de potencializar ou prolongar essa sinalização microglia-neurônio, porém alternando com a alta concentração da citocina fisiológica no modelo clássico de CFA (BAO et al., 2001; KÖNIG et al., 2014), com intuito de evitar citotoxicidade. Uma avaliação da

integridade neuronal com a marcação do núcleo de neurônios pela proteína anti-NeuN (Santa Cruz Biotech, CA, USA; ab-104225; 1:1000) através da técnica de *Western Blotting*, nos mesmos moldes descritos para a marcação por Iba-1, foi realizada aos 24 dias do modelo em animais com e sem simetria.

As amostras de medula e patas foram obtidas de todos os grupos, para o ensaio de *Western Blotting* e histologia, respectivamente. O desenho experimental está representado na Figura 49.

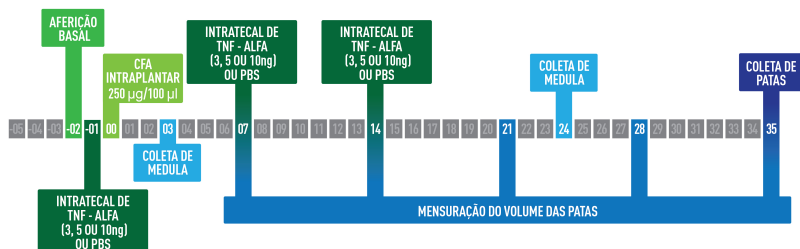


Figura 49: Desenho experimental do protocolo de TNF- α intratecal em modelo de artrite simétrica por CFA unilateral.

Os animais foram tratados com TNF- α (1 ng IT ou IV) ou PBS (IT ou IV) 01 dia antes da injeção intraplantar de CFA (250 µg/100 µl) no dia 0. O volume das patas foi mensurado nos dias -2, 7, 14, 21, 28 e 35. O segmento medular (L5-L6) foi retirado nos dias 3 e 24 (n=4) e as patas no dia 35 (n=5).

A administração IT de TNF- α na dose 1 ng 24h antes do CFA promoveu aumento significativo da ocorrência de simetria da artrite em modelo de CFA no período total de 35 dias (Figura 50. Painel A). As administrações após a inoculação do CFA ou doses maiores não promoveram o aumento da lateralização, sendo que a dose de 10 ng administrada 7 e 14 dias após o CFA impediu o aumento de volume de pata ipsilateral, conforme demonstrado na figura 50, Painéis B e C.

IPSILATERAL

CONTRALATERAL

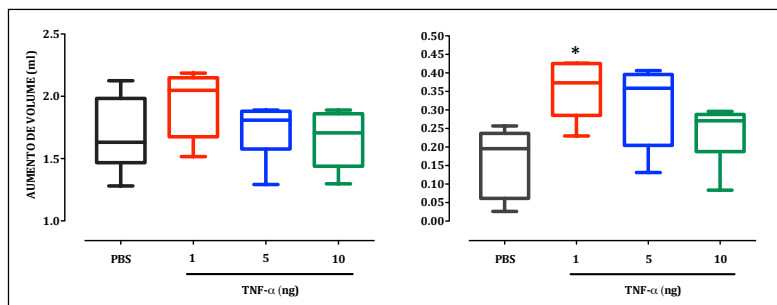
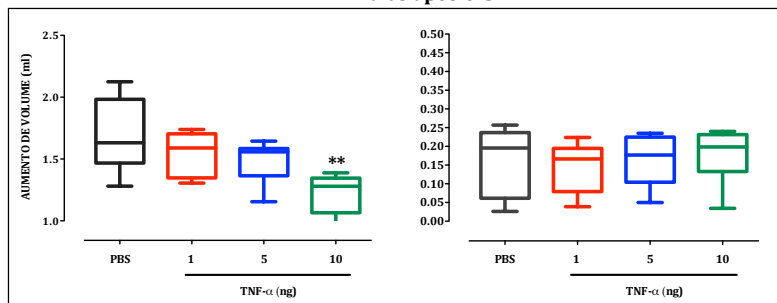
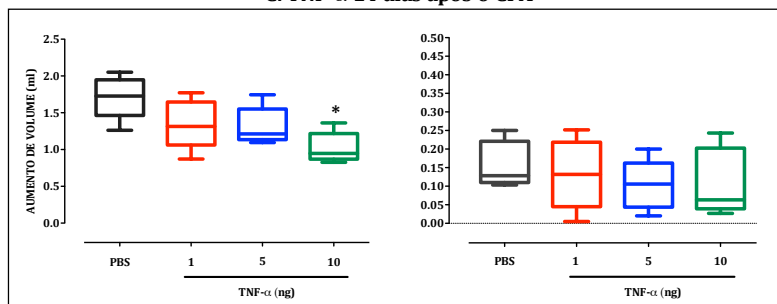
A: TNF- α 24 horas antes do CFAB: TNF- α 7 dias após o CFAC: TNF- α 14 dias após o CFA

Figura 50: Efeito da administração intratecal de TNF- α no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

A citocina, na dose de 1, 5 e 10 ng, foi administrada pela via IT em 10 μ l de PBS 24 antes (**Painel A**) ou após 7 (**Painel B**) e 14 dias (**Painel C**) do CFA. A dose de 1 ng, 24 horas antes do CFA, aumentou o volume da pata contralateral. A dose de 10 ng, 7 e 14 dias após o CFA, impediu o aumento de volume da pata ipsilateral. Cada quadrante representa a concentração dos valores ($n = 8$) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * e ** indicam a diferença estatística em relação ao grupo veículo com $p < 0,01$ e $0,05$ (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

Por conseguinte, o protocolo, no qual o TNF- α demonstrou interferir no volume de pata contralateral, foi repetido com a concomitante administração IP das mesmas doses e tempo, e o resultado identificou que pela via IP o TNF- α não apresenta diferenças em relação ao controle (PBS + PBS) (Figura 51).

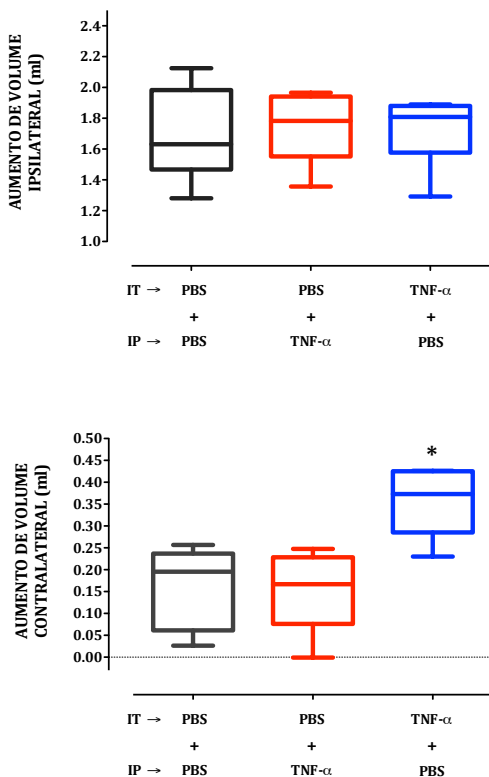


Figura 51: Efeito da administração de TNF- α intratecal ou intraperitoneal no aumento de volume de pata ipsilateral e contralateral.

A citocina aumentou a incidência de aumento de volume de pata contralateral. Os animais foram tratados 24 horas antes do CFA com TNF- α (1 ng em 10 μ l de PBS; IT ou 1 ng em 100 μ l de PBS; IP) ou PBS (10 μ l IT ou 100 μ l IP). Cada quadrante representa a concentração dos valores (n = 8) de aumento de volume total das patas. O traçado horizontal dentro do quadrante representa a mediana do grupo e delimita os quartis inferiores e superiores. O valor máximo é representado pelo traçado horizontal acima do quadrante e o mínimo abaixo do mesmo. * indica a diferença estatística em relação ao grupo veículo com p < 0,05 (Kruskal-Wallis seguida de teste de comparação múltipla Dunn).

Quanto ao desenvolvimento da simetria, a representação temporal do volume das patas de animais tratados com 1ng de TNF- α 24 horas antes do CFA revela que em comparação aos animais controle (PBS IT), a lateralização ocorre antes dos 21 dias da administração do CFA (Figura 52).

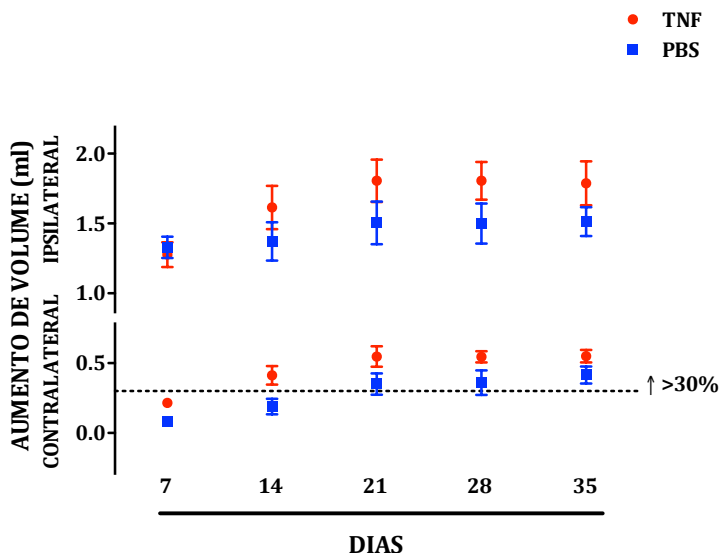


Figura 52: Correlação entre os postos das variáveis de aumento de volume da pata ipsilateral e contralateral nos animais simétricos com TNF- α intratecal.

Os valores representam o aumento médio \pm EPM do volume da pata ipsi e contralateral de animais tratados com 1 ng de TNF- α IT e que apresentaram simetria ($n = 6$) no modelo de CFA (250 μ g). O traçado delimita o aumento de volume na pata contralateral $\geq 30\%$ em relação ao seu volume basal.

A avaliação histológica dessas patas ipsilaterais e contralaterais de animais pré-tratados com TNF- α identificou um processo inflamatório caracterizado por grandes extensões de edema tissular, infiltrado inflamatório mononuclear com acentuada hiperplasia sinovial e formação de nódulos linfóides em espaço

articular e tecidos adjacentes. O processo degenerativo apresentou características muito similares dos processos reumatóides, como extensa hiperplasia de membrana sinovial infiltrando na cartilagem e ossos e a presença marcante de angiogênese. (Figura 53).

Os respectivos valores qualitativos dos escores histológicos para as patas ipsilateral e contralateral de animais tratados com TNF- α estão indicados na Tabela 6.

	Grau de inflamação		Grau de degeneração	
	Ipsi	Contra	Ipsi	Contra
Mínimo	3	0	1	0
25%	3,75	0	1,75	1,5
Mediana	4	1,5	2	3
75%	4	2,25	3	3
Máximo	4	3	3	3

Tabela 6: Valores dos escores histológicos (n = 5) de patas ipsilateral e contralateral após 35 dias do CFA de animais tratados com TNF- α intratecal 24 horas antes do CFA.

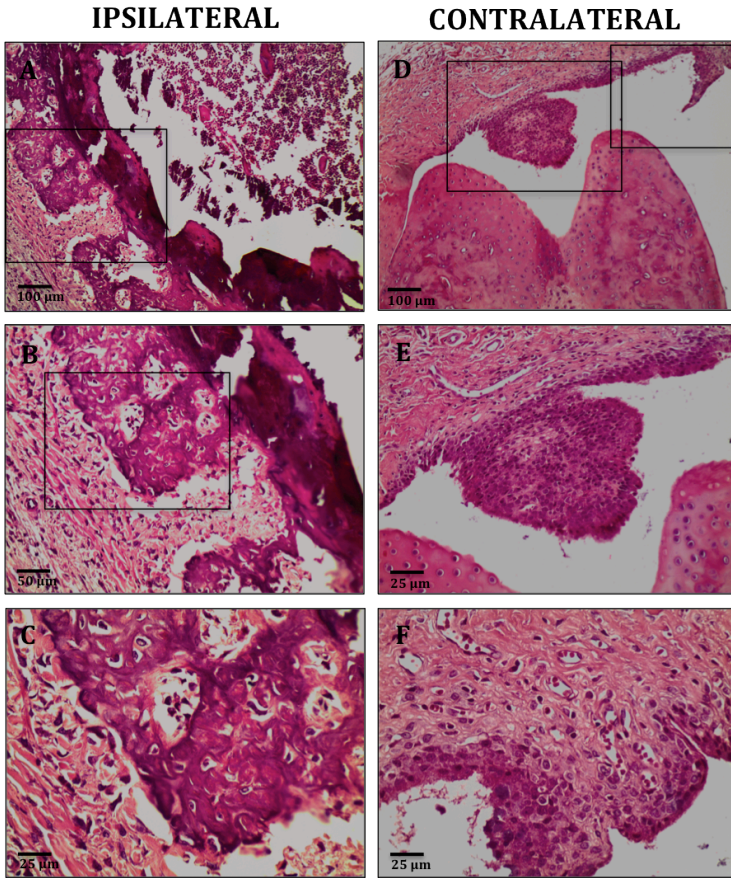


Figura 53: Imagens de microscopia óptica de articulações das patas posteriores ipsilateral e contralateral de ratos tratados com TNF- α intratecal 24 horas antes do CFA.

A: O corte histológico representativo do grupo TNF- α ipsilateral revela acentuado infiltrado inflamatório mononuclear, hiperplasia sinovial, edema tissular, destruição da cartilagem, erosão óssea e medular. Os painéis **B** e **C** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel A e B. **D:** O corte histológico representativo do grupo TNF- α contralateral demonstra nódulo linfoide com hiperplasia sinovial extensa invadindo o espaço articular, presença marcante de angiogênese. Os painéis **E** e **F** correspondem às imagens amplificadas dos respectivos quadrantes ilustrados no Painel D e E. Coloração Hematoxilina-eosina.

Quanto ao grau de atividade da microglia, na medula espinhal, houve um aumento no imunocontéudo de Iba-1 3 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata dos animais que receberam por injeção intratecal 1ng de TNF- α (Figura 54. Painel A), sendo o hemisfério contralateral o de maior ativação (Figura 54. Painel B).

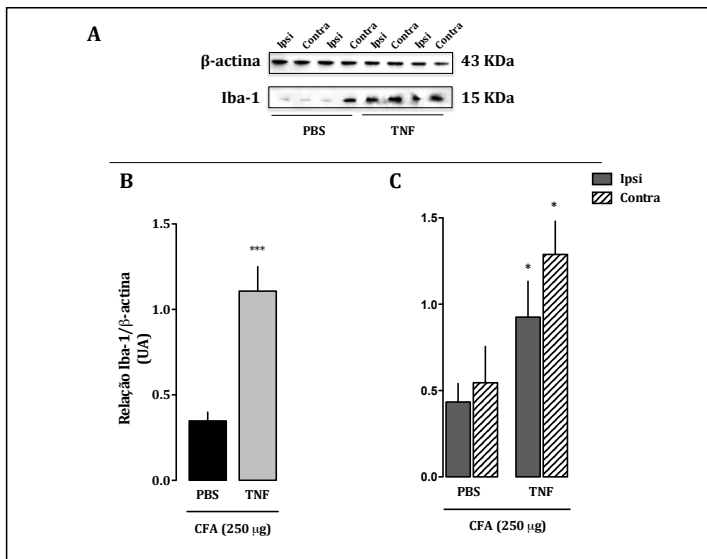


Figura 54: Imunocontéudo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 3 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.

A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B:** Cada barra representa a razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 3 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas). **C:** Cada barra representa os valores do Painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). *** indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,001$ (Teste T de Student) e * indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

A quantificação, aos 24 dias após a injeção intraplantar de CFA na pata, de forma diferenciada entre animais simétricos e assimétricos do modelo, revelou um aumento no imunocontéudo de Iba-1 no hemisfério contralateral de animais simétricos que receberam o TNF- α (1 ng 24 horas do CFA) (Figura 55. Painel Simétricos C). Não houve diferença entre os grupos para a imunomarcação do núcleo neuronal com o anticorpo NeuN (Figura 56).

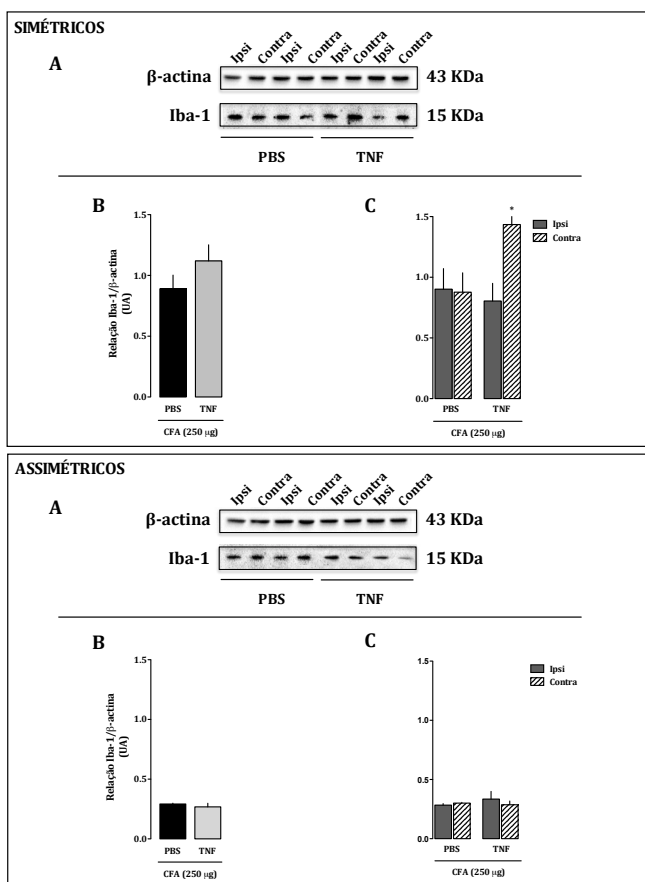
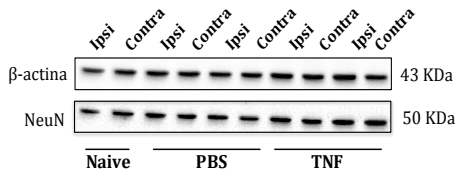


Figura 55: Imunoconteúdo de Iba-1, marcador de ativação de microglia, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.

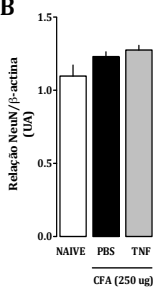
O quadrante superior representa os animais que desenvolveram simetria sendo em A: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína Iba-1 (15 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). B: a representação em cada barra da razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína Iba-1 e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas) e C: representação dos valores do painel A diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. O quadrante inferior relata os mesmos valores, porém de animais assimétricos. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4). * indica a diferença estatística em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (ANOVA seguida de teste de comparação múltipla Bonferroni).

SIMÉTRICOS

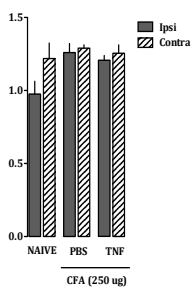
A



B

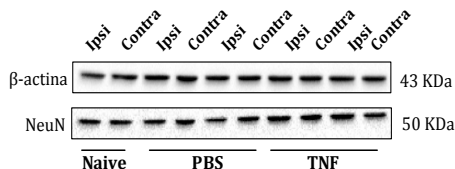


C

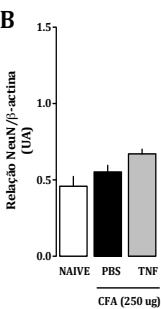


ASSIMÉTRICOS

A



B



C

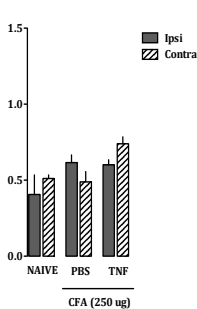


Figura 56: Imunoconteúdo de NeuN, marcador de células neuronais, após 24 dias do estímulo de CFA unilateral na pata no protocolo de administração intratecal de TNF- α 24 horas antes do CFA.

O quadrante superior representa os animais que desenvolveram **simetria** sendo em **A**: Imagens ilustrativas das bandas obtidas por Western Blotting para proteína NeuN (50 KDa) e para o controle por carga β -actina (43 kDa). **B**: a representação em cada barra da razão entre valores médios de três quantificações diferentes da proteína NeuN e o controle por carga β -actina, avaliado por Western Blotting, 24 dias após a administração da bactéria inativada (250 μ g), diluída em adjuvante incompleto de Freund (100 μ l), via subcutâneo, na região plantar de ratos Wistar (fêmeas) e **C**: os valores do painel a diferenciados em hemisfério medular ipsi e contralateral. O quadrante inferior relata os mesmos valores, porém de animais **assimétricos**. Os valores estão expressos como a média \pm EPM (n=4).

4.7.1 Resumo dos resultados encontrados

	EFEITO NO VOLUME DE PATA E ESCORE MEDIANO DE INFLAMAÇÃO (I) E DEGENERAÇÃO (D)		IMUNOCONTEÚDO TOTAL* DE IBA-1 EM RELAÇÃO AO CONTROLE		
	Ipsilateral	Contralateral	3 dias	24 dias	
				Simétrico	Assimétrico
CFA (250 µg <i>M. tuberculosis</i>)	↑ I: 4 D: 3,5	↑ I: 3,5 D: 2,5	>	<	=
Resiniferatoxina (760 ng IT - 24 h antes CFA)	↑ I: 4 D: 2	↓ I: 0 D: 0	—	—	—
Bumetanida (60 µg IT - 0, 1 e 2 dias do CFA)	↓	↓	—	—	—
Bumetanida (60 µg IT - 0, 1, 2, 3 e 4 dias do CFA)	= I: 4 D: 1	↓ I: 0 D: 0	<	=	—
6-OHDA (10 µg IT - 3 dias antes do CFA)	=	↑	—	—	—
Zymosan A (0,01 e 100 ng IT - 24 h antes CFA)	=	↑	—	—	—
Minociclina (50 µg IT - 0, 2 e 4 dias do CFA)	↓ I: 4 D: 0	↓ I: 1 D: 0	<	=	<
Fractalcina (CX3CL1) (30 ng IT - 24 h antes CFA)	= I: 4 D: 1,5	↑ I: 2 D: 3	>	> (contra)	—
TNF-α (1 ng IT - 24 h antes CFA)	= I: 4 D: 1,5	↑ I: 2 D: 3	>	> (contra)	=

Tabela 7: Resultados encontrados no estudo.

A tabela ilustra de forma resumida os tratamentos empregados e os efeitos encontrados comparado com os respectivos controles. ↑, aumento do volume de pata; ↓ diminuição do volume de pata; = sem diferença; _ dado não avaliado; > maior imunocnteúdo de Iba-1; < menor imunocnteúdo de Iba-1; * exceto aos 24 dias após o CFA no grupo fractalcina e TNF-α.

5 DISCUSSÃO

A presença de simetria em um modelo animal de comprometimento articular, oferece uma oportunidade ideal para o estudo de mecanismos e desenvolvimento de estratégias de tratamento nas progressões das lesões artríticas, uma vez que a simetria ocorre, geralmente, com a evolução da doença. No passado, a utilização de um modelo com demonstração de alterações contralaterais, combinado com uma lesão de nervo, forneceu evidências, através de avaliações indiretas, do envolvimento de sistemas neurogênicos na indução e manutenção de tais efeitos contralaterais (BILEVICIUTE et al., 1993; DECARIS et al., 1999; DONALDSON; MCQUEEN; SECKL, 1995; DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993; KIDD et al., 1995; LAM; WONG; NG, 2004; LOMBARD et al., 1999; MAPP et al., 1993; REES et al., 1996). Entretanto, nenhum desses estudos demonstrou, de fato, o desenvolvimento da doença na articulação contralateral homóloga com participação de uma plasticidade funcional de células neuronais e não neuronais presentes na medula espinhal que caracteriza-se o sistema nervoso como indutor da simetria.

Neste estudo em ratos, a partir de um estímulo pró-inflamatório unilateral e não sistêmico, foi possível observar o desenvolvimento da artrite, bilateralmente, com participação de fibras nervosas TRPV1 positivas, uma vez que a lateralização da doença foi inibida pela provável ablação do terminal central desses neurônios de pequeno calibre (fibras C e A δ) que expressam SP e CGRP (HOLZER, 1998; KOMURA et al., 2005) e que são responsáveis pela transmissão de estímulos dolorosos (CATERINA et al., 1997) e do RRD (WILLIS JR., 1999), as fibras peptidérgicas, cuja ativação no corno dorsal da medula espinhal favorece a transmissão sináptica glutamatérgica (JIANG et al., 2009), induzindo a uma sensibilização e facilitação de potenciais de ação ortodrômicos e antidrômicos.

Contudo, a presença de TRPV1 em microglia e a observação *in vitro* que a ativação desse receptor contribuiu na indução de danos celulares, pela entrada de Ca²⁺ e disfunção mitocondrial (KIM et al., 2006), sugerem a possibilidade de que a inibição da artrite contralateral ocorreu devido a um dano na microglia. Os resultados

obtidos no teste comportamental com capsaicina demonstraram a redução dos comportamentos evocados por esse agonista TRPV1 na pata, indicando a efetividade da ocorrência de dessensibilização dessas fibras. Logo, mesmo havendo, também, uma interferência na atividade microglial, a interrupção da condução dos potenciais de ação na fibra TRPV1 seria sempre primordial para os componentes neurogênicos da inflamação periférica.

Entretanto, na pata ipsilateral, houve um aumento do volume e dos danos teciduais com a injeção da neurotoxina. Uma captação sustentada de Ca^{2+} subsequente ao RTX IT, mas anterior a dessensibilização (ACS et al., 1997) tem como consequência uma liberação substancial de neuropeptídeos na periferia (IMMKE; GAVVA, 2006; RAZAVI et al., 2006; SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Esses neuropeptídeos liberados podem ter contribuído para um *imprinting* inflamatório no tecido periférico, conduzindo a uma posterior reação local exacerbada ao CFA. Posteriormente, uma maior presença de neuropeptídeos nessa mesma pata pôde ter sido mantida via DRG (BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011), pois a ação dos mediadores inflamatórios produzidos em resposta ao CFA são capazes de ativarem vias eferentes com liberação de SP e CGRP, inclusive através do TRPV1, que além do mais, tem a sua expressão aumentada na periferia em resposta à perda do terminal central pela RTX IT (JEFFRY et al., 2009b; BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011).

A ausência de efeitos sistêmicos importantes, como ocorrido com as maiores doses de CFA, bem como a provável excitotoxicidade somente no âmbito medular, pela baixa dose de RTX, contribuíram para a caracterização do papel da medula espinhal na progressão da simetria. Contudo, foi a redução do aumento de volume de ambas as patas vista no bloqueio farmacológico de NKCC1 via bumetanida IT, quem, de forma complementar, evidenciou o papel da medula e, provavelmente, do RRD como promotor dos efeitos periféricos e contralaterais. O RRD ocorre a partir das lâminas superficiais do corno dorsal (CHABWINE et al., 2009; WILLIS, 1999), local onde os transportadores de Cl^- (NKCC1) são identificados nos neurônios sensoriais de ratos, o que não ocorre em lâminas profundas (MORALES-AZA et al., 2004). O bloqueio espinhal de NKCC1, de forma dependente de dose, reduz a atividade de RRD, inflamação

neurogênica, alodinia mecânica e hiperalgesia em sítios secundários, quando o bloqueador é administrado antes e não após a capsaicina (VALENCIA-DE ITA, 2006).

Esse efeito da bumetanida, particularmente, foi observado com uma cinética diferente, quando comparamos as patas ipsi e contralaterais para cada protocolo de administração de bumetanida. A interpretação dessa descoberta pode envolver a alteração da expressão dos transportadores de Cl^- nos processos inflamatórios, o que contribuiria para uma ação da bumetanida para além do NKCC1 (VALENCIA-DE ITA, 2006), ou mesmo, para além do NKCC1 das células neuronais (HÜBNER; LORKE; HERMANS-BORGMEYER, 2001; KANAKA et al., 2001).

Na avaliação da expressão dos transportadores de Cl^- por imunohistoquímica, em modelo de artrite por CFA, foi possível visualizar um aumento de NKCC1 e KCC2 de forma bilateral na fase inicial do modelo (4 dias após o CFA no joelho), com redução gradativa dessa expressão até níveis basais aos 10 dias. Em relação ao RNA_m da proteína KCC2, o aumento foi somente na medula espinhal ipsilateral, enquanto que o RNA_m da proteína NKCC1 aumentou bilateralmente, porém, em menor magnitude na contralateral nessa fase inicial. Mais ainda, é relatada uma perda ou mesmo ausência de NKCC1 no DRG ipsilateral, enquanto que, na contralateral, os níveis continuam iguais aos comparados com animais controle (MORALES-AZA et al., 2004). Em estudo mais recente, a expressão em corno dorsal de NKCC1 permaneceu inalterada e o KCC2 foi reduzido de forma gradual logo após 24 horas do CFA em hemisfério medular ipsilateral, o que começou a ocorrer 7 dias após em contralateral (ZHANG; LIU; XU, 2008). De qualquer forma, mesmo divergentes, esses estudos demonstram que as alterações na expressão desses transportadores de Cl^- ocorrem no modelo de CFA e que a cinética e magnitude são diferentes em cada hemisfério medular.

A confirmação da influência da expressão dos transportadores de Cl^- na inibição do aumento de volume de pata poderia ser obtida pela quantificação de NKCC1. Contudo, a interpretação dos dados seria complicada devido à expressão de NKCC1 em neurônios e astrócitos (HÜBNER; LORKE; HERMANS-BORGMEYER, 2001; KANAKA et al., 2001). Tal fato, mostrou-se

provável, pois neste estudo, houve uma redução da expressão de microglia ativa 3 dias após o CFA com a administração de bumetanida IT; pertinentemente, a redução da atividade microglial observada foi ipsilateral e o tratamento de 3 dias de bumetanida foi o único com efeito na pata ipsilateral, dentre os protocolos com esse fármaco. Dessa forma, foi possível evidenciar um indicativo de efeito indireto da bumetanida na microglia, tanto pela redução da excitabilidade neuronal e, obviamente, diminuição da liberação de neurotransmissores, como também por um possível efeito em astrócitos. Os recentes estudos sugerem que a ativação de NKCC1 leva a um aumento de volume em astrócitos e induz a liberação de glutamato por essa célula (CHEN et al., 2005; HUANG et al., 2014). O que fica de fato, é que o sistema nervoso e o sistema imune exercem influências bidirecionais (IKEDA; KIRITOSHI; MURASE, 2012), e o bloqueio de um mecanismo importante para o RRD, como o acúmulo de Cl^- intracelular pelo NKCC1, foi suficiente para demonstrar a participação do RRD periféricamente, mas também, centralmente.

Na sequência, é questionável, também, a capacidade para detectar de forma confiável o NKCC1 imunohistoquimicamente (CHEN et al., 2005; DIXON et al., 1999; SUN et al., 2008; ZHANG; FINA; VARDI, 2006; ZHANG; LIU; XU, 2008). Um anticorpo produzido para detectar a NKCC1 fosforilada seria mais apropriado, proporcionando, desse modo, dados da presença e do estado funcional dos NKCC1 (FLEMMER, 2002) juntamente com a marcação para a identificação das diferentes células onde a proteína estaria expressa. Na ausência de técnicas de imunohistoquímica confiáveis, outros métodos, incluindo o bloqueio farmacológico seletivo com bumetanida e análise de animais *knockout* NKCC1 são usadas para avaliar a funcionalidade do NKCC1 (KHIRUG et al., 2005).

Além dos cotransportadores NKCC e KCC da família do gene SLC12, as proteínas de membrana da família SLC4 também movem ânions, tais como as dos grupos: (1) o cotransportador de bicarbonato de sódio ($\text{N}^+ / \text{HCO}_3^-$), (2) o permutador independente de $\text{Na}^+ / \text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ e (3) o trocador de $\text{Na}^+ / \text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ (OBARA; SZELIGA; ALBRECHT, 2008), bem como o GABA_A canaliza Cl^- e HCO_3^- (FATIMA-SHAD; BARRY, 1993) assim, é possível que esses

mecanismos desempenhem um papel na PAD e poderiam estar influenciando os resultados observados. No entanto, os estudos que bloqueiam o NKCC1 com bumetanida e não furosemida indicam que o NKCC1 parece ser o acumulador principal de Cl⁻ em neurônios do DRG de mamífero (ALVAREZ-LEEFMANS et al., 1988; BRUMBACK; STALEY, 2008). A furosemida bloqueia tanto NKCC1 e KCCs com uma potência igual, gerando um fator de confusão óbvia pelo efeito simultâneo nos transportadores. Além disso, furosemida tem efeitos inibidores sobre receptores NMDA e GABA_A (STALEY, 2002).

O papel da medula espinhal e do RRD na evolução da artrite não pôde ser demonstrada pelos resultados do protocolo de estímulo com NMDA IT, mesmo havendo algum potencial de efeito com a dose de 1 pMol no início do modelo. Segundo YASTER e colaboradores (2011), o aumento de glutamato em uma fenda sináptica promove o aumento da expressão de transportadores de glutamato no lado contralateral, reduzindo, neste hemisfério, a quantidade de glutamato como efeito compensatório, pois os transportadores de glutamato regulam a intensidade, o espaço e o tempo da codificação da entrada sensorial, impedindo a ativação excessiva dos receptores de glutamato nas células neuronais e não neuronais do corno dorsal da medula espinhal (NIE; WENG, 2009). Logo, um recurso biológico para evitar os efeitos neurotóxicos do excesso do aminoácido excitatório na fenda sináptica.

Uma outra forma de caracterizar o RRD envolveria a transmissão gabérgica. O *input* aumentado de informações é capaz de promover uma regulação positiva de mecanismos gabaérgicos no corno dorsal (SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995), como tem sido demonstrado após a injeção de CFA na pata (CASTRO-LOPES et al., 1992, 1994a, 1994b; NAHIN; HYLDEN, 1991). A possibilidade de efeitos ambíguos na manipulação da circuitaria neuronal de deflagração do RRD pelo GABA levaria a interpretações conflitantes pela diferenciação em efeitos excitatórios quando a atuação é pré-sináptica e inibitórios quando pós-sináptica (BARDONI et al., 2013).

Porém, os resultados do protocolo de 6-OHDA de modo indireto, demonstraram uma outra forma de observar alguma influência da PAD e RRD nesse modelo. Os tratamentos com 6-OHDA não afetam a liberação espinhal de 5-HT, enquanto a liberação de NA é, praticamente, eliminada pelo tratamento (LEI et al., 2011). A

provável retirada de NA aumentou a incidência de simetria no modelo deste estudo. A NA induz a PAD, a inibição pré-sináptica (WILLIS JR., 1999) e a redução da transmissão das informações nociceptivas para os neurônios de segunda ordem (BELCHER; RYALL; SCHAFFNER, 1978; HEADLEY; DUGGAN; GRIERSMITH, 1978; JANKOWSKA et al., 1997; NOGA; BRAS; JANKOWSKA, 1992). No entanto, esse resultado não deixa claro se a inibição produzida por essa monoamina resultou de uma ação direta sobre os terminais do aferente primário ou se ocorreu através da ativação dos interneurônios inibitórios, ou ainda, se foi por um efeito inibidor pós-sináptico.

Embora seja muito provável que a inibição pré-sináptica desempenhe um papel importante no processamento da informação sensorial, a contribuição exata da inibição pré-sináptica comparada com a pós-sináptica é de difícil definição, pelo presente, devido às dificuldades inerentes de uma interferência seletiva em apenas um dos dois componentes. No entanto, a redução imediata no tamanho dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal (ZIEGLGANSBERGER; HERZ, 1971), e na adaptação à estimulação sensorial repetida (DE KONINCK; HENRY, 1994) após a aplicação de GABA ou de agonista do receptor GABA_A na medula espinhal, são, no mínimo, consistentes com uma contribuição do tipo inibição pré-sináptica para o processamento de estímulos sensoriais cutâneos.

Todavia, mesmo com as evidências morfológicas de uma relevante inervação gabaérgica nos terminais de nociceptores primários, especialmente para nociceptores peptidérgicos (BERNARDI et al., 1995; TODD, 1996), as provas de apoio substancial vêm das experiências fisiológicas, as quais têm demonstrado a presença de RRDs em axônios de aferentes primários sensíveis à capsaicina (LIN; ZOU; WILLIS, 2000) e o bloqueio por bicuculina intratecal de respostas que dependem da liberação de CGRP a partir dos terminais de nociceptores periféricos peptidérgicos (LIN; WU; WILLIS, 1999). Além do mais, mesmo na ausência de uma inervação direta por sinapses axo-axônica, na totalidade dos nociceptores primários, o GABA pode ainda atuar como um transmissor por volume (RUDOMIN; SCHMIDT, 1999). Nesse caso, os receptores GABA_A ao longo do segmento medular do axônio de um aferente primário, pode ser ativado por GABA do

ambiente, causando inativação dos canais de Na^+ dependente de voltagem, o que impediria a invasão do terminal pré-sináptico por potenciais de ação axonal (ZEILHOFER; WILDNER; YEVENES, 2012).

De fato, a sequência de resultados das tentativas de interferência na transmissão neuronal do modelo de CFA simétrico evidenciaram uma relação das vias neuronais sensoriais e o desenvolvimento de artrite na pata contralateral. Os efeitos contralaterais foram qualitativamente semelhantes aos que ocorreram no lado ipsilateral, mas, geralmente, eram menores em magnitude e diferentes no curso temporal. Os resultados podem ser, simplesmente, interpretados como epifenômenos, sem um propósito biológico. De qualquer forma, a existência desses achados implica a presença de mecanismos de sinalização não reconhecidos que ligam os dois lados do corpo. Essa relação entre os hemisférios medulares, de modo especulativo, estaria presente através de interneurônios comissurais com capacidade para mediar alterações contra-específicas (SZENTAGOTHAÏ, 1964). Os estudos iniciais, a respeito dessas projeções de um corno dorsal para outro, no entanto, descobriram que as células com campo contralateral inibitório, na maioria dos casos, eram reflexos do campo ipsilateral excitatório (FITZGERALD, 1982) e que o estímulo de alto limiar em fibras aferentes primárias C e A δ do nervo ciático inibe as células do corno dorsal, do outro lado da medula espinhal (FITZGERALD, 1983). Enquanto um padrão oposto de atividade pode estar por trás do efeito contralateral inibitório (ALLNATT; DICKSON; LISNEY, 1990; KOLSTON et al., 1991), há inúmeras razões para propor que as mudanças dependem de sinais químicos. A sinalização transmediana via interneurônios requereria que os sinais atravessassem as sinapses e, assim, a atividade elétrica alcançaria este outro lado, mas apenas em uma única direção (KOLTZENBURG; WALL; MCMAHON, 1999).

A compreensão da comunicação ou passagem da informação de um hemisfério ao outro não deve restringir-se a uma via neuronal exclusiva. A notável relação entre as células neuronais e não neuronais, que identifica as células gliais como responsivas aos sinais vindos da periferia, do cérebro ou, ainda, dos desafios imunológicos na medula espinhal, implica a capacidade dessas

células em intermediar um efeito contralateral. Em concordância com os estudos prévios em modelos de inflamação aguda e crônica (BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010; SHAN et al., 2007; SUN et al., 2008), o presente estudo relata a ativação robusta e bilateral da microglia associada ao desenvolvimento de artrite simétrica.

A ativação microglial é um fenômeno fundamentalmente diferente em comparação com os neurônios, por exemplo. O termo "ativação" refere-se a um aumento da capacidade de uma célula para realizar uma função além daquela que apresenta num estado basal. Para os neurônios, a ativação é unidimensional, que se refere, principalmente, à produção do potencial de ação (WATKINS; MAIER, 2002, 2003). Por contraste, a ativação de células gliais é multidimensional, pois a microglia executa várias funções. Portanto, há muitos estados de atividade diferentes, com vários componentes expressos em tempo, curso e intensidade diferentes que são dependentes do estímulo que provoca a ativação.

A microglia no SNC normal é uma célula quiescente (PERRY; GORDON, 1988), mas dinâmica (NIMMERJAHN, 2005; TREMBLAY et al., 2011; WAKE et al., 2009). Nesse estado, exibe uma morfologia ramificada, sem qualquer ativação de p38, e pouca ou nenhuma expressão de receptores, ou marcadores da superfície celular das atividades funcionais características da microglia ativada (PERRY; GORDON, 1988). Em resposta a uma variedade de estímulos, de forma gradual, a ativação microglial ocorre e passa a ser caracterizada por uma morfologia específica (processos retraídos e hipertrofiados ou morfologia ameboide sob condições fortemente patológicas), por proliferação, pelo aumento da expressão de marcadores de superfície celular ou receptores, e/ou alterações nas atividades funcionais (migração para áreas de lesão, a fagocitose, a produção e liberação das substâncias proinflamatórias) (PERRY; GORDON, 1991). A forma em que é expressa a ativação é dependente do tipo e intensidade do estímulo indutor, e diferentes padrões e tempos de respostas podem ocorrer (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Entretanto, neste estudo, essa ativação microglial, vista pelo aumento da imunorreatividade a marcação por Iba-1, não foi observada de forma proporcional ao estímulo. Na dose de 500 µg de CFA na pata, 3 dias após, a marcação não foi maior que a encontrada

nos animais que receberam 250 µg de CFA e, assemelhou-se aos animais controles, com ainda, um baixo índice de simetria. Inclusive, essa imunorreação foi menor que a dos animais controle aos 24 dias após o CFA. A proteína Iba-1 é constitutivamente expressa pela microglia, sendo entretanto, moderadamente expressa em microglia quiescente, mas fortemente expressa em resposta a estímulos de ativação (HINWOOD et al., 2012). A nomenclatura dos estados funcionais da microglia varia em toda a literatura (KREIDER et al., 2007; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009), mas pode ser caracterizado em quatro estados principais: M1 - classicamente ativados com propriedades citotóxicas; M2a - com uma ativação alternativa e envolvidos na reparação e regeneração; M2b - um fenótipo imunoregulador; ou M2c - um fenótipo desativado (CHHOR et al., 2013). Os estados funcionais podem ser influenciados pela atividade do neurônio, sendo o excesso de neurotransmissores excitatórios indutor de efeitos citotóxicos nessas células (ADAMS et al., 2015). A reduzida presença de fenótipos ativados na maior dose de CFA demonstra a participação de um fenótipo ativo no processo de lateralização, mas dentro de um limiar viável a célula.

Mesmo sem avaliar o estado funcional da microglia, o uso de um ligante exógeno (Zymosan) de um receptor expresso na microglia (TLR2) (BSIBSI et al., 2002; LAFLAMME; SOUCY; RIVEST, 2008; ZEKKI; FEINSTEIN; RIVEST, 2002), corroborou na identificação de uma relação do estado funcional da microglia e o aumento da incidência de lateralização. Além do papel no reconhecimento de um invasor do organismo, os TLRs têm sido implicados no desencadeamento de doenças autoimunes (DREXLER; FOXWELL, 2010). Esses receptores nas microglias desencadeiam uma série de funções que estão presentes nos processos inflamatórios, mesmo na ausência de um agente infeccioso, e estão de acordo com os indícios de que uma variedade de ligantes endógenos ativam TLRs e foram identificados em sistemas biológicos, podendo servir como atores desses receptores expressos constitutivamente (ERRIDGE, 2010). A administração IT de agonistas de TLR2 produz ativação microglial com expressão de NOX2 crucial para a hipersensibilidade, sendo esse efeito abolido em animais *knockout* TLR2, mas não em TLR3 ou 4 (LIM; KIM; LEE, 2013). Além disso, os ligantes de TLR regulam a expressão de

TRPV1, levando a uma maior fluxo de Ca^{2+} nos neurônios que o expressam (QI et al., 2011). Do lado oposto, a administração de agentes que reduzem a ativação glial inibem os efeitos facilitadores de agonistas TLR IT (HUA et al., 2005; RAGHAVENDRA, 2003; SAITO et al., 2010).

Neste estudo, de fato, a prevenção da ocorrência da simetria foi associada com o bloqueio da ativação microglial pela administração intratecal prévia e repetida de minociclina, o que não ocorreu com a administração intraperitoneal, mostrando por essa dose e via um mecanismo medular exclusivo. Acredita-se que a ação da minociclina sobre a microglia ocorre sem efeito direto em astrócitos, oligodendrócitos e neurônios (AMIN et al., 1996; TIKKA et al., 2001). Porém, a inibição da microglia pode indiretamente bloquear a ativação de astrócitos (RAGHAVENDRA, 2003). A microglia parece ser a primeira das células gliais que responde, na medula espinhal, aos insultos periféricos e os produtos liberados da microglia ativada, por sua vez, levam à ativação de astrócitos (LEDEBOER et al., 2005). Em modelos animais, os aumentos da expressão de GFAP, em astrócitos da medula espinhal, foram observados após a ativação da microglia (POPOVICH; WEI; STOKES, 1997; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004; RAGHAVENDRA, 2003; SUN et al., 2008; SVENSSON et al., 1993) enquanto que uma robusta ativação de microglia é relatada poucos horas após a monoartrite (ARRUDA et al., 2000; LEDEBOER et al., 2005; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004; RAGHAVENDRA, 2003; SUN et al., 2008; VERGE et al., 2004). Os astrócitos desempenhariam um papel no início da dor aguda e na manutenção da dor crônica, enquanto que a ativação da microglia é importante na fase inicial da dor crônica (KAWASAKI et al., 2008; RAGHAVENDRA; TANGA; DELEO, 2004; ROMERO-SANDOVAL et al., 2008). Esse curso dinâmico dos fatos se encaixa no tempo de ativação sequencial de neurônios, microglia e astrócitos, como foi confirmado pelo padrão temporal de ativação de proteínas MAPK (SCHOLZ; WOOLF, 2007; ZHUANG et al., 2005).

Um outro efeito indireto da minociclina na redução da ativação glial seria pela sua suposta ação neuroprotetora. A minociclina *in vitro* deprime a neurotransmissão glutamatérgica, a

sinalização de cálcio e reduz a produção de NO (GONZÁLEZ et al., 2007; HUANG et al., 2010). Além disso, em contraste com os estudos mostrando a ausência de efeito da minociclina nos neurônios do DRG (CHO et al., 2006), há relatos em que a minociclina inibe correntes de Na⁺ nesses neurônios e que isso poderia explicar, parcialmente, os efeitos analgésicos da minociclina (KIM et al., 2011) que vêm sendo demonstrados em diversos modelos de dor (BRADESI et al., 2009; HAINS, 2006; HUA et al., 2005; LEBLANC et al., 2011; LEDEBOER et al., 2005).

Um ponto de partida para especular a forma como ocorre a comunicação entre as células da microglia e as fibras TRPV1 positivas e capsaicina sensíveis, capaz de promover a ocorrência de um processo inflamatório em articulação contralateral, foi obtido com a administração IT prévia de CX3CL1 e TNF- α . Ambos os tratamentos aumentaram e anteciparam o desenvolvimento de simetria associado a uma maior ativação microglial bilateral 3 dias após o CFA na pata. Aos 24 dias, não havia diferença entre os animais simétricos controles e os CX3CL1 ou TNF- α , exceto na avaliação diferencial onde o lado contralateral permaneceu mais imunorreativo nos dois protocolos. A ausência de diferença, em relação aos grupos controles para os animais que desenvolveram simetria, demonstra uma correlação dos tratamentos com o curso fisiopatológico normal do modelo, ou seja, não estamos observando efeitos por mecanismos paralelos, obviamente, considerando esse parâmetro como referência.

Significativamente, foi possível visualizar, no decorrer deste estudo, a constatação de que os tratamentos precoces na medula para sensibilização com Zymosan A, TNF- α e Fractalcina ou para inibição com a minociclina, interferiram no desenvolvimento de lateralização, enquanto que os tratamentos tardios não tiveram grandes efeitos ou tiveram um efeito antagônico como o TNF- α . Consistentemente, o tratamento preventivo, mas não a administração pós-monoartrite de minociclina não só bloqueou a ativação da microglia, mas também reduziu a expressão GFAP em ratos com monoartrite (CAO; ZHANG, 2008; CUI et al., 2008). Muito, provavelmente, devido ao fato de que uma vez promovida ativação glial e liberação de citocinas, ocorre um ciclo autossuficiente de promoção de mais ativação glial. Interferir nesse ciclo de forma

tardia não é efetivo e a administração de indutores de aumento de atividade neuronal após sensibilização da transmissão, podem conduzir a uma inviabilidade celular por efeitos neurotóxicos desse excesso de agentes estimulantes. As altas concentrações de TNF- α suscitam em apoptose ou morte neuronal via caspase 3 (ZHAO et al., 2001) e, a associação de TNF- α com glutamato intensifica essa morte neuronal, criando áreas "mortas" com presença de microglia ativa ao redor (HERMANN; HOLMES; ROGERS, 2005).

No entanto, a dose de 1 ng 24 horas antes do CFA não alterou a imunorreatividade ao NeuN aos 24 dias do modelo para os grupos com ou sem simetria, indicando a preservação de viabilidade celular. A ocorrência de simetria estaria assim, relacionada ao efeito do TNF- α em aumentar a resposta dos neurônios para o estímulo nocivo (ONDA et al., 2002) e não ao efeito tóxico. Os estudos da estrutura do TNF- α indicam que ele pode ser inserido nas membranas lipídicas de modo a formar uma região do tipo poro central, o que pode ser facilitado por um pH mais baixo do microambiente. As moléculas de TNF inseridas formam canais de sódio dependentes de voltagem (KAGAN et al., 1992). Outras evidências sugerem que o TNF interage com os canais de sódio e cálcio endógenos para aumentar a condutância da membrana (VAN DER GOOT et al., 1999; WILKINSON et al., 1996).

Em contrapartida, os tratamentos para inibição dessa sensibilização central somente tiveram resultados satisfatórios pela administração contínua, como da administração de doses subsequentes de minociclina ou bumetanida iniciadas logo após ao estímulo por CFA. Enquanto que a administração IT prévia e única de minociclina ou bumetanida não promoveu a redução do edema articular contralateral. Esses resultados não descaracterizam os mecanismos propostos para a simetria da artrite, mas de que o bloqueio da atividade com intuito de reduzir o evento inflamatório periférico deve abranger todas ou grande parte dos mecanismos que são capazes de promover sensibilização central e/ou ativação glial ou, ainda, que esse bloqueio deve atuar de forma mais prolongada e constante como, por exemplo, pela administração contínua de bloqueadores de citocinas, anti-fractalcina e anti-TNF- α , na medula espinhal com o uso de uma bomba osmótica. Pois,

outros neurotransmissores liberados pelos neurônios como o glutamato e a SP são capazes de continuarem ativando as células gliais, e essas não liberam somente TNF- α , mas também outras citocinas capazes de efeitos finais similares (PINTEAUX et al., 2002), ou seja, é ineficiente bloquear, somente, um agente ativador. Além disso, o bloqueio temporário pela administração única em um modelo crônico de 35 dias não impede que essa sensibilização central possa ocorrer após o término da ação desses bloqueadores. Em modelo de CFA unilateral, o uso contínuo de anti-TNF- α IT reduziu tanto o desenvolvimento quanto a manutenção da inflamação, de forma bilateral, sendo esse efeito superior à administração sistêmica (BOETTGER et al., 2010).

Relativamente, os primeiros 3 meses da AR representam uma fase patologicamente distinta que se traduz em uma janela terapêutica importante `a **remissão** do quadro inflamatório (DEMORUELLE; DEANE, 2012; MOTTONEN et al., 2002; NELL, 2004; RAZA et al., 2005). Ademais, intervenções farmacológicas precoces podem retardar a progressão da artrite inflamatória indiferenciada a uma AR classificável (DEMORUELLE; DEANE, 2012). Finalmente, o objetivo da gestão da AR, ultimamente, é a prevenção da doença articular inflamatória persistente e, com isso, o bloqueio da deficiência ou debilidade física pela evolução do quadro clínico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior ocorrência de simetria no modelo de CFA na pata (250 µg de *Mycobacterium tuberculosis*) correlacionou-se com a maior imunorreatividade de Iba-1, um marcador de células microgliais ativas, aos 3 dias do modelo, inclusive, no hemisfério contralateral ao estímulo periférico. A provável liberação de citocinas pelas microglias ativas nesse hemisfério medular seriam capazes de sensibilizar os neurônios e interneurônios, facilitando a ocorrência do RRD. A atividade antidrômica por sua vez, aumentaria a liberação de neuropeptídeos conduzindo ao desenvolvimento e manutenção de um ambiente inflamatório na articulação contralateral. Esse cenário seria receptivo para as células T_H1 ativadas e circulantes pela inflamação ipsilateral, culminando no desenvolvimento da artrite contralateral.

Essa hipótese baseia-se na observação da redução de ocorrência de simetria quando os animais foram tratados com resiniferatoxina e bumetanida intratecal, tratamentos que envolvem a ablação medular de fibras peptidérgicas e o bloqueio do acúmulo de Cl⁻, fundamentais para a ocorrência do RRD. Da mesma forma que, o tratamento com minociclina, um inibidor do fenótipo ativo de microglia, reduziu a imunorreatividade de Iba-1 da medula e o aumento de volume de ambas as patas.

A existência de uma relação entre células da microglia e fibras peptidérgicas, da medula espinhal, pôde ser confirmada pela administração das citocinas liberadas pelos neurônios com ação na microglia e vice-versa, fractalcina e TNF-α. Uma vez que, ambas aumentaram a imunorreatividade de Iba-1 da medula e a ocorrência de simetria.

A figura 57 demonstra os possíveis fatos que envolvem as fibras aferentes primárias, a deflagração do RRD e a microglia na simetria da artrite por CFA em ratos.

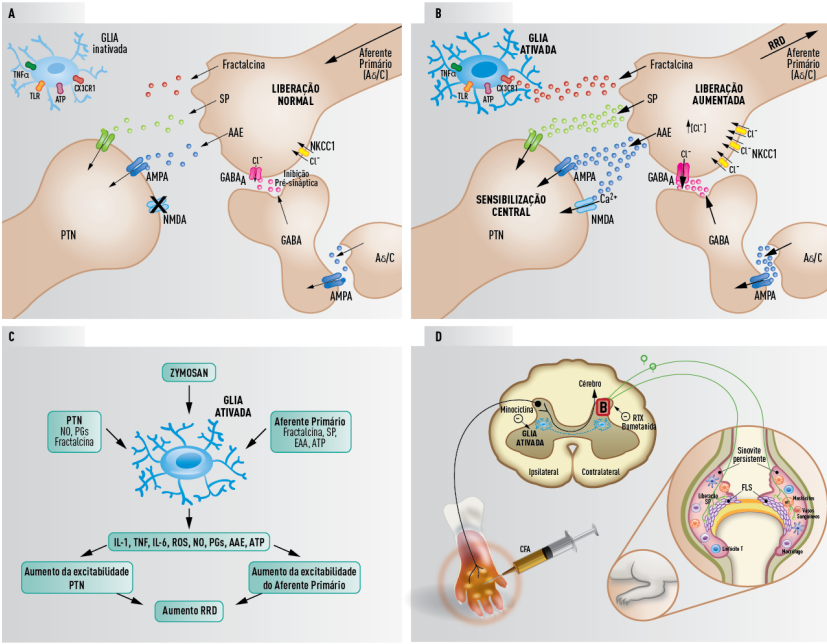


Figura 57: Transmissão sensorial pelas fibras aferentes primárias, a sensibilização central e deflagração do Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) com envolvimento das células da microglia na simetria da artrite por CFA em ratos.

A: Em situações normais, as informações sobre estímulos nocivos chegam a partir da periferia ao longo de fibras A- δ e C, causando a liberação pelo terminal do aferente de substância P (SP) e de aminoácidos excitatórios (AAEs) em quantidades adequadas para a intensidade e duração do estímulo nocivo inicial. Esse controle, na quantidade de neurotransmissor, ocorre também devido à inibição pré-sináptica, um evento que envolve interneurônios gabaérgicos que formam sinapses do tipo axo-axônica no terminal central dos aferentes primários. A liberação de GABA pelo interneurônio leva à despolarização da membrana aferente primária (PAD), pois a ligação do GABA no receptor GABA_A promove o efluxo de Cl⁻ em conformidade à alta concentração intracelular desse íon mantida pelo cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC1). Por consequência, a ativação dos receptores de neurocinina-1 (NK-1), os receptores de SP e a ativação de

alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) por AAE causam despolarização transitória dos neurônios de transmissão pós-sinápticos (PTNs), gerando, desse modo, potenciais de ação que são retransmitidos para as áreas cerebrais superiores. Canais de N-metil-D-aspartato (NMDA) estão inoperantes, pela ligação aos íons de magnésio. As células gliais estão presentes, mas em repouso. **B:** Em situações patológicas, ocorre uma intensa e/ou prolongada entrada de informação nociceptiva ou não (alodinia) levando ao aumento da liberação de neurotransmissores, tanto pelo terminal do aferente primário quanto pelos interneurônios gabaérgicos. Esse aumento da liberação de SP e AAE despolariza de forma mais intensa os PTN's de tal forma que os íons de magnésio são deslocados do canal NMDA aumentando o influxo de Ca^{2+} , promovendo sensibilização central. O aumento da liberação de fractalcina (assim, como ATP, AAEs...), também pelo terminal do aferente primário, ativa a glia pelo receptor CX3CR1. Essa ativação é conceituada como uma força motriz para a criação e manutenção do estado de sensibilidade aumentada das comunicações sensoriais na medula. Já o aumento da liberação de GABA pelo interneurônio, concomitante ao aumento na expressão de NKCC1 pela fosforilação do cotransportador, em processos inflamatórios, favorece uma mudança na intensidade da PAD que, dessa forma, torna-se um evento excitatório e promotor da deflagração do RRD. **C:** O papel das células gliais no aumento da excitabilidade neuronal uma vez ativada, seja por antígenos, SP, AAEs, fractalcina, ATP ou prostaglandinas (PGs) ocorre através da liberação exagerada de NO, AAEs, espécies reativas de oxigênio (ROS), as PG's, citocinas proinflamatórias como por exemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-6, o fator de necrose tumoral (TNF), BDNF (não demonstrado). Modificado, de Elsevier Science Ltd (2001). **D:** O estado funcional das células gliais contralaterais é influenciado por esse cenário pró-inflamatório do estímulo sensorial persistente ipsilateral (por exemplo, a administração de CFA na pata). A liberação de citocinas pelas células gliais sensibiliza os neurônios e interneurônios facilitando a ocorrência do RRD (ilustrado no quadrante B). A atividade antidrômica aumenta a liberação de neuropeptídeos conduzindo ao desenvolvimento e manutenção de um ambiente inflamatório na articulação contralateral, com ativação de fibroblastos, proliferação e aumento da função das células T, ativação da produção de citocinas pelos mastócitos, aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e indução de angiogênese. Esse cenário seria receptivo para as células T_H1 ativadas e circulantes pela inflamação ipsilateral, culminando no desenvolvimento da lateralização do processo inflamatório.

7 REFERÊNCIAS

ACS, G. et al. Differential activation and desensitization of sensory neurons by resiniferatoxin. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 14, p. 5622-8, 1997.

ADAMS, A. C. et al. Microglia in Glia-Neuron Co-cultures Exhibit Robust Phagocytic Activity Without Concomitant Inflammation or Cytotoxicity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2015.

AIYAR, N. et al. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide Type 1 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 11325-29, 1996.

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569-81, 2010.

ALIPRANTIS, A. O. Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 736-39, 1999.

ALLNATT, J. P.; DICKSON, K. E.; LISNEY, S. J. W. Saphenous nerve injury and regeneration on one side of a rat suppresses the ability of the contralateral nerve to evoke plasma extravasation. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 2, p. 219-22, 1990.

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, v. 36, n. 2, p. 165-179, 2001.

ALVAREZ-LEEFMANS, F. . et al. Immunolocalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. **Neuroscience**, v. 104, n. 2, p. 569-82, 2001.

ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. et al. Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. **The Journal of Physiology**, v. 406, p. 225–46, 1988.

ALVAREZ-LEEFMANS, F. J. Chloride transporters in presynaptic inhibition, pain and neurogenic inflammation. In: ALVAREZ-LEEFMANS, F. J.; DELPIRE, E. (Eds.). . **Physiology and Pathology of chloride transporters and channels in the nervous system**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2010. p. 439–70.

AMANN, R. et al. Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: Bilateral response to unilateral intraplantar injections. **Neuroscience Letters**, v. 203, p. 171–4, 1996.

AMIN, A. R. et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: Effects on nitric oxide synthases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 14014–19, 1996.

ANKENY, D. P.; POPOVICH, P. G. Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1112–21, 2009.

ANSEL, J. C. et al. Interactions of the skin and nervous system. **The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding**, v. 2, n. 1, p. 23–26, 1997.

APPENDINO, G.; SZALLASI, A. Euphorbium: Modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. **Life Sciences**, v. 60, n. 10, p. 681–96, 1997.

ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 5, p. 208–15, 1999.

ARMANT, M. A.; FENTON, M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. **Genome Biology**, v. 3, n. 8, p. 3011–16, 2002.

ARNETT, F. C. et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 31, n. 3, p. 315–24, 1988.

ARRUDA, J. L. et al. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. **Brain Research**, v. 879, n. 1-2, p. 216–25, 2000.

ASENSIO, V. C.; CAMPBELL, I. L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 11, p. 504–12, 1999.

AVERBECK, B.; REEH, P. W.; MICHAELIS, M. Modulation of CGRP and PGE2 release from isolated rat skin by alpha-adrenoceptors and kappa-opioid-receptors. **Neuroreport**, v. 12, n. 10, p. 2097–2100, 2001.

BAGUNA, J.; SALO, E.; ROMERO, R. Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. **International Journal of Developmental Biology**, v. 33, n. 2, p. 261–6, 1989.

BAKER, D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 231–66, 1998.

BAKER, G. H. Life events before the onset of rheumatoid arthritis. **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 38, n. 1, p. 173–7, 1982.

BALLANYI, K.; GRAFE, P. An intracellular analysis of gamma-aminobutyric-acid-associated ion movements in rat sympathetic neurones. **The Journal of Physiology**, v. 365, p. 41–58, 1985.

BANIK, R. K.; KASAI, M.; MIZUMURA, K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. **Experimental Animals**, v. 51, n. 2, p. 197–201, 2002.

BAO, L. et al. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. **Neuroreport**, v. 12, p. 3905-8, 2001.

BARDONI, R. et al. Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1279, p. 90-6, 2013.

BARRON, D. H.; MATTHEWS, B. H. "Recurrent fibres" of the dorsal roots. **The Journal of Physiology**, v. 85, n. 1, p. 104-8, 1935.

BARTLETT, D. B. et al. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. **Aging Cell**, v. 11, n. 5, p. 912-5, 2012.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 277, n. 2, p. 302-12, 1988.

BAZAN, J. F. et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature**, v. 385, n. 6617, p. 640-4, 1997.

BELCHER, G.; RYALL, R. W.; SCHAFFNER, R. The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat. **Brain Research**, v. 151, n. 2, p. 307-21, 1978.

BERG, W. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 5, p. 250, 2009.

BERNARDI, P. S. et al. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 1363-71, 1995.

BESONG, G. et al. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 5403-5411, 2002.

BILEVICIUTE, I. et al. Bilateral changes of substance P, neurokinin A, calcitonin gene related peptide and neuropeptide Y- like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. **Neuroscience Letters**, v. 153, n. 1, p. 37–40, 1993.

BILEVICIUTE, I. et al. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 6, p. 1304–12, 1998.

BILEVICIUTE, I.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Is the pretreatment effect of low dose Freund's adjuvant on adjuvant arthritis due to an activation of the nervous system? **Neuropeptides**, v. 30, n. 5, p. 405–411, 1996.

BILLIAU, A; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 6, p. 849–60, 2001.

BISHNOI, M.; BOSGRAAF, C. A.; PREMKUMAR, L. S. Preservation of acute pain and efferent functions following intrathecal resiniferatoxin-induced analgesia in rats. **Journal of Pain**, v. 12, p. 991–1003, 2011.

BIVER, E. et al. Low and stable prevalence of rheumatoid arthritis in northern France. **Joint, Bone, Spine : revue du rhumatisme**, v. 76, n. 5, p. 497–500, 2009.

BLAESSE, P. et al. Cation-Chloride cotransporters and neuronal function. **Neuron**, v. 61, n. 6, p. 820–838, 2009.

BLESSING, W. W. et al. Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. **Brain Research**, v. 221, p. 35–55, 1981.

BLOOM, F. E. et al. Lesions of central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure. **Science**, v. 166, n. 3910, p. 1284–6, 1969.

BOETTGER, M. K. et al. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor α neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: Evidence of a neuronal target. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 8, p. 2368–78, 2008.

BOETTGER, M. K. et al. Spinal tumor necrosis factor α neutralization reduces peripheral inflammation and hyperalgesia and suppresses autonomic responses in experimental arthritis: A role for spinal tumor necrosis factor α during induction and maintenance of peripheral inflammation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 5, p. 1308–18, 2010.

BOMBARA, M. P. et al. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, p. 399–406, 1993.

BOUMAN, A. et al. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, n. 1, p. 19–26, 2004.

BOYLE, D. L. et al. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1616–24, 2006.

BRADESI, S. et al. Role of spinal microglia in visceral hyperalgesia and NK1R up-regulation in a rat model of chronic stress. **Gastroenterology**, v. 136, n. 4, p. 1339–48, 2009.

BRAS, H. et al. Comparison of effects of various types of NA and 5-HT agonists on transmission from group II muscle afferents in the cat. **The European journal of Neuroscience**, v. 2, n. 12, p. 1029–39, 1990.

BREESE, G. R.; HOWARD, J. L. Effect of central catecholamine alterations on the hypothermic response to 6-hydroxydopamine in desipramine treated rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 43, p. 671–74, 1971.

BREESE, G. R.; TRAYLOR, T. D. Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 174, n. 3, p. 413–20, 1970.

BRESSAN, E. **EVIDÊNCIAS DE QUE A ATIVIDADE GLIAL NA MEDULA ESPINHAL ALTERA PROPORCIONALMENTE A INFLAMAÇÃO ARTRITICA EM RATOS.** [s.l.] UFSC, 2010.

BRESSAN, E.; MITKOVSKI, M.; TONUSSI, C. R. LPS-induced knee-joint reactive arthritis and spinal cord glial activation were reduced after intrathecal thalidomide injection in rats. **Life Sciences**, v. 87, p. 481–9, 2010.

BRESSAN, E.; PERES, K. C.; TONUSSI, C. R. Evidence that LPS-reactive arthritis in rats depends on the glial activity and the fractalkine-TNF- α signaling in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 947–58, 2012.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732–6, 1999.

BROOKS, C. M.; KOIZUMI, K. Origin of the dorsal root reflex. **Journal of Neurophysiology**, v. 19, n. 1, p. 61–74, 1956.

BROWN, D. C. et al. Physiologic and Antinociceptive Effects of Intrathecal Resiniferatoxin in a Canine Bone Cancer Model. **Anesthesiology**, v. 103, n. 5, p. 1052–59, 2005.

BRUMBACK, A. C.; STALEY, K. J. Thermodynamic Regulation of NKCC1-Mediated Cl⁻ Cotransport Underlies Plasticity of GABAA Signaling in Neonatal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 1301–12, 2008.

BSIBSI, M. et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1013–21, 2002.

BUCKLEY, G. Martindale: The extra Pharmacopoeia. **The Journal of the Royal College of General Practitioners**, v. 39, n. 327, p. 440, 1989.

BUDAI, D.; LARSON, A. A. Role of substance P in the modulation of C-fiber-evoked responses of spinal dorsal horn neurons. **Brain Research**, v. 710, p. 197–203, 1996.

BULL, H. A. et al. Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, p. 655–60, 1996.

BULLING, D. G. et al. Adjuvant-induced joint inflammation causes very rapid transcription of beta-preprotachykinin and alpha-CGRP genes in innervating sensory ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, p. 372–82, 2001.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Cutaneous Mechanoreceptors and Nociceptors. In: **Handbook of Sensory Physiology**. [s.l: s.n.]. p. 29–78.

BURKE, R. E. John Eccles' pioneering role in understanding central synaptic transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 78, n. 3-5, p. 173–88, 2006.

BUTLER, S. H. et al. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. **Pain**, v. 48, n. 1, p. 73–81, 1992.

BUTT, A. M. ATP: A ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glia networks. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 205–13, 2011.

BYRUM, C. E.; STORNETTA, R.; GUYENET, P. G. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. **Brain Research**, v. 303, n. 1, p. 15–29, 1984.

CAIN, J. H. et al. Recent developments in the study of spinal cord injury and neuropathic pain. **Annals of Neurosciences**, v. 14, n. 4, p. 96–107, 2007.

CAO, H.; ZHANG, Y.-Q. Spinal glial activation contributes to pathological pain states. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 5, p. 972–83, 2008.

CAPÓ-APONTE, J. E. et al. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter1 interaction. **Experimental Eye Research**, v. 84, n. 2, p. 361-72, 2007.

CAPPUGI, P. et al. Preliminary experiences with chemotactic activity of CGRP using the skin window test. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 125, p. 135-8, 1990.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neuroscience Letters**, v. 197, n. 1, p. 25-8, 1995.

CARPENTER, K. J.; DICKENSON, A. H. Amino acids are still as exciting as ever. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 57-61, 2001.

CARTY, A. J. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. **ILAR Journal**, v. 49, n. 3, p. 272-6, 2008.

CASEY, K. L.; OAKLEY, B. Intraspinal latency, cutaneous fiber composition, and afferent control of the dorsal root reflex in cat. **Brain Research**, v. 47, n. 2, p. 353-69, 1972.

CASTRO-LOPES, J. M. et al. Increase in GABAergic cells and GABA levels in the spinal cord in unilateral inflammation of the hindlimb in the rat. **The European Journal of Neuroscience**, v. 4, p. 296-301, 1992.

CASTRO-LOPES, J. M. et al. Carrageenan-induced inflammation of the hind foot provokes a rise of GABA-immunoreactive cells in the rat spinal cord that is prevented by peripheral neurectomy or neonatal capsaicin treatment. **Pain**, v. 56, n. 2, p. 193-201, 1994a.

CASTRO-LOPES, J. M. et al. Expression of GAD mRNA in spinal cord neurons of normal and monoarthritic rats. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 26, n. 1-2, p. 169-76, 1994b.

CASTROP, H.; SCHNERMANN, J. Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance.

American Journal of Physiology. Renal Physiology, v. 295, n. 4, p. F859–66, 2008.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–24, 1997.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. A. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. **Pain**, v. 68, n. 1, p. 13–23, 1996.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. A.; GARCÍA-NICAS, E. Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. **European Journal of Pain**, v. 7, n. 4, p. 345–51, 2003.

CHABWINE, J. N. et al. Differential contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 to chloride handling in rat embryonic dorsal root ganglion neurons and motor neurons. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1168–76, 2009.

CHAPMAN, G. A. et al. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 15, p. RC87, 2000.

CHEN, H. et al. Na⁺-dependent chloride transporter (NKCC1)-null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 54–66, 2005.

CHHOR, V. et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 32, n. 100, p. 70–85, 2013.

CHO, I.-H. et al. Systemic administration of minocycline inhibits formalin-induced inflammatory pain in rat. **Brain Research**, v. 1072, n. 1, p. 208–14, 2006.

CHOPRA, B. et al. Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 911–20, 2000.

CLARK, A. K. et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 25, p. 10655–60, 2007.

CLARK, A. K.; YIP, P. K.; MALCANGIO, M. The Liberation of Fractalkine in the Dorsal Horn Requires Microglial Cathepsin S. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 21, p. 6945–54, 2009.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3671–5, 1992.

COGGESHALL, R. E. et al. Discharge characteristics of fine medial articular afferents at rest and during passive movements of inflamed knee joints. **Brain Research**, v. 272, n. 1, p. 185–8, 1983.

COLPAERT, F. C. Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. **Pain**, v. 28, n. 2, p. 201–22, 1987.

COMMISSIONG, J. W.; HELLSTRÖM, S. O.; NEFF, N. H. A new projection from locus coeruleus to the spinal ventral columns: histochemical and biochemical evidence. **Brain Research**, v. 148, n. 1, p. 207–13, 1978.

CORCIONE, A. et al. CX3CR1 Is expressed by human B lymphocytes and mediates CX3CL1 driven chemotaxis of tonsil centrocytes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8485, 2009.

COSTIGAN, M. et al. T-Cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord Is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14415–22, 2009.

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

COULL, J. A. M. et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 938–42, 2003.

COURTRIGHT, L. J.; KUZELL, W. C. Sparing effect of neurological deficit and trauma on the course of adjuvant arthritis in the rat. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 24, n. 4, p. 360–8, 1965.

CROWN, E. D. et al. Calcium/calmodulin dependent kinase II contributes to persistent central neuropathic pain following spinal cord injury. **Pain**, v. 153, n. 3, p. 710–21, 2012.

CROWSTON, J. G. et al. T-lymphocyte-fibroblast interactions. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 2, p. 529–31, 1997.

CUELLO, A. C. et al. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regulatory peptides**, v. 46, n. 1-2, p. 155–64, 1993.

CUI, Y. et al. A novel role of minocycline: Attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 1, p. 114–23, 2008.

CURTIS, D. R.; LODGE, D. The depolarization of feline ventral horn group Ia spinal afferent terminations by GABA. **Experimental Brain Research**, v. 46, n. 2, p. 215–33, 1982.

D. SMITH, M. The Normal Synovium. **The Open Rheumatology Journal**, v. 5, n. 1, p. 100–6, 2011.

DAI, Y. et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in

peripheral sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7737–45, 2002.

DARMAN, R. B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37542–50, 2002.

DAS, S. et al. RANK receptor oligomerisation in the regulation of NF B signalling. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 53, n. 1, p. 81–91, 2014.

DE FELIPE, C. et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature**, v. 392, p. 394–7, 1998.

DE KONINCK, Y.; HENRY, J. L. Prolonged GABAA-mediated inhibition following single hair afferent input to single spinal dorsal horn neurones in cats. **The Journal of Physiology**, v. 476, n. 1, p. 89–100, 1994.

DECARIS, E. et al. Evidence for neurogenic transmission inducing degenerative cartilage damage distant from local inflammation. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 9, p. 1951–60, 1999.

DELPIRE, E.; AUSTIN, T. M. Kinase regulation of Na + -K + -2Cl – cotransport in primary afferent neurons. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 18, p. 3365–73, 2010.

DEMKOW, U. et al. Heterogeneity of antibody response to mycobacterial antigens in different clinical manifestations of pulmonary tuberculosis. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58 Suppl 5, n. Pt 1, p. 117–27, 2007.

DEMORUELLE, M. K.; DEANE, K. D. Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. **Current Rheumatology Reports**, v. 14, n. 5, p. 472–80, 2012.

DICKENSON, A. H.; CHAPMAN, V.; GREEN, G. M. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. **General Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 633–8, 1997.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1235–8, 1987.

DINARELLO, C. A. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, n. 6, p. 1433–50, 1986.

DINARELLO, C. A. **Cytokines and Pain**. Berlin: Birkhauser: Springer Science & Business Media, 1999.

DIXON, M. J. et al. Mutation of the Na-K-Cl Co-Transporter Gene Slc12a2 Results in Deafness in Mice. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 8, p. 1579–84, 1999.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 903–14, 2002.

DONALDSON, L. F.; MCQUEEN, D. S.; SECKL, J. R. Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 486, n. 2, p. 473–82, 1995.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 49, n. 1-2, p. 5–10, 1993.

DOWD, B. F. X.; FORBUSH, B. PASK (Proline-Alanine-rich STE20-related Kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 30, p. 27347–53, 2003.

DRAY, A.; BETTANEY, J.; FORSTER, P. Resiniferatoxin, a potent capsaicin-like stimulator of peripheral nociceptors in the neonatal rat tail in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 323–6, 1990.

DREXLER, S. K.; FOXWELL, B. M. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 506–18, 2010.

DRIEDGER, P. E.; BLUMBERG, P. M. Different biological targets for resiniferatoxin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Cancer Research**, v. 40, n. 5, p. 1400–4, 1980a.

DRIEDGER, P. E.; BLUMBERG, P. M. Specific binding of phorbol ester tumor promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 567–571, 1980b.

DUNSTON, C. R. et al. Proteomic analysis of the anti-inflammatory action of minocycline. **Proteomics**, v. 11, n. 1, p. 42–51, 2011.

EBRINGER, A.; WILSON, C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 305–11, 2000.

ECCLES, J. C.; KOZAK, W.; MAGNI, F. Dorsal root reflexes of muscle Group I afferent fibres. **The Journal of Physiology**, v. 159, n. 1, p. 128–46, 1961.

ELLIS, C. A. et al. The effects of phorbol esters with different biological activities on protein kinase C. **Phytotherapy Research**, v. 1, n. 4, p. 187–90, 1987.

ERICHSEN, D. et al. Neuronal injury regulates fractalkine: relevance for HIV-1 associated dementia. **Journal of Neuroimmunology**, v. 138, n. 1–2, p. 144–55, 2003.

ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 6, p. 989–99, 2010.

EVANS, R. H.; LONG, S. K. Primary afferent depolarization in the rat spinal cord is mediated by pathways utilising NMDA and non-NMDA receptors. **Neuroscience Letters**, v. 100, n. 1-3, p. 231-6, 1989.

FATIMA-SHAD, K.; BARRY, P. H. Anion Permeation in GABA- and Glycine-Gated Channels of Mammalian Cultured Hippocampal Neurons. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 253, n. 1336, p. 69-75, 1993.

FERRARI, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 51, p. 18363-8, 2014.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1479-85, 1994.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. **Inflammation Research**, v. 45, n. 10, p. 499-502, 1996.

FERRELL, W. R.; LOCKHART, J. C.; KARIMIAN, S. M. Tachykinin regulation of basal synovial blood flow. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 1, p. 29-34, 1997.

FILER, A. et al. Utility of ultrasound joint counts in the prediction of rheumatoid arthritis in patients with very early synovitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 3, p. 500-7, 2011.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-61, 2003.

FIRESTEIN, G. S.; ALVARO-GRACIA, J. M.; MAKI, R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 9, p. 3347-53, 1990.

FITCH, M. T. et al. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 19, p. 8182–98, 1999.

FITZGERALD, M. The contralateral input to the dorsal horn of the spinal cord in the decerebrate spinal rat. **Brain Research**, v. 236, n. 2, p. 275–87, 1982.

FITZGERALD, M. Influences of contralateral nerve and skin stimulation on neurones in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 36, n. 2, p. 139–43, 1983.

FLEMING, A.; CROWN, J. M.; CORBETT, M. Early rheumatoid disease. I. Onset. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 35, n. 4, p. 357–60, 1976.

FLEMMER, A. W. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37551–8, 2002.

FOLETTTO, V. R. S.; MARTINS, M. A.; TONUSSI, C. R. The Involvement of potassium channels in the peripheral antiedematogenic effect of intrathecally injected morphine in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 116, n. 1, p. 232–8, 2013.

FRITSCH, R. et al. Characterization of autoreactive T cells to the autoantigens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 (RA33) and filaggrin in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 1068–76, 2002.

GALAN, A.; CERVERO, F. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. **Neuroscience**, v. 133, n. 1, p. 245–52, 2005.

GALAN, A. et al. Activation of spinal extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 322, n. 1, p. 37–40, 2002.

GAMBA, G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 423–93, 2005.

GARCIA-NICAS, E. GABAA-receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neurons in the spinal dorsal horn of the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 2, p. 661–70, 2006.

GARRETT, N. E. et al. Changes in preprotachykinin mRNA expression and substance P levels in dorsal root ganglia of monoarthritic rats: comparison with changes in synovial substance P levels. **Brain Research**, v. 675, n. 1-2, p. 203–7, 1995.

GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; CARLTON, S. M. GFAP Expression in Lumbar Spinal Cord of Naive and Neuropathic Rats Treated with MK-801. **Experimental Neurology**, v. 129, n. 2, p. 237–43, 1994.

GARZON-MUVDI, T. et al. WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v. 292, n. 4, p. F1197–F1207, 2006.

GENSEL, J. C. et al. Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3956–68, 2009.

GEPPETTI, P. et al. The concept of neurogenic inflammation. **British Journal of Pharmacology International**, v. 101, n. s3, p. 2–6, 2008.

GILBERT, D. et al. Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 479–89, 2007.

GLENN, E. M.; GRAY, J. Adjuvant-induced polyarthritis in rats: biologic and histologic background. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, n. 114, p. 1180–94, 1965.

GOËB, V. et al. Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–2, 2014.

GOLDSMITH, P. C. et al. Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, n. 1, p. 113–8, 1996.

GONZÁLEZ, J. C. et al. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2481–95, 2007.

GROETZNER, P.; WEIDNER, C. The human vasodilator axon reflex – An exclusively peripheral phenomenon? **Pain**, v. 149, n. 1, p. 71–5, 2010.

GUESDON, F. et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp27 and beta-casein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 6, p. 4236–43, 1993.

GUO, D. et al. Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. **Journal of immunology**, v. 160, n. 6, p. 2742–50, 1998.

GUYENET, P. G. The coeruleospinal noradrenergic neurons: Anatomical and electrophysiological studies in the rat. **Brain Research**, v. 189, n. 1, p. 121–33, 1980.

HACKMAN, J. C.; DAVIDOFF, R. A. Dorsal root potentials in the isolated frog spinal cord: Amino acid neurotransmitters and magnesium ions. **Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 61–9, 1991.

HAGAINS, C. E. et al. Contributions of dorsal root reflex and axonal reflex to formalin-induced inflammation. **Brain Research**, v. 1359, p. 90–7, 2010.

HAINS, B. C. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 16, p. 4308–17, 2006.

HAMILTON, S. Unilateral rheumatoid arthritis in hemiplegia. **Journal of the Canadian Association of Radiologists**, v. 34, n. 1, p. 49-50, 1983.

HARA, M. et al. Uneven distribution of intracellular Cl⁻ in rat hippocampal neurons. **Neuroscience Letters**, v. 143, n. 1-2, p. 135-8, 1992.

HARRISON, J. K. et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 18, p. 10896-901, 1998.

HEADLEY, P. M.; DUGGAN, A. W.; GRIERSMITH, B. T. Selective reduction by noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurones. **Brain Research**, v. 145, n. 1, p. 185-9, 1978.

HECKER, E. Co-carcinogens or modulators of carcinogenesis. New aspects of the etiology of human tumors and of the molecular mechanisms of carcinogenesis. **Die Naturwissenschaften**, v. 65, n. 12, p. 640-8, 1978.

HEIKKILA, R. E.; COHEN, G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. **Science**, v. 181, n. 4098, p. 456-7, 1973.

HERGENHAHN, M.; ADOLF, W.; HECKER, E. Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. **Tetrahedron Letters**, v. 16, n. 19-20, p. 1595-8, 1975.

HERMANN, G.; HOLMES, G.; ROGERS, R. TNF (alpha) modulation of visceral and spinal sensory processing. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 11, p. 1391-1409, 2005.

HERNANZ, A. et al. Calcitonin gene-related peptide II, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. **Rheumatology**, v. 32, n. 1, p. 31-5, 1993.

HERRERO, J. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 2, p. 169–203, 2000.

HIDE, I. Mechanism of production and release of tumor necrosis factor implicated in inflammatory diseases. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 121, n. 3, p. 163–73, 2003.

HINWOOD, M. et al. Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 6, p. 1442–54, 2012.

HITCHON, C. A. The Synovium in Rheumatoid Arthritis. **The Open Rheumatology Journal**, v. 5, p. 107–114, 2011.

HÖKFELT, T.; UNGERSTEDT, U. Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: An electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. **Brain Research**, v. 60, n. 2, p. 269–97, 1973.

HOLGUIN, A. et al. HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). **Pain**, v. 110, n. 3, p. 517–30, 2004.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 1, p. 5–11, 1998.

HOMBERGER, F. R.; THOMANN, P. E. Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. **Laboratory Animals**, v. 28, n. 2, p. 113–20, 1994.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 7, p. 3749–52, 1999.

HSIEH, S.-T.; LIN, W.-M. Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 4, p. 579–86, 1999.

HUA, X.-Y. et al. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 2431–40, 2005.

HUANG, L.-Q. et al. Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF- α and IL-1 β -induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 102, 2014.

HUANG, W. C. et al. Direct protection of cultured neurons from ischemia-like injury by minocycline. **Anatomy & Cell Biology**, v. 43, n. 4, p. 325, 2010.

HÜBNER, C. A.; LORKE, D. E.; HERMANS-BORGMEYER, I. Expression of the Na-K-2Cl-cotransporter NKCC1 during mouse development. **Mechanisms of Development**, v. 102, n. 1-2, p. 267–9, 2001.

HUGHES, P. M. et al. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. **Glia**, v. 37, n. 4, p. 314–27, 2002.

HUTTUNEN, M. et al. Neuropeptide- and capsaicin-induced histamine release in skin monitored with the microdialysis technique. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 76, n. 3, p. 205–9, 1996.

IKEDA, H.; KIRITOSHI, T.; MURASE, K. Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat. **Molecular Pain**, v. 8, n. 1, p. 43, 2012.

IMMKE, D. C.; GAVVA, N. R. The TRPV1 receptor and nociception. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 17, n. 5, p. 582–91, 2006.

INOUE, K. Involvement of microglia in neuropathic pain signalling. **Brain and nerve**, v. 59, n. 7, p. 739–46, 2007.

ISLER, P. et al. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. **European Cytokine Network**, v. 4, n. 1, p. 15–23, 1993.

IVERSEN, L. L.; URETSKY, N. J. Regional effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurones in rat brain and spinal cord. **Brain Research**, v. 24, n. 2, p. 364–7, 1970.

IWASAKI, A.; INOUE, K.; HUKUDA, S. Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the synovium and adjacent bone of the rat knee joint. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 173–8, 1995.

JANCSÓ, G.; KIRALY, E.; JANCSÓ-GÁBOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, v. 270, n. 5639, p. 741–3, 1977.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 54, n. 1, p. 1–13, 1989.

JANEWAY, C. A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunology Today**, v. 13, n. 1, p. 11–6, 1992.

JANG, I. S.; JEONG, H. J.; AKAIKE, N. Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 5962–72, 2001.

JANKOWSKA, E. et al. Modulation of responses of four types of feline ascending tract neurons by serotonin and noradrenaline. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 1375–87, 1997.

JEFFERY, R. C. Clinical features of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 42, n. 5, p. 231–6, 2014.

JEFFRY, J. A. et al. Selective Targeting of TRPV1 Expressing Sensory Nerve Terminals in the Spinal Cord for Long Lasting Analgesia. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7021, 2009.

JELASO, A. M. et al. Interleukin-1 β and its type 1 receptor are expressed in developing neural circuits in the frog, *Xenopus laevis*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 394, n. 2, p. 242–51, 1998.

JEURISSEN, F. et al. Monocytes express a non-neurokinin substance P receptor that is functionally coupled to MAP kinase. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 6, p. 2987–94, 1994.

JL, R. R. et al. Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 6423–34, 1994.

JL, R.-R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2001.

JIANG, C.-Y. et al. Effect of resiniferatoxin on glutamatergic spontaneous excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **Neuroscience**, v. 164, n. 4, p. 1833–44, 2009.

JIN, X. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 246–55, 2006.

JOHNSTON, I. N. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 33, p. 7353–65, 2004.

JONSSON, G.; SACHS, C. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 141–55, 1970.

JOVANOVIC, D. V et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3513–21, 1998.

JUNG, S. et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 11, p. 4106–14, 2000.

K. PEDERSEN, J. Prevalence of rheumatoid arthritis in the southern part of denmark. **The Open Rheumatology Journal**, v. 5, n. 1, p. 91–7, 2011.

KAGAN, B. L. et al. Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha. **Science**, v. 255, n. 5050, p. 1427–30, 1992.

KAHLE, K. T. et al. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: Implications for control of cell volume and neuronal excitability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 46, p. 16783–8, 2005.

KANAKA, C. et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 933–46, 2001.

KAR, S.; REES, R. G.; QUIRION, R. Altered Calcitonin Gene-related peptide, substance P and enkephalin immunoreactivities and receptor binding sites in the dorsal spinal cord of the polyarthritic rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 345–354, 1994.

KARADSHEH, M. . et al. Localization of the kcc4 potassium–chloride cotransporter in the nervous system. **Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 381–91, 2004.

KARIN, M.; LIN, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, n. 3, p. 221–7, 2002.

KAWAMATA, M. et al. Changes in response properties and receptive fields of spinal dorsal horn neurons in rats after surgical incision in hairy skin. **Anesthesiology**, v. 102, n. 1, p. 141–51, 2005.

KAWASAKI, Y. et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. **Nature Medicine**, v. 14, n. 3, p. 331–6, 2008.

KEEBLE, J. E.; BRAIN, S. D. A role for substance P in arthritis? **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1-3, p. 176–9, 2004.

KELLY, S.; DUNHAM, J. P.; DONALDSON, L. F. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 935–42, 2007.

KHIRUG, S. et al. Distinct properties of functional KCC2 expression in immature mouse hippocampal neurons in culture and in acute slices. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 899–904, 2005.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 153–65, 2005.

KIDD, B. L. et al. A neurogenic mechanism for symmetrical arthritis. **The Lancet**, v. 334, n. 8672, p. 1128–30, 1989.

KIDD, B. L. et al. Neurogenic influences on contralateral responses during experimental rat monoarthritis. **Brain Research**, v. 688, n. 1-2, p. 72–6, 1995.

KIM, S. R. et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4322–9, 2006.

KIM, T. H. et al. Effects of minocycline on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, v. 1370, p. 34–42, 2011.

KISSIN, I. Vanilloid-induced conduction analgesia: selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity. **Anesthesia & Analgesia**, v. 107, n. 1, p. 271–81, 2008.

KLEIN, J. D.; LAMITINA, S. T.; O'NEILL, W. C. JNK is a volume-sensitive kinase that phosphorylates the Na-K-2Cl cotransporter in vitro. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 3 Pt 1, p. C425–31, 1999.

KOLLIAS, G. et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 8, p. 1357–62, 2011.

KOLSTON, J. et al. Transneuronal effects triggered by saphenous nerve injury on one side of a rat are restricted to neurones of the contralateral, homologous nerve. **Neuroscience Letters**, v. 130, n. 2, p. 187–9, 1991.

KOLTZENBURG, M.; WALL, P. D.; MCMAHON, S. B. Does the right side know what the left is doing? **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 3, p. 122–7, 1999.

KOMURA, M. et al. Anesthetic management of patients with interstitial cystitis during intravesical resiniferatoxin therapy. **Masui**, v. 54, n. 2, p. 149–52, 2005.

KÖNIG, C. et al. Involvement of peripheral and spinal tumor necrosis factor α in spinal cord hyperexcitability during knee joint inflammation in rats. **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 3, p. 599–609, 2014.

KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 448–53, 2007.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–18, 1996.

KURIHARA, K. et al. Phosphorylation of the salivary Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporter. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 282, n. 4, p. C817-23, 2002.

LAFHAMME, N.; SOUCY, G.; RIVEST, S. Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding toll-like receptor 2 in the CNS. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 648-57, 2008.

LAM, F. F. .; WONG, H. H. .; NG, E. S. . Time course and substance P effects on the vascular and morphological changes in adjuvant-induced monoarthritic rats. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 299-310, 2004.

LAMBERT et al. Substance P enhances cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression on cultured rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, n. 2, p. 269-75, 1998.

LATCHOUMYKANDANE, C. et al. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKC δ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 314-23, 2011.

LEBLANC, B. W. et al. Minocycline injection in the ventral posterolateral thalamus reverses microglial reactivity and thermal hyperalgesia secondary to sciatic neuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 498, n. 2, p. 138-42, 2011.

LEDEBOER, A. et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, p. 71-83, 2005.

LEE, S. M. et al. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF- α expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 3, p. 568-78, 2004.

LEI, J. et al. Sex-related differences in descending norepinephrine and serotonin controls of spinal withdrawal reflex during intramuscular saline induced muscle nociception in rats. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p. 206–14, 2011.

LEIS, S. et al. Facilitated neurogenic inflammation in unaffected limbs of patients with complex regional pain syndrome. **Neuroscience Letters**, v. 359, n. 3, p. 163–6, 2004.

LESLIE, T. A. et al. Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin a messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation. **Neuroscience**, v. 67, n. 3, p. 753–61, 1995.

LEVINE, J. D. et al. Clinical response to regional intravenous guanethidine in patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 13, n. 6, p. 1040–3, 1986a.

LEVINE, J. D. et al. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 3423–9, 1986b.

LI, J. et al. Electrophysiological characterization of N-methyl-d-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia neurons. **Pain**, v. 109, n. 3, p. 443–52, 2004.

LI, R. et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing. **Rheumatology**, v. 51, n. 4, p. 721–9, 2012.

LIEDTKE, C. M.; COLE, T. S. PKC signaling in CF/T43 cell line: regulation of NKCC1 by PKC- δ isotype. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1495, n. 1, p. 24–33, 2000.

LIEDTKE, C. M.; COLE, T. S. Activation of NKCC1 by hyperosmotic stress in human tracheal epithelial cells involves PKC- δ and ERK. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1589, n. 1, p. 77–88, 2002.

LIEN, E. et al. Toll-like Receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33419–25, 1999.

LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, n. 2, p. 100–2, 2002.

LIM, H.; KIM, D.; LEE, S. J. Toll-like receptor 2 mediates peripheral nerve injury-induced NADPH oxidase 2 expression in spinal cord microglia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 11, p. 7572–9, 2013.

LIN, Q. et al. Involvement of cGMP in nociceptive processing by and sensitization of spinothalamic neurons in primates. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 3293–3302, 1997.

LIN, Q.; PENG, Y. B.; WILLIS, W. D. Possible role of protein kinase C in the sensitization of primate spinothalamic tract neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 3026–34, 1996a.

LIN, Q.; PENG, Y. B.; WILLIS, W. D. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. **Journal of Neurophysiology**, v. 76, n. 2, p. 1005–14, 1996b.

LIN, Q.; WU, J.; WILLIS, W. D. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 5, p. 2602–11, 1999.

LIN, Q.; ZOU, X.; WILLIS, W. D. Delta and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 84, n. 5, p. 2695–8, 2000.

LIN, T.-B.; FU, T.-C. Can antidromic stimulation of rat muscle afferents modulate the sensitivity of muscle spindles? **Neuroscience Letters**, v. 240, n. 2, p. 85–8, 1998.

LINDEROTH, B. et al. Gamma-aminobutyric acid is released in the dorsal horn by electrical spinal cord stimulation: An in vivo microdialysis study in the rat. **Neurosurgery**, v. 34, n. 3, p. 484–9, 1994.

LINDIA, J. et al. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. **The Journal of Pain**, v. 6, n. 7, p. 434–8, 2005.

LIPMAN, N. S.; PERKINS, S. E. Factors That May Influence Animal Research. In: **Laboratory Animal Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2002. p. 1143–84.

LIU, H. et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 18, p. 8383–7, 1994.

LOMBARD, M.-C. et al. Unilateral joint inflammation induces bilateral and time-dependent changes in neuropeptide FF binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord: implication of supraspinal descending systems. **Brain Research**, v. 816, n. 2, p. 598–608, 1999.

LOSSOS, I. S. et al. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 2873–81, 2000.

LOTZ, M.; CARSON, D.; VAUGHAN, J. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. **Science**, v. 235, n. 4791, p. 893–5, 1987.

LOVINGER, D. M.; WEIGHT, F. F. Glutamate induces a depolarization of adult rat dorsal root ganglion neurons that is mediated predominantly by NMDA receptors. **Neuroscience Letters**, v. 94, n. 3, p. 314–20, 1988.

LUEBKE, A. E. et al. Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3455–60, 1996.

MA, Q.-P.; HARGREAVES, R. . Localization of N-methyl-d-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 699–707, 2000.

MACKAY, K. et al. Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 3, p. 632–9, 2002.

MAJITHIA, V.; GERACI, S. A. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 11, p. 936–9, 2007.

MALMFORS, T.; SACHS, C. Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 89–92, 1968.

MANNION, R. J. et al. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 16, p. 9385–90, 1999.

MAPP, P. I. et al. Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. **Neuroscience**, v. 57, n. 4, p. 1091–6, 1993.

MARABINI, S. et al. Substance P and somatostatin levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and psoriatic arthritis synovial fluid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 632, p. 435–6, 1991.

MARRIOTT, I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1-3, p. 2153, 2004.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451–83, 2009.

MATISZ, C. E. et al. Helminth parasites and the modulation of joint inflammation. **Journal of Parasitology Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

MCINNES, I. B. et al. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, v. 3, n. 2, p. 189–95, 1997.

MEANS, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3920–7, 1999.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32, n. 4, p. 197–200, 1994.

MEYER, R. A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: MCMAHON, S.; WALL, P. D.; MELZACK, R. (Eds.). **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 6. ed. New York: Churchill Livingstone, 2006. p. 3–34.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MILLIGAN, E. et al. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 2775–82, 2005.

MILLIGAN, E. D. et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 2294–2302, 2004.

MINAMI, M. et al. Enhancement of preprotachykinin A gene expression by adjuvant-induced inflammation in the rat spinal cord: possible involvement of substance P-containing spinal neurons in nociception. **Neuroscience Letters**, v. 98, n. 1, p. 105–110, 1989.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA**, 2013.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I.; ANIMAL, C. N. D. C. D. E. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**, 2013. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2015

MISGELD, U. et al. The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. **Science**, v. 232, n. 4756, p. 1413-5, 1986.

MISHRA, S. K.; HOON, M. A. Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 43, n. 1, p. 157-163, 2010.

MITSUHASHI, M. et al. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor. **Journal of Neuroscience Research**, v. 32, n. 3, p. 437-43, 1992.

MOKHA, S. S.; MCMILLAN, J. A.; IGGO, A. Dorsal root potentials in the cat: effects of bicuculline. **Brain Research**, v. 259, n. 2, p. 313-8, 1983.

MONAGHAN, D. T.; COTMAN, C. W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 2909-19, 1985.

MONYER, H. et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 529-40, 1994.

MOORE, R. Y.; BLOOM, F. E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. **Annual Review of Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 113-68, 1979.

MORALES-AZA, B. M. et al. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 17, n. 1, p. 62–9, 2004.

MORIGUCHI, T. et al. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 52, p. 42685–93, 2005.

MOTOHIRO, A. et al. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. **European Surgical Research**, v. 18, n. 1, p. 50–7, 1986.

MOTTONEN, T. et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 4, p. 894–8, 2002.

MÜLLER-LADNER, U. et al. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 1, n. 2, p. 102–10, 2005.

MYASOEDOVA, E. et al. Incidence of extraarticular rheumatoid arthritis in Olmsted county, Minnesota, in 1995-2007 versus 1985-1994: a population-based study. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 6, p. 983–9, 2011.

NAGHASHPOUR, M. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide on myometrial contractility is diminished at parturition. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4207–14, 1997.

NAGY, I. et al. Cobalt accumulation in neurons expressing ionotropic excitatory amino acid receptors in young rat spinal cord: Morphology and distribution. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 344, n. 3, p. 321–35, 1994.

NAHIN, R. L.; HYLDEN, J. L. K. Peripheral inflammation is associated with increased glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 128, n. 2, p. 226–30, 1991.

NAKAGAWA, N.; IWAMOTO, I.; YOSHIDA, S. Effect of substance P on the expression of an adhesion molecule ICAM-1 in human vascular endothelial cells. **Regulatory Peptides**, v. 46, n. 1-2, p. 223–4, 1993.

NAKAYAMA, Y. et al. Role of prostaglandin receptor subtype EP1 in prostaglandin E2-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. **Brain Research**, v. 1010, n. 1-2, p. 62–8, 2004.

NELL, V. P. K. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 43, n. 7, p. 906–14, 2004.

NEUBERT, J. K. et al. Perineural resiniferatoxin selectively inhibits inflammatory hyperalgesia. **Molecular Pain**, v. 4, n. 1, p. 3, 2008.

NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 347–69, 2014.

NICOLETTI, M. et al. Impact of neuropeptide substance P an inflammatory compound on arachidonic acid compound generation. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 849–57, 2012.

NIE, H.; WENG, H.-R. Glutamate transporters prevent excessive activation of NMDA receptors and extrasynaptic glutamate spillover in the spinal dorsal horn. **Journal of Neurophysiology**, v. 101, n. 4, p. 2041–51, 2009.

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

NISHI, S.; MINOTA, S.; KARCZMAR, A. Primary afferent neurones: The ionic mechanism of GABA-mediated depolarization. **Neuropharmacology**, v. 13, n. 3, p. 215–9, 1974.

NOGA, B. R.; BRAS, H.; JANKOWSKA, E. Transmission from group II muscle afferents is depressed by stimulation of locus coeruleus/subcoeruleus, Kolliker-Fuse and raphe nuclei in the cat. **Experimental Brain Research**, v. 88, n. 3, p. 502–16, 1992.

NOGUCHI, K.; RUDA, M. A. Gene regulation in an ascending nociceptive pathway: inflammation-induced increase in preprotachykinin mRNA in rat lamina I spinal projection neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2563–72, 1992.

NYGREN, L. G.; OLSON, L.; SEIGER, A. Regeneration of monoamine-containing axons in the developing and adult spinal cord of the rat following intraspinal 6-OH-dopamine injections or transections. **Histochemie**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 1971.

NYGREN, L.-G.; OLSON, L. On spinal noradrenaline receptor supersensitivity: Correlation between nerve terminal densities and flexor reflexes various times after intracisternal 6-hydroxydopamine. **Brain Research**, v. 116, n. 3, p. 455–70, 1976.

OBARA, M.; SZELIGA, M.; ALBRECHT, J. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: Facts and hypotheses. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 6, p. 905–19, 2008.

OHTA, A. et al. Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 2, p. 804–8, 2006.

OLAH, Z. Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11021–30, 2001.

ONDA, A. et al. Exogenous tumor necrosis factor- α induces abnormal discharges in rat dorsal horn neurons. **Spine**, v. 27, n. 15, p. 1618–24, 2002.

OZINSKY, A et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 25, p. 13766–71, 2000.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to Nav1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2923–8, 2003.

PAYNE, J. A. et al. Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 4, p. 199–206, 2003.

PAYNE, J. A.; STEVENSON, T. J.; DONALDSON, L. F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain: A neuronal-specific isoform. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 16245–52, 1996.

PEARSON, D. J.; TAYLOR, G. The influence of the nematode *Syphacia oblevata* on adjuvant arthritis in the rat. **Immunology**, v. 29, n. 2, p. 391–6, 1975.

PEARSON, M. . et al. Localization of the K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 481–91, 2001.

PENG, Y. B.; LIN, Q.; WILLIS, W. D. Involvement of protein kinase c in responses of rat dorsal horn neurons to mechanical stimuli and periaqueductal gray descending inhibition. **Experimental Brain Research**, v. 114, n. 3, p. 561–70, 1997.

PERRY, V. H.; GORDON, S. Macrophages and microglia in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 11, n. 6, p. 273–7, 1988.

PERRY, V. H.; GORDON, S. Macrophages and the nervous system. **International Review of Cytology**, v. 125, p. 203–44, 1991.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 80, p. 53–83, 2006.

PEZET, S. Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 684–95, 2002.

PICASCIA, A. et al. Epigenetic control of autoimmune diseases: From bench to bedside. **Clinical Immunology**, v. 157, n. 1, p. 1–15, 2015.

PINTEAUX, E. et al. Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 4, p. 754–63, 2002.

POPOVICH, P. G. et al. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 61, n. 7, p. 623–33, 2002.

POPOVICH, P. G.; WEI, P.; STOKES, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 377, n. 3, p. 443–64, 1997.

PREMKUMAR, L. S. Targeting TRPV1 as an alternative approach to narcotic analgesics to treat chronic pain conditions. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 3, p. 361–70, 2010.

PRICE, T. J.; HARGREAVES, K. M.; CERVERO, F. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. **Brain Research**, v. 1112, n. 1, p. 146–58, 2006.

PRILLER, J. et al. Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. **Glia**, v. 15, n. 4, p. 447–57, 1995.

QI, J. et al. Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6417–26, 2011.

RAGHAVENDRA, V. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624–30, 2003.

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

RAINGEAUD, J. et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7420–26, 1995.

RAINSFORD, K. D. Adjuvant polyarthritis in rats: is this a satisfactory model for screening anti-arthritic drugs? **Agents and Actions**, v. 12, n. 4, p. 452–8, 1982.

RAISINGHANI, M.; PABBIDI, R. M.; PREMKUMAR, L. S. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. **The Journal of Physiology**, v. 567, n. 3, p. 771–86, 2005.

RALEVIC, V. et al. Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin micro vasculature. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, n. 3, p. 650–5, 1992.

RANSOHOFF, R. M.; LIU, L.; CARDONA, A. E. Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. In: **International Review of Neurobiology**. [s.l.: s.n.]. v. 82p. 187–204.

RAZA, K. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. **Arthritis Research & Therapy**, v. 7, n. 4, p. R784–95, 2005.

RAZAVI, R. et al. TRPV1+ sensory neurons control β cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1123–35, 2006.

REDDINGTON, M. et al. Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, n. 7, p. 1047–9, 1995.

REES, H. et al. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? **NeuroReport**, v. 5, n. 7, p. 821–4, 1994.

REES, H. et al. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. **The Journal of Physiology**, v. 484, p. 437–45, 1995.

REES, H. et al. Dorsal root reflexes in articular afferents occur bilaterally in a chronic model of arthritis in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 76, n. 6, p. 4190–3, 1996.

REEVE, A. J. et al. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 3, p. 247–57, 2000.

RICHARDSON, C.; ALESSI, D. R. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 20, p. 3293–3304, 2008.

RIDDELL, J. S.; JANKOWSKA, E.; EIDE, E. Depolarization of group II muscle afferents by stimuli applied in the locus coeruleus and raphe nuclei of the cat. **The Journal of Physiology**, v. 461, p. 723–41, 1993.

ROCK, F. L. et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 2, p. 588–593, 1998.

ROMERO-SANDOVAL, A. et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Research**, v. 1219, p. 116–26, 2008.

ROUSE, J. et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1027–37, 1994.

RUBENS-DUVAL, A.; VILLIAUMEY, J.; KAPLAN, G. Attempts at experimental reproduction of rheumatic polyarthritis. **Pathologie et Biologie**, v. 14, n. 21, p. 1084–1100, 1966.

RUDOMIN, P.; SCHMIDT, R. F. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. **Experimental Brain Research**, v. 129, n. 1, p. 1–37, 1999.

RUSSELL, J. M. Sodium-potassium-chloride cotransport. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 211–76, 2000.

SACHS, C.; JONSSON, G. Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny. **Brain Research**, v. 99, n. 2, p. 277–91, 1975.

SAITO, O. et al. Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E2 and TNF. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1754–64, 2010.

SANDKÜHLER, J. Understanding LTP in pain pathways. **Molecular Pain**, v. 3, n. 1, p. 9, 2007.

SATO, E. et al. Involvement of spinal tyrosine kinase in inflammatory and N-methyl-d-aspartate-induced hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 468, n. 3, p. 191–8, 2003.

SATO, K. et al. Noradrenaline innervation of the spinal cord studied by the horseradish peroxidase method combined with monoamine oxidase staining. **Experimental Brain Research**, v. 30, n. 2-3, p. 175–86, 1977.

SAXLER, G. et al. Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. **European journal of pain (London, England)**, v. 11, n. 1, p. 67–74, 2007.

SAXNE, T. et al. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. **Arthritis and Rheumatism**, v. 31, n. 8, p. 1041–5, 1988a.

SAXNE, T. et al. Synovial fluid concentrations of interleukin-1 β and proteoglycans are inversely related. **Journal of Autoimmunity**, v. 1, n. 4, p. 373–80, 1988b.

SCHÄFER, M. K.-H. et al. Inflammation-induced upregulation of NK1 receptor mRNA in dorsal horn neurones. **NeuroReport**, v. 4, n. 8, p. 1007–10, 1993.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **Pain**, v. 26, n. 1, p. 121, 1986.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **Journal of Neurophysiology**, v. 60, n. 6, p. 2180–95, 1988.

SCHAIBLE, H.-G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 5, p. 470, 2014.

SCHAIBLE, H.-G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G. S. Mechanisms of pain in arthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 343–354, 2002.

SCHAIBLE, H.-G.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, v. 55, n. 1, p. 5–54, 1993.

SHELLEKENS, G. A. et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 1, p. 273–81, 1998.

SCHERRER, G. et al. Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1148–59, 2009.

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

SCHOLZEN, T. et al. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. **Experimental Dermatology**, v. 7, n. 2-3, p. 81–96, 1998.

SCHOMBERG, S. L. et al. Stimulation of Na-K-2Cl cotransporter in neurons by activation of Non-NMDA ionotropic receptor and group-I mGluRs. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 6, p. 2563–75, 2001.

SCHWARTING, R.; HUSTON, J. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology**, v. 50, n. 2-3, p. 275–331, 1996.

SCOTLAND, R. S. et al. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5918–27, 2011.

SCULPTOREANU, A.; ARTIM, D. E.; DE GROAT, W. C. Neurokinins inhibit low threshold inactivating K⁺ currents in capsaicin responsive DRG neurons. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 2, p. 562–73, 2009.

SEEGERS, H. C. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 1, p. 8–12, 2003.

SHAN, S. et al. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis? **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 3, p. 558–68, 2007.

SHAW, A. C.; GOLDSTEIN, D. R.; MONTGOMERY, R. R. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 875–87, 2013.

SIKAND, P.; PREMKUMAR, L. S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. **The Journal of Physiology**, v. 581, n. 2, p. 631–47, 2007.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research**, v. 4 Suppl 3, p. S265–72, 2002.

SLUKA, K. A. et al. Fiber types contributing to dorsal root reflexes induced by joint inflammation in cats and monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, n. 3, p. 981–9, 1995.

SLUKA, K. A.; LAWAND, N. B.; WESTLUND, K. N. Joint inflammation is reduced by dorsal rhizotomy and not by sympathectomy or spinal cord transection. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, n. 5, p. 309–14, 1994.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation. **Pain Forum**, v. 4, n. 3, p. 141–9, 1995.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Rheumatoid arthritis is more than cytokines: Autoimmunity and rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 10, p. 2218–20, 2001.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 473–88, 2003.

SNYDER, S. H. Opiate receptors and beyond: 30 years of neural signaling research. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 274–85, 2004.

SOUZA, G. R. et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11193–8, 2013.

STALEY, K. J. Diuretics as Antiepileptic Drugs: Should We Go with the Flow? **Epilepsy Currents**, v. 2, n. 2, p. 35–8, 2002.

STEIN, V. et al. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 1, p. 57–64, 2004.

STEINER, G.; SMOLEN, J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. **Arthritis Research**, v. 4 Suppl 2, p. S1–S5, 2002.

STEINMETZ, M. P. Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory Proteoglycans Allows Functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 35, p. 8066–76, 2005.

STIRLING, D. P. et al. Minocycline as a neuroprotective agent. **The Neuroscientist**, v. 11, n. 4, p. 308–22, 2005.

STOUT, R. D. Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 3, p. 398–403, 1993.

SUK, K. Minocycline suppresses hypoxic activation of rodent microglia in culture. **Neuroscience Letters**, v. 366, n. 2, p. 167–71, 2004.

SUN, S. et al. Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis. **Brain Research Bulletin**, v. 75, n. 1, p. 83–93, 2008.

SUNG, K. W. et al. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7531–8, 2000.

SUZUKI, H. et al. Substance P induces degranulation of mast cells and leukocyte adhesion to venular endothelium. **Peptides**, v. 16, n. 8, p. 1447–52, 1995.

SVENSSON, C. I. et al. Spinal p38 MAP kinase is necessary for NMDA-induced spinal PGE2 release and thermal hyperalgesia. **NeuroReport**, v. 14, n. 8, p. 1153–7, 2003.

SVENSSON, M. et al. The response of central glia to peripheral nerve injury. **Brain Research Bulletin**, v. 30, n. 3-4, p. 499–506, 1993.

SWANSON, L. W. The locus coeruleus: A cytoarchitectonic, golgi and immunohistochemical study in the albino rat. **Brain Research**, v. 110, n. 1, p. 39–56, 1976.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 159–212, 1999.

SZENTAGOTHAI, J. Neuronal and synaptic arrangement in the substantia gelatinosa rolandi. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 122, n. 2, p. 219–39, 1964.

SZOLCSÁNYI, J.; JANCSÓ-GÁBOR, A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency of pungent agents. **Arzneimittel-Forschung**, v. 25, n. 12, p. 1877–81, 1975.

TACHIBANA, M. et al. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat spinal cord. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 344, n. 3, p. 431–54, 1994.

TAK, P. P.; KALDEN, J. R. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13 Suppl 1, p. S5, 2011.

TAKEUCHI, O. et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 443–51, 1999.

TAKEUCHI, O. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **International Immunology**, v. 12, n. 1, p. 113–17, 2000.

TEN BRUGGENCATE, G.; LUX, H. D.; LIEBL, L. Possible relationships between extracellular potassium activity and presynaptic inhibition in the spinal cord of the cat. **Pflügers Archiv**, v. 349, n. 4, p. 301–17, 1974.

TERENZI, R. et al. Neuropeptides activate TRPV1 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and foster IL-6 and IL-8 production. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 6, p. 1107–9, 2013.

THOENEN, H.; TRANZER, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie**, v. 261, n. 3, p. 271–88, 1968.

TIKKA, T. et al. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, p. 2580–2588, 2001.

TIWARI, N. et al. Imaging of normal and pathologic joint synovium using nonlinear optical microscopy as a potential diagnostic tool. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 5, p. 1–10, 2010.

TODD, A. J. GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. **European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 12, p. 2492–8, 1996.

TOENNIES, J. F. Conditioning of afferent impulses by reflex discharges over the dorsal roots. **Journal of Neurophysiology**, v. 2, n. 6, p. 515–25, 1939.

TOIVANEN, P. From reactive arthritis to rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 16, n. 3, p. 369–71, 2001.

TOYODA, H. et al. Differential functional expression of cation-Cl⁻ cotransporter mRNAs (KCC1, KCC2, and NKCC1) in rat trigeminal nervous system. **Molecular Brain Research**, v. 133, n. 1, p. 12–8, 2005.

TREMBLAY, M.-E. et al. The Role of Microglia in the Healthy Brain. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16064–9, 2011.

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

TSUDA, M.; INOUE, K.; SALTER, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 2, p. 101–7, 2005.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24–S32, 2010.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity. **Skin Research**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2008.

UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811–5, 1999.

VALENCIA-DE ITA, S. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 6, p. 3553–61, 2006.

VAN DER GOOT, F. G. et al. Membrane interaction of TNF is not sufficient to trigger increase in membrane conductance in mammalian cells. **FEBS Letters**, v. 460, n. 1, p. 107–11, 1999.

VAN EDEN, W. et al. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 15, p. 5117–20, 1985.

VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P. A.; WAUBEN, M. H. M. Adjuvant Arthritis in the Rat. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p. Unit 15.4.

VERGE, G. M. et al. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 1150–60, 2004.

VIEIRA, V. J. et al. Vascular endothelial growth factor overexpression positively modulates the characteristics of periprosthetic tissue of polyurethane-coated silicone breast implant in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 126, n. 6, p. 1899–1910, 2010.

VILA, M. et al. The role of glial cells in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 4, p. 483–9, 2001.

VITARI, A. C. et al. The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 17, 2005.

VITKOVIC, L.; BOCKAERT, J.; JACQUE, C. "Inflammatory" cytokines' neuromodulators in normal brain? **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 2, p. 457–71, 2000.

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

WALLENGREN, J. Vasoactive peptides in the skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 2, n. 1, p. 49–55, 1997.

WALLENGREN, J.; HÅKANSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 267–73, 1987.

WATKINS, L. R. et al. Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. **Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 449–81, 1999.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond Neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 981–1011, 2002.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 973–85, 2003.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 450–5, 2001.

WATKINS, R. L. et al. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 71, n. 3, p. 225–35, 1997.

WAYNE MARSHALL, K.; CHIU, B.; INMAN, R. D. Substance p and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. **Arthritis & Rheumatism**, v. 33, n. 1, p. 87–90, 1990.

WEBER, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 1, p. 4–19, 2003.

WEIDNER, C. et al. Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 22, p. 10184–90, 1999.

WEIDNER, C. et al. Acute Effects of Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide in Human Skin – A Microdialysis Study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 6, p. 1015–20, 2000.

WESTLUND, K. N. et al. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. **Brain Research**, v. 263, n. 1, p. 15–31, 1983.

WESTON, C. R.; DAVIS, R. J. The JNK signal transduction pathway. **Current opinion in genetics & development**, v. 12, n. 1, p. 14–21, 2002.

WHITEHOUSE, M. W. Adjuvant arthritis 50 years on: the impact of the 1956 article by C. M. Pearson, “Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants”. **Inflammation Research**, v. 56, n. 4, p. 133–8, 2007.

WILKINSON, M. F. et al. Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and LPS enhance calcium channel current in isolated vascular smooth muscle cells of rat tail artery. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 7, p. 785–91, 1996.

WILLIS JR., W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. **Experimental Brain Research**, v. 124, n. 4, p. 395–421, 1999.

WILLIS, W. D. John Eccles’ studies of spinal cord presynaptic inhibition. **Progress in Neurobiology**, v. 78, n. 3-5, p. 189–214, 2006.

WILSON, A. W. et al. An animal model of chronic inflammatory pain: Pharmacological and temporal differentiation from acute models. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 6, p. 537, 2006.

WU, L.-J.; KO, S.; ZHUO, M. Kainate receptors and pain: from dorsal root ganglion to the anterior cingulate cortex. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 15, p. 1597–1605, 2007.

XANTHOS, D. N.; SANDKÜHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 43–53, 2014.

XIE, W. et al. Knockdown of sodium channel Nav1.6 blocks mechanical pain and abnormal bursting activity of afferent neurons in inflamed sensory ganglia. **Pain**, v. 154, n. 8, p. 1170–80, 2013.

XIE, W.-R. et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. **Neuroscience**, v. 142, n. 3, p. 809–822, 2006.

XU, M. et al. NMDA receptor-mediated activation of medullary nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. **Pain**, v. 127, n. 3, p. 253–62, 2007.

YAMANAKA, H. et al. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). **Modern Rheumatology**, v. 24, n. 1, p. 33–40, 2014.

YANG, J.-L. et al. Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 18, 2012.

YASTER, M. et al. Effect of inhibition of spinal cord glutamate transporters on inflammatory pain induced by formalin and complete freund's adjuvant. **Anesthesiology**, v. 114, n. 2, p. 412–23, 2011.

YIN, Y. et al. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 2284–93, 2003.

YOSHIMURA, M.; JESSELL, T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. **The Journal of Physiology**, v. 430, p. 315–35, 1990.

YRJANHEIKKI, J. et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15769–74, 1998.

YRJANHEIKKI, J. et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13496–500, 1999.

ZANGGER, P.; KEYSTONE, E. C.; BOGOCH, E. R. Asymmetry of small joint involvement in rheumatoid arthritis: prevalence and tendency towards symmetry over time. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 3, p. 241–7, 2005.

ZEILHOFER, H. U.; WILDNER, H.; YEVENES, G. E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 193–235, 2012.

ZEKKI, H.; FEINSTEIN, D. L.; RIVEST, S. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor 2 and CD14 in the mouse CNS. **Brain Pathology**, v. 12, n. 3, p. 308–319, 2002.

ZEMKE, D.; MAJID, A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 27, n. 6, p. 293–298, 2004.

ZHANG, L. et al. TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 419–27, 2011.

ZHANG, L.-L.; FINA, M. E.; VARDI, N. Regulation of KCC2 and NKCC during development: Membrane insertion and differences between cell

types. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 1, p. 132–43, 2006.

ZHANG, W.; LIU, L.-Y.; XU, T.-L. Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 502–10, 2008.

ZHAO, P.; WAXMAN, S. G.; HAINS, B. C. Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia-neuron signaling by prostaglandin E2 contributes to pain after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 9, p. 2357–68, 2007.

ZHAO, X. et al. TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. **Journal of Neuroscience Research**, v. 64, n. 2, p. 121–31, 2001.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S. M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, v. 7, n. 4, p. 895–900, 1996.

ZHUANG, Z.-Y. et al. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, v. 114, n. 1, p. 149–59, 2005.

ZIEGLGANSBERGER, W.; HERZ, A. Changes of cutaneous receptive fields of spino-cervical-tract neurones and other dorsal horn neurones by microelectrophoretically administered amino acids. **Experimental Brain Research**, v. 13, n. 2, p. 111–26, 1971.