

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Elisângela Bressan

EVIDÊNCIAS DE QUE A ATIVIDADE GLIAL NA MEDULA  
ESPINHAL ALTERA PROPORCIONALMENTE A INFLAMAÇÃO  
ARTRÍTICA EM RATOS

Florianópolis  
2010



Elisângela Bressan

**EVIDÊNCIAS DE QUE A ATIVIDADE GLIAL NA MEDULA  
ESPINHAL ALTERA PROPORCIONALMENTE A INFLAMAÇÃO  
ARTRÍTICA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da Universidade Federal de Santa Catarina

B843e

Bressan, Elisângela

Evidências de que a atividade glial na medula espinhal altera proporcionalmente a inflamação artrítica em ratos [tese] / Elisângela Bressan ; orientador, Carlos Rogério Tonussi. - Florianópolis, SC, 2010.

103 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Artrite. 3. Medula espinhal.
4. Fractalcina. 5. Inflamação neurogênica. I. Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Dedico aos meus pais, por acreditarem que hoje  
o meu sonho se transformaria em realidade!



## Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, pelo incentivo, confiança, ensinamentos e pela inestimável amizade;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae e ao Prof. Dr. Jamil Assreuy por disponibilizarem seus laboratórios para o uso de equipamentos, pelos ensinamentos e pela amizade;

À professora Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro (BEG) pela disponibilização do microscópio e do sistema de captura de imagens fluorescentes;

À professora Dra. Juliana Geremias Chichorro pela amizade, colaborações e ensinamentos sobre a técnica de imunohistoquímica;

À professora Dra. Maria Fernanda Werner por me ensinar a extração da medula espinhal em ratos;

Ao Dr. Mišo Mitkovski (Instituto Max-Planck para Medicina Experimental, Alemanha) pela colaboração na elaboração do protocolo de captura e análise de imagens fluorescentes;

Aos funcionários e amigos do Departamento de Farmacologia, em especial ao Pedro, Diana e Rita pela dedicação e amizade;

Aos colegas de laboratório, Sara, Lúcia, Maria, Raquel, Daniel, Eduardo, Taciane e Vanessa pela amizade e companheirismo;

Às alunas de iniciação científica Gabriela e Kaite pela amizade e auxílio na execução dos experimentos;

À minha família, pelo incentivo, confiança e amor dedicados todos os dias de minha vida;

À minha irmã Rosângela, em especial, por compartilhar comigo cada dia desta caminhada;

Ao Rafael, pelo inestimável carinho e incentivo;

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro;

Ao L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X por facilitar imensamente a criação deste documento.





## Resumo

A ativação de células gliais na medula espinhal resulta em liberação de mediadores pró-inflamatórios que alteram a excitabilidade neuronal e contribuem para a amplificação da dor. No entanto, pouco se conhece sobre o papel da glia na inflamação periférica em doenças crônicas como a artrite. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inibição da atividade glial na inflamação articular induzida por carragenina/LPS em ratos, bem como o papel da fractalcina e do TNF- $\alpha$  na interação entre neurônios e glia. Utilizou-se o modelo de artrite induzido por LPS (30 ng) intra-articular 72 horas após sensibilização prévia da articulação com carragenina (300  $\mu$ g). Fluorocitrato, minociclina, anti-fractalcina, fractalcina, anti-TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e talidomida foram injetados pela via intratecal 20 minutos antes do LPS. A nocicepção foi avaliada através da medida da incapacitação articular e o edema pelo aumento do diâmetro articular. Após 6 horas, o fluido sinovial (FS) e a medula espinhal (L4-L5) foram coletados para contagem de leucócitos e determinação da imunoreatividade do GFAP e OX-42, respectivamente. Doses baixas de fluorocitrato (0,3 nmol) e minociclina (6 e 24 nmol), inibiram o aumento do diâmetro articular induzido por carragenina/LPS. O aumento da dose destes fármacos exacerbou o efeito anti-edematogênico e inibiu a incapacitação e o acúmulo de leucócitos no FS. Aminoglutetimida (50 mg/kg) não alterou os efeitos hiponociceptivo e anti-edematogênico do fluorocitrato e da minociclina. A inibição do reflexo da raiz dorsal pela furosemida (3, 10 e 30  $\mu$ g) não foi aditiva ao efeito causado pelos inibidores gliais. Fluorocitrato e minociclina reduziram a imunoreatividade para GFAP e OX-42 na medula espinhal. Fractalcina (0,3 e 30 ng) e TNF- $\alpha$  (1, 10 e 100 pg) intratecal aumentaram o diâmetro articular, a incapacitação e o acúmulo de leucócitos no FS. Os anticorpos anti-fractalcina (1  $\mu$ g), anti-TNF- $\alpha$  (0,1; 0,5 e 1  $\mu$ g) e a talidomida (10 e 100  $\mu$ g) promoveram efeito contrário. Os efeitos pró-edematogênico e hipernociceptivo da fractalcina foram revertidos pelo fluorocitrato e pelo anti-TNF- $\alpha$ . A fractalcina aumentou a imunoreatividade para GFAP e OX-42 enquanto que a anti-fractalcina, o anti-TNF- $\alpha$  e a talidomida reduziram. Estes achados demonstram que além do seu papel na dor, a glia também contribui para a inflamação periférica induzida por carragenina/LPS, num processo que envolve a liberação de fractalcina e TNF- $\alpha$  na medula espinhal. A inibição do reflexo da raiz dorsal é sugerido como o mecanismo pelo qual os inibidores da ativação glial afetam o edema articular. Fármacos imunomoduladores administrados diretamente na medula podem ser úteis na terapia de doenças artríticas em pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento convencional.

Palavras-chave: artrite, reflexo da raiz dorsal, medula espinhal, TNF- $\alpha$ , fractalcina, inflamação neurogênica.



# Abstract

The activation of glia in the spinal cord results in the release of proinflammatory mediators that alter neuronal excitability and contribute to the amplification of pain. However, little is known about the role of glial cell actions on the peripheral inflammation in diseases such as arthritis. The aim of this study was to evaluate the effect of spinal cord glia inhibition on the joint inflammation induced by carrageenin/LPS in rats, as well as the role of fractalkine and TNF- $\alpha$  as possible mediators between neurons and glia. LPS (30 ng) was injected into knee-joint previously primed with carageenan (300  $\mu$ g). Intrathecal fluorocitrate, minocycline, anti-fractalkine, fractalkine, anti-TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and thalidomide were given 20 min before LPS. Articular incapacitation was evaluated hourly with automated recordings of the knee-joint function during animal walking, while edema was evaluated with measurements of increase in articular diameter. After 6 h, synovial fluid and the lumbar spinal cord were collected for subsequent evaluations of leukocyte infiltration and immunoreactivity for GFAP and OX-42, respectively. The lower doses of intrathecal fluorocitrate (0.3 nmol) and minocycline (6 and 24 nmol) significantly reduced articular edema. Increases in dose of fluorocitrate and minocycline produced greater inhibition of articular edema and incapacitation. Fluorocitrate 3 nmol also inhibited synovial leukocyte counts. The higher intrathecal doses of both drugs did not affect incapacitation or edema when given by intraperitoneal route. Corticosteroid synthesis inhibition by aminogluthetimide did not change the hyponociceptive and anti-oedematogenic effects of both glial inhibitors. The inhibitory effect of the dorsal root potential inhibitor, furosemide, was not additive to that caused by the glial inhibitors. Fractalkine and TNF- $\alpha$  increased articular edema, incapacitation and synovial leukocyte counts while anti-fractalkine, anti-TNF- $\alpha$  and thalidomide were inhibitory. The pro-edematogenic and hipernociceptive effects of fractalkine were reversed by fluorocitrate and anti-TNF- $\alpha$ . Fractalkine increased GFAP and OX-42 immunoreactivity while fluorocitrate, minocycline, anti-TNF- $\alpha$ , anti-fractalkine and thalidomide induces opposite effects. These results suggest that besides their role in long-lasting nociceptive states, spinal glia may also be contributing to the development of peripheral inflammation, a process that involves release of fractalkine and TNF- $\alpha$  in the spinal cord. A possible modulation on dorsal root reflexes is discussed as an explanation for the effects of glial cells on peripheral inflammation. Administration of immunomodulatory drugs into the spinal cord may be useful in the treatment of chronic inflammatory arthritis, when the patient presents intolerable side-effects to the conventional systemic therapies.

Keywords: arthritis, dorsal root reflex, spinal cord, TNF- $\alpha$ , fractalkine, neurogenic inflammation.



## Lista de Abreviações

- AINEs - anti-inflamatórios não esteroidiais;
- API - área proporcional imunoreativa;
- DA - diâmetro articular;
- DMARD - (textitdisease-modifying antirheumatic drugs);
- E.P.M. - erro padrão da média;
- LPS - lipopolissacarídeo;
- GFAP - *glial fibrillary acidic protein*;
- LT - leucócitos totais;
- OX-42 - anticorpo monoclonal anti-CD 11b/c;
- PBS - *phosphate buffered saline*;
- RI-ME - região de interesse pré-selecionada na medula espinhal;
- TEP - tempo de elevação da pata;
- TNF- $\alpha$  - *tumor necrosis factor- $\alpha$* .



# Sumário

|                                                                                              |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Lista de Figuras</b>                                                                      | <b>xiii</b> |
| <b>Lista de Tabelas</b>                                                                      | <b>xvii</b> |
| <b>1 Introdução</b>                                                                          | <b>1</b>    |
| 1.1 O tratamento da artrite . . . . .                                                        | 1           |
| 1.2 Interação entre neurônios e células gliais no sistema nervoso central . . .              | 3           |
| 1.3 Características gerais da ativação das células gliais . . . . .                          | 4           |
| 1.4 Ativação das células gliais e a modulação da dor . . . . .                               | 7           |
| 1.5 Substâncias liberadas pelas células gliais e a modulação da atividade neuronal . . . . . | 9           |
| 1.6 Novas perspectivas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas                   | 11          |
| <b>2 Objetivos</b>                                                                           | <b>13</b>   |
| 2.1 Objetivo geral . . . . .                                                                 | 13          |
| 2.2 Objetivos específicos . . . . .                                                          | 13          |
| <b>3 Materiais e Métodos</b>                                                                 | <b>15</b>   |
| 3.1 Animais . . . . .                                                                        | 15          |
| 3.2 Fármacos, reagentes e soluções . . . . .                                                 | 16          |
| 3.2.1 Fármacos e o respectivo veículo utilizado na diluição. . . . .                         | 16          |
| 3.2.2 Reagentes e soluções . . . . .                                                         | 16          |
| 3.3 Modelo experimental de artrite induzida por carragenina/LPS . . . . .                    | 17          |
| 3.4 Testes comportamentais . . . . .                                                         | 18          |
| 3.4.1 Teste algésimétrico . . . . .                                                          | 18          |
| 3.4.2 Mensuração do edema articular . . . . .                                                | 19          |
| 3.5 Métodos . . . . .                                                                        | 20          |
| 3.5.1 Injeção intratecal . . . . .                                                           | 20          |
| 3.5.2 Imunohistoquímica . . . . .                                                            | 20          |
| 3.5.3 Análise das imagens fluorescentes . . . . .                                            | 21          |
| 3.5.3.1 Correção de interferentes nas imagens digitais . . . . .                             | 22          |
| 3.5.3.2 Captura e armazenamento das imagens . . . . .                                        | 23          |
| 3.5.4 Seleção da região de interesse na medula espinhal . . . . .                            | 24          |
| 3.5.5 Análise quantitativa . . . . .                                                         | 25          |
| 3.5.6 Contagem de leucócitos no fluido sinovial . . . . .                                    | 26          |

|          |                                                                                                                                                                                         |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6      | Protocolo experimental . . . . .                                                                                                                                                        | 26        |
| 3.7      | Análise estatística . . . . .                                                                                                                                                           | 27        |
| <b>4</b> | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                       | <b>29</b> |
| 4.1      | Curva dose-resposta dos efeitos do LPS na incapacitação e edema articular em ratos sensibilizados com carragenina. . . . .                                                              | 29        |
| 4.2      | Fluorocitrato e minociclina inibem a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos por LPS. . . . .                                                                         | 32        |
| 4.3      | Efeito da co-administração de furosemida com fluorocitrato ou minociclina na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos. . . . .                                        | 36        |
| 4.4      | Aminoglutetimida não altera os efeitos antinociceptivo e anti-edematoso do fluorocitrato e da minociclina. . . . .                                                                      | 40        |
| 4.5      | LPS intra-articular aumenta a imunoreatividade do GFAP e CD11b/c no corno dorsal da medula espinhal de ratos. . . . .                                                                   | 42        |
| 4.6      | Fluorocitrato e minociclina reduzem a expressão de GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal de ratos. . . . .                                                        | 47        |
| 4.7      | Anti-fractalcina inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular, a migração de leucócitos no fluido sinovial e a imunoreatividade do GFAP e CD11b/c na medula espinhal. . . . . | 50        |
| 4.8      | Fractalcina exógena aumenta a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. . . . .                                                                 | 53        |
| 4.9      | Fluorocitrato reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematoso da fractalcina. . . . .                                                                                               | 56        |
| 4.10     | Anti-TNF- $\alpha$ reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematoso da fractalcina. . . . .                                                                                          | 59        |
| 4.11     | TNF- $\alpha$ exógeno aumenta a incapacitação e o diâmetro articular induzidos por LPS. . . . .                                                                                         | 63        |
| 4.12     | Talidomida intraperitoneal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. . . . .                                                 | 66        |
| 4.13     | Talidomida intratecal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. . . . .                                                      | 68        |
| 4.14     | Talidomida intraperitoneal e intratecal reduzem a expressão de GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal de ratos. . . . .                                            | 71        |
| <b>5</b> | <b>Discussão</b>                                                                                                                                                                        | <b>73</b> |
| 5.1      | Evidências da modulação da inflamação articular pela glia. . . . .                                                                                                                      | 73        |
| 5.2      | Mediadores inflamatórios envolvidos na interação neurônio-glia na medula espinhal. . . . .                                                                                              | 75        |
| <b>6</b> | <b>Conclusão</b>                                                                                                                                                                        | <b>81</b> |
|          | <b>Referências Bibliográficas</b>                                                                                                                                                       | <b>83</b> |



# Lista de Figuras

|      |                                                                                                                                                                 |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1  | Astrócitos, microglia e neurônio piramidal . . . . .                                                                                                            | 6  |
| 1.2  | Ativação da microglia, um processo dinâmico . . . . .                                                                                                           | 6  |
| 1.3  | Estrutura da fractalcina . . . . .                                                                                                                              | 8  |
| 3.1  | Aparelho para avaliação da incapacitação articular e sapatilha metálica acoplada na pata do rato . . . . .                                                      | 19 |
| 3.2  | Mensuração do diâmetro articular . . . . .                                                                                                                      | 19 |
| 3.3  | Injeção intratecal . . . . .                                                                                                                                    | 20 |
| 3.4  | Ruído produzido por câmeras digitais e distribuição não homogênea da luz . . . . .                                                                              | 22 |
| 3.5  | Interferência entre fluoróforos . . . . .                                                                                                                       | 24 |
| 3.6  | Região de interesse na medula espinhal . . . . .                                                                                                                | 24 |
| 3.7  | Leucócitos presentes no fluido sinovial de ratos . . . . .                                                                                                      | 26 |
| 3.8  | Protocolo experimental . . . . .                                                                                                                                | 27 |
| 4.1  | Curva dose-resposta dos efeitos do LPS na incapacitação e edema articular em ratos sensibilizados com carragenina . . . . .                                     | 30 |
| 4.2  | Curva de carragenina/LPS, somente LPS, carragenina ou solução fisiológica . . . . .                                                                             | 31 |
| 4.3  | Fluorocitrato e minociclina intratecal inibem a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos por LPS . . . . .                                     | 33 |
| 4.4  | Fluorocitrato e minociclina intraperitoneal não alteram a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . . | 35 |
| 4.5  | Furosemida intratecal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                             | 37 |
| 4.6  | Furosemida não altera o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina . . . . .                                                  | 38 |
| 4.7  | Furosemida não altera o efeito do inibitório do fluorocitrato sobre a migração de leucócitos . . . . .                                                          | 39 |
| 4.8  | Aminoglutetimida não altera o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina . . . . .                                            | 41 |
| 4.9  | Imunoreatividade do GFAP e OX-42 na medula espinhal de ratos . . . . .                                                                                          | 43 |
| 4.10 | Morfologia dos astrócitos e da microglia na medula espinhal de ratos . . . . .                                                                                  | 43 |

|      |                                                                                                                                                                                     |    |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.11 | Aumento da área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 ipsi e contralateral em ratos naïve e após injeção intra-articular de LPS . . .                                         | 44 |
| 4.12 | Alterações na área proporcional imunoreativa para GFAP (astrócitos) em ratos naïve e tratados com carragenina/LPS . . . . .                                                         | 45 |
| 4.13 | Alterações na área proporcional imunoreativa para OX-42 (microglia) em ratos naïve e tratados com carragenina/LPS . . . . .                                                         | 46 |
| 4.14 | Fluorocitrato e minociclina reduzem a área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal . . .                                         | 48 |
| 4.15 | Alterações na área proporcional imunoreativa em ratos naïve, controle (LPS) e tratados com fluorocitrato ou minociclina . . . . .                                                   | 49 |
| 4.16 | Anti-fractalcina intratecal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                           | 51 |
| 4.17 | Anti-fractalcina reduz a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal . . . . .                                            | 52 |
| 4.18 | Fractalcina intratecal aumenta a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                                         | 54 |
| 4.19 | Fractalcina intravenosa não altera a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                                     | 55 |
| 4.20 | Fluorocitrato reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina . . . . .                                                                                      | 57 |
| 4.21 | Efeito da co-administração de fluorocitrato com fractalcina na área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal . . . . .      | 58 |
| 4.22 | Anti-TNF- $\alpha$ intratecal inibe a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos por LPS . . . . .                                                                   | 60 |
| 4.23 | Anti-TNF- $\alpha$ reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina . . . . .                                                                                 | 61 |
| 4.24 | Efeito da co-administração de anti-TNF- $\alpha$ com fractalcina na área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal . . . . . | 62 |
| 4.25 | TNF- $\alpha$ intratecal aumenta a incapacitação e o diâmetro articular induzidos por LPS . . . . .                                                                                 | 64 |
| 4.26 | O TNF- $\alpha$ não alterou a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal . . . . .                                       | 65 |
| 4.27 | Talidomida inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                                            | 67 |
| 4.28 | Talidomida intratecal reduz a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                                 | 69 |
| 4.29 | Talidomida subcutânea não altera a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS . . . . .                                            | 70 |
| 4.30 | Talidomida reduz a área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal de ratos . . . . .                                               | 71 |

|     |                                                                                             |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.1 | Esquema da interação entre neurônios e glia e a modulação da inflamação articular . . . . . | 82 |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|



# Lista de Tabelas

|     |                                                                                                   |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 | Contagem de leucócitos no fluido sinovial 6 horas após a injeção intra-articular de LPS . . . . . | 34 |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



# 1 Introdução

## 1.1 O tratamento da artrite

A artrite é uma doença inflamatória crônica que acometem principalmente as articulações causando dor, inchaço, rigidez mais intensa após o despertar e, em estágios mais avançados da doença, deformidades e perda da mobilidade articular. Com a progressão da doença, os indivíduos portadores de artrite desenvolvem incapacidade para a realização de suas atividades, tanto da vida diária como profissional, além da redução da expectativa de vida [47, 154]. A forma mais prevalente é a osteoartrite, que chega a acometer 30 % da população adulta, seguida da artrite reumatóide, também conhecida como artrite deformante e que apresenta incidência de cerca de 1 % na população mundial [201, 179]. Formas mais raras como as espondiloartropatias, dentre elas a artrite reativa, acometem em torno de 0,5 % da população [59].

Nas últimas décadas, reumatologistas e pacientes têm testemunhado a evolução na compreensão clínica das diferentes manifestações da artrite, o que tem possibilitado o desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias terapêuticas mais eficazes e que apresentam menor incidência de efeitos colaterais. O tratamento da artrite visa conscientizar o paciente sobre a doença, aliviar a dor, melhorar a função, diminuir a deficiência e prevenir ou retardar a progressão e as consequências destrutivas da doença [81, 86]. Os tratamentos atuais buscam aliviar os sintomas da artrite por diferentes métodos: (1) tratamento não farmacológico (p. ex., educação, exercícios e mudança do estilo de vida); (2) tratamento farmacológico (p. ex., analgésicos, anti-inflamatórios não esteroidais, fármacos modificadores da doença e corticosteróides) e (3) tratamento invasivo (p. ex., injeções intra-articulares e artroplastia) [63, 81, 86]. Segundo recomendação da *European League Against Rheumatism* (EULAR), a estratégia terapêutica ideal envolve a combinação do tratamento não farmacológico com o farmacológico, iniciados após avaliação dos fatores de risco para as articulações como obesidade, fatores mecânicos adversos e atividade física, fatores de risco gerais como idade e comorbidade, nível de dor e deficiência/incapacitação, sinais de inflamação, localização e grau de destruição estrutural das articulações [81, 86].

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os fármacos mais utilizados para o tratamento da artrite por serem eficazes em aliviar a dor, além de reduzirem a inflamação [91]. Porém, o uso contínuo destes fármacos causa sérios danos gástricos (úlceras), o que leva ao abandono do tratamento. Uma alternativa são os anti-inflamatórios cujo mecanismo é a inibição seletiva da enzima ciclooxigenase-2

(COX-2; p. ex., rofecoxib, celecoxib e etoricoxib), os quais apresentam menor incidência de danos gastrointestinais [95, 110, 21]. Porém, estes medicamentos aumentam o risco de complicações cardiovasculares podendo levar, por exemplo, ao infarto do miocárdio, especialmente em pacientes que já apresentam algum comprometimento cardiovascular [52, 144]. Outra limitação dos AINEs é que estes fármacos não impedem a destruição das articulações pela inflamação crônica e a progressão da artrite, o que os torna um tratamento ineficaz a longo prazo [136].

Os fármacos modificadores de doença (DMARD) constituem uma alternativa aos AINEs pois são capazes de reduzir a degeneração das articulações, preservando a função e retardando a progressão da doença. Em pacientes com artrite reumatóide, encoraja-se o uso precoce deste tipo de fármaco a fim retardar ao máximo a progressão da doença [129]. Dentre os fármacos modificadores da doença mais eficazes encontram-se o metotrexato, a sulfasalazina e o leflunomide que, quando associados oferecem significativos benefícios clínicos aos pacientes [89]. Os efeitos adversos mais comuns destes fármacos incluem ulceração oral e efeitos colaterais gastrointestinais, podendo haver, com menor frequência, anormalidades hematológicas e hepatotoxicidade [3]. Outra limitação para a terapia com esta classe de fármacos é que dependendo da doença o tratamento alivia apenas a manifestação sintomatológica necessitando a adoção de uma terapia combinada [55].

A terapia mais recentes e promissora para o tratamento de doenças artríticas inclui o uso de fármacos como o etanercept, infliximab e anakinra. Estes fármacos, que bloqueiam seletivamente as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1*beta*, mediadores pró-inflamatórios importantes nas doenças artríticas, são promissores pois promovem a remissão da doença associada com a prevenção dos danos articulares, especialmente quando o tratamento inicia no início do desenvolvimento da doença, antes que haja algum dano articular [177]. Estes fármacos causam grande impacto na melhoria do prognóstico da artrite a longo prazo [101], porém apresentam a desvantagem de aumentar o risco de infecções quando comparado com os fármacos modificadores de doença tradicionais [140]. Além disso, apresentam um custo de aquisição que é normalmente muito superior aos dos AINEs e, por serem fármacos relativamente novos, ainda se desconhece os riscos do tratamento a longo prazo.

De maneira geral, observa-se que ainda não existe o perfeito entendimento de uma estratégia terapêutica segura e eficaz para o tratamento da artrite. Estudos recentes têm demonstrado que muitas doenças, cujas manifestações sintomatológicas estão localizadas na periferia, também sofrem influência de eventos que ocorrem no sistema nervoso central. Um exemplo disso é o controle que o sistema nervoso central pode exercer sobre a dor em tecidos periféricos [164]. Além disso, o sistema nervoso central pode interagir com o sistema imune e influenciar o início e a progressão da doença, bem como determinar a ineficiência e/ou resistência a certas terapias [34]. Desta forma, entender como o sistema nervoso central interage com o sistema imune pode alavancar a descoberta de novos alvos terapêuticos, bem como a produção de novos medicamentos mais eficazes para o tratamento de doenças crônicas como a artrite.



## 1.2 Interação entre neurônios e células gliais no sistema nervoso central

As células gliais, especificamente os astrócitos e a microglia, foram reconhecidas por longo tempo como constituintes envolvidos em prover o ambiente ideal para o funcionamento neuronal, tendo como funções principais o suporte e a nutrição destas células. No entanto, estudos publicados na última década têm indicado que a glia pode interagir com os neurônios, modulando a sua atividade tanto sob condições fisiológicas quanto patológicas [7]. A ativação glial é uma característica comum a muitas doenças do sistema nervoso central e está envolvida na defesa, no reparo e na regeneração do tecido neuronal exposto a doenças infecciosas, inflamação, trauma, tumores ou neurodegeneração [90, 187].

A interação entre células gliais e neurônios tem sido objeto de muitas investigações. Existem tanto evidências anatômicas quanto funcionais de que estas células podem interagir entre si no sistema nervoso central. Um estudo demonstrou que no *loco ceruleo*, por exemplo, ocorre um acoplamento funcional entre as células gliais e os neurônios, o que afetaria diretamente a atividade dos neurônios nesta região do cérebro [6]. Este acoplamento funcional ocorre através de proteínas específicas que formam um canal, as junções comunicantes (*gap junctions*), as quais possibilitariam a transferências de íons e pequenas moléculas de uma célula para outra. Os neurônios são capazes de regular a expressão das conexinas que formam as junções comunicantes [149]. Evidências mais recentes indicam que as junções comunicantes presentes entre neurônios e astrócitos na lâmina superficial da medula espinhal estão envolvidas no processo de facilitação da dor [139, 172].

Outras evidências da interação entre neurônios e glia incluem a demonstração de que a atividade neuronal e a liberação de neurotransmissores são capazes de induzir um aumento na concentração de cálcio na glia. Este aumento de cálcio que ocorre, por exemplo, nos astrócitos, causa a liberação de glutamato destas células, o qual irá ativar receptores nos neurônios modulando a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica [7]. A localização anatômica dos neurônios e da glia também favorece a interação entre estas células. As sinapses neuronais são encapsuladas pela glia, a qual expressa receptores para muitos dos neurotransmissores liberados na fenda sináptica [75, 130], sintetiza e libera neurotransmissores [76, 23, 161] e produz transportadores que recaptam os neurotransmissores do espaço extracelular ou os liberam para a fenda sináptica [161, 87]. Assim, a glia apresenta várias características e expressa muitos dos receptores comuns aos neurônios evidenciando o seu potencial em modular o funcionamento neuronal. Porém, estudos adicionais ainda são necessários para se conhecer, de acordo com o estímulo, qual o mecanismo de ativação destas células nos diferentes sítios do

sistema nervoso central, por exemplo, na medula espinhal e qual a consequência desta interação nas doenças.

### 1.3 Características gerais da ativação das células gliais

A ativação glial constitui um processo multidimensional e a maneira pela qual ela é expressa depende do tipo e da intensidade do estímulo indutor, podendo ocorrer curso temporal e padrão de respostas distintos. Esta característica das células gliais é distinta das células neuronais, cuja ativação é unidimensional, ou seja, resulta exclusivamente em produção de potencial de ação [191]. No sistema nervoso central, os astrócitos e a microglia diferem quanto à origem, ao seu estado de ativação basal e às alterações morfológicas e funcionais após a ativação.

Os astrócitos, caracterizados por processos conter longos, numerosos e em formato estrelar (Figura 1.1), representam 90 % das células no cérebro e estão normalmente ativos, desempenhando diferentes funções as quais incluem nutrição, suporte da função neuronal através da manutenção da concentração local de íons, estocagem de glicogênio, limpeza de resíduos neuronais, recaptação de neurotransmissores [124, 67] e fornecimento de fatores neurotróficos [40]. Outra função dos astrócitos que tem despertado a atenção da comunidade científica é o seu envolvimento nas respostas imunes no sistema nervoso central. Embora sua origem não seja de células hematopoiéticas, mas de células neuroepiteliais [67], os astrócitos exibem funções imunes. Os astrócitos expressam os receptores *toll-like* (TLRs), atuam como células apresentadoras de antígenos e produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas. Os astrócitos são importantes pra a sinalização com a periferia uma vez que eles secretam quimiocinas e citocinas e apresentam contato íntimo com os vasos sanguíneos [39]. Um dos marcadores mais utilizados na detecção dos astrócitos são os filamentos intermediários presentes no citoplasma e conhecidos como GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). A função destas proteínas ainda não é conhecida, porém o aumento da sua expressão está associada com o incremento da ativação dos astrócitos [190].

O aumento da atividade astrocitária ocorre em resposta a traumas, isquemia, neurodegeneração ou à presença de componentes imunogênicos de vírus e bactérias [191]. A ativação destas células é morfológicamente caracterizada por hipertrofia e retração dos processos astrocíticos e, funcionalmente pelo aumento da produção e liberação de uma variedade de substâncias que incluem citocinas e quimiocinas e da expressão de GFAP [190]. Recentemente, os estudos têm demonstrado que além da função de suporte neuronal, os astrócitos também alteram diretamente a atividade neuronal, contribuindo para a geração e manutenção da dor crônica [118].

Diferente dos astrócitos, sob condições fisiológicas, a microglia apresenta-se na forma quiescente e constitui as células imunes residentes no sistema nervoso central [90]. Embora poucos relatos consistentes tenham sido publicados acerca da origem da microglia, acredita-se que células glias mesodérmicas invadam o sistema nervoso cen-

tral durante a fase embrionária do desenvolvimento. Subsequentemente, no período pós-natal, ocorre uma segunda migração de monócitos derivados da medula e, desta forma, ocorre a formação da microglia [148, 26]. A microglia é classificada em dois grupos celulares, de acordo com sua morfologia e seu estado de ativação que são a microglia em repouso, referenciada anteriormente como microglia quiescente e a microglia ativada.

A microglia quiescente apresenta morfologia típica, ramificada, com corpo celular pequeno (5-10  $\mu\text{m}$ ) e núcleo que preenche quase completamente o soma (Figura 1.2) [134]. Numerosas ramificações, finas e longas, também conhecidas como processos microgliais, emergem a partir do soma. Uma característica marcante destas células é que elas se tornam rapidamente ativadas em resposta ao menor estímulo patológico no sistema nervoso central. Quando ativadas, as células microgliais apresentam alterações morfológicas características e adquirem propriedades fagocíticas, atuando no reparo tecidual e na regeneração neural [90], na defesa do parênquima neural contra doenças infecciosas, inflamação, trauma, isquemia, tumores cerebrais e na neurodegeneração. As alterações morfológicas incluem o aumento do corpo celular, o encurtamento e a hipertrofia das ramificações (Figura 1.2). As células podem adquirir formato esférico ou amebóide (Figura 1.1) podendo apresentar ausência de ramificações [22]. A forma amebóide da microglia também é evidente durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário e durante a plasticidade, enquanto que a microglia ramificada (quiescente) é encontrada na vida adulta sob condições fisiológicas.

A ativação microglial também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas como o MHC (*major histocompatibility complex*), o receptor para o complemento-3 (CR3), as integrinas  $\beta 2$  (CD11b e CD11c) e uma variedade de receptores para citocinas, quimiocinas e outras substâncias liberadas no sistema nervoso central. As alterações funcionais da microglia ativada incluem a migração para áreas de lesão, a fagocitose, a apresentação de antígenos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [191]. Além disso, a ativação da microglia está envolvida com o sistema imune adaptativo, uma vez que estas células são componentes chave no recrutamento de leucócitos [5]. Outras funções importantes da microglia incluem a indução de apoptose em subpopulações específicas de neurônios durante o desenvolvimento [107], o controle da sinaptogênese [150], a síntese de fatores neurotróficos e a regulação da transmissão sináptica [35] e da astrogliose [4, 175]. A ativação da microglia é geralmente benéfica pois atua de maneira protetora. Porém, a ativação crônica leva a mudanças neuronais e contribui para a destruição neuronal que é observada em certas doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer [85], a esclerose lateral amiotrófica [17] e a doença de Parkinson [24].

Estudos recentes têm demonstrado que a microglia contribui para a geração e a manutenção da dor nas neuropatias [36, 97, 137, 37], o que despertou o nosso interesse por investigar a contribuição da ativação destas células para a dor e em especial para a inflamação que ocorre em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite.

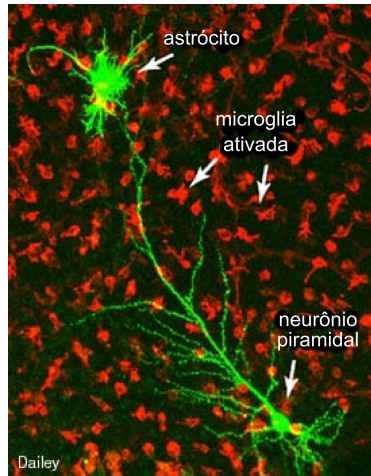


Figura 1.1: A figura ilustra a morfologia estrelar e ramificada de um astrócito em comparação com a microglia ativada (morfologia amebóide) e um neurônio piramidal no sistema nervoso central. Adaptado de [38].

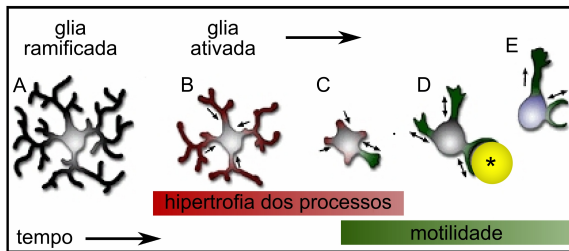


Figura 1.2: Ativação da microglia, um processo dinâmico. A. Inicialmente a glia exibe morfologia ramificada com processos longos e finos; B. Após ativação, a microglia sofre alterações morfológicas que incluem a retração dos processos podendo haver a emissão de protusões (C); D. As protusões emitidas pela microglia podem entrar em contato com células vizinhas (\*); E. A microglia pode locomover-se, tocar outras células ou até mesmo fagocitá-las. Adaptado de [174].

## 1.4 Ativação das células gliais e a modulação da dor

Alterações neuroimunes têm sido implicadas no desencadeamento da dor induzida por diversos tipos de lesão em tecidos periféricos [193, 98]. Na medula espinhal, as células gliais são ativadas em resposta a uma ampla variedade de condições que sabidamente produzem respostas de dor exagerada (p. ex., inflamação crônica dos tecidos e lesão de nervos) [193]. Além disso, a glia também pode ser ativada por patógenos (vírus e bactérias), substâncias liberadas por fibras aferentes primárias que transmitem a informação dolorosa da periferia para a medula espinhal e que possuem receptores nas células gliais (ATP, aminoácidos excitatórios, substância P e fractalcina) ou substâncias liberadas dos neurônios de segunda ordem da medula espinhal que conduzem a informação dolorosa da medula espinhal para o cérebro (prostaglandinas, óxido nítrico e fractalcina) [193, 190].

No início da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos demonstrando que em modelos animais de dor neuropática, induzida por lesão em nervos periféricos, havia ativação de astrócitos no corno dorsal da medula espinhal [50]. Além disso, drogas que bloqueavam a dor neuropática, como o antagonista do receptor glutamatérgico NMDA, o MK801, suprimiam a ativação dos astrócitos [49]. Estes estudos demonstraram pela primeira vez uma possível relação entre a ativação glial e o desenvolvimento da dor neuropática. Estudos mais recentes demonstraram que outros estímulos, como a ligação de nervos [36, 80], a injeção subcutânea de formalina [48] ou adjuvante completo de Freund (CFA) [142], a inflamação do nervo ciático [97] e a lesão da medula espinhal [137, 56, 173, 126, 202, 37], também são capazes de induzir ativação das células gliais no sistema nervoso central, particularmente na medula espinhal. O bloqueio da ativação das células gliais através da injeção intratecal do fluorocitrato, um inibidor metabólico glial, reduza dor gerada por estímulos que induzem tanto a inflamação do tecido subcutâneo [192, 111] quanto a inflamação de nervos periféricos [189]. A inibição específica da microglia com minociclina também atenua a hiperalgesia e a alodinia em modelo de dor neuropática [141]. Outros achados também demonstraram que a interrupção da ativação glial atenua a tolerância produzida pela morfina, sugerindo que as substâncias liberadas pela glia atuam contrapondo-se aos efeitos do opióide crônico [169]. Diante destas evidências de que a ativação das células gliais contribui para a geração e manutenção da hipersensibilidade à dor, vários estudos têm sido realizados para investigar quais moléculas são capazes de induzir a ativação glial, bem como quais substâncias liberadas pela glia podem alterar a atividade neuronal e, desta forma, contribuir para a geração e manutenção da dor.

Estudos prévios demonstraram que as células gliais expressam receptores para muitas das substâncias liberadas pelos neurônios. Na medula espinhal, por exemplo, os astrócitos e a microglia expressam receptores para glutamato [15], ATP [183], substância P [108], CGRP [145, 138] e citocinas pró-inflamatórias, como a fractalcina [8, 186].

A fractalcina (CX3CL1, *CX3C ligand-1*) tem sido cogitada como uma das moléculas

las liberadas no sistema nervoso central capaz de ativar as células gliais, especialmente porque apresenta algumas características que a diferenciam das demais substâncias liberadas pelos neurônios [119, 176]. A fractalcina é a única citocina expressa constitutivamente e liberada pelos neurônios no sistema nervoso central, enquanto que seu receptor (CX3CR1) é expresso exclusivamente na glia [8, 186]. Trata-se de uma citocina quimiotática, único membro pertencente à classe CX3C, cuja estrutura é caracterizada por ter duas cisteínas separadas por três aminoácidos (Figura 1.3) [8, 70]. A fractalcina existe nas formas solúvel e ligada à membrana extracelular [14, 131], é a única que se liga em apenas um tipo de receptor, denominado CX3CR1 (*CX3C receptor-1*), que lhe é exclusivo [82, 70]. Para ativar o receptor CX3CR1, a forma solúvel é clivada da membrana neuronal pela catepsina S, uma protease expressa e liberada pela microglia. [29].

Estudos *in vitro* utilizando cortes de hipocampo demonstraram que uma excitação neuronal intensa promove liberação de fractalcina neste tecido, a qual se liga ao seu receptor promovendo ativação da glia [27]. O que se tem sugerido é que na medula espinhal a ativação da glia pela fractalcina liberada dos neurônios é favorecida pela localização muito próxima de ambos, neurônios e glia [27, 186]. Outro fato que aponta positivamente para a interação neurônio-glia via liberação de fractalcina é que algumas substâncias liberadas após intensa estimulação neuronal, como o glutamato ou liberadas pela glia como o TNF- $\alpha$  ou o INF- $\gamma$ , induzem a clivagem de fractalcina da superfície celular dos neurônios [27, 44]. Estudos *in vivo* têm sugerido que a liber-

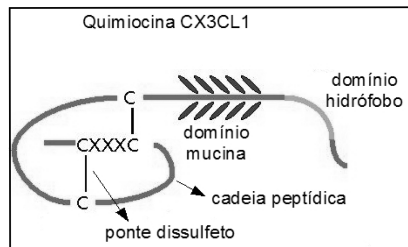


Figura 1.3: A fractalcina, (CX3CL1) tem como característica particular em sua estrutura a presença de três aminoácidos (XXX) entre duas cisteínas (C). Existem quatro cisteínas em sua estrutura que interagem entre si em pares via pontes dissulfeto (a primeira com a terceira e a segunda com a quarta) criando um arranjo espacial denominado *Greek key*, característico das quimiocinas. Também existe um domínio hidrófobo. Adaptado de [84].

ação prolongada de fractalcina pode contribuir para a manutenção da dor neuropática por alterar a sensibilização central [119, 176, 203]. Demonstrou-se que a fractalcina é expressa em neurônios da medula espinhal e nos corpos celulares dos neurônios sensoriais no gânglio da raiz dorsal [186, 30]. Além disso, após lesão de nervos periféricos,

ocorre um aumento da expressão dos receptores desta quimiocina na microglia [186]. Outros achados demonstraram que a administração intratecal de fractalcina resulta em hipersensibilidade térmica [119, 114] e mecânica [119, 114, 30] que são prevenidas pelo pré-tratamento com antagonistas do receptor CX3CR1 [119, 114], da própria fractalcina [30] e por deleção gênica do receptor CX3CR1 em camundongos [30]. A fractalcina induz comportamento nociceptivo após a ativação dos receptores CX3CR1 na microglia, ativação da MAP quinase p38 [30, 204] e liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico [114]. Finalmente, a prevenção da sinalização fractalcina/CX3CR1 após lesão de nervo é capaz de atenuar a dor neuropática [119, 30]. Baseado nestas evidências de que a fractalcina está envolvida na ativação das células gliais e no controle do desenvolvimento e a manutenção da dor persistente que ocorre na neuropatia, nossa hipótese é que esta quimiocina também pode estar envolvida na interação neurônio-glia e na consequente ativação de células gliais em modelos de inflamação crônica em tecidos periféricos como o articular.

## 1.5 Substâncias liberadas pelas células gliais e a modulação da atividade neuronal

Sob ativação, a glia libera uma variedade de substâncias que podem potencializar a transmissão da dor pelos neurônios [168, 191, 142] as quais incluem a PGE2 [1, 73, 77], aminoácidos excitatórios, ATP, BDNF e citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  [35, 45, 11]. A PGE2 tem sido implicada na indução da sensibilização central dos neurônios da medula espinhal [120, 79] sendo que a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), um efector importante na biosíntese de PGE2, é ativado na glia [1]. Outra substância liberada pelas células gliais e que pode alterar a excitabilidade neuronal é o TNF- $\alpha$  [62, 198], uma citocina pró-inflamatória associada com a indução e a manutenção da dor em neuropatias [191, 106, 121, 160, 96] e cujo receptor é expresso em neurônios na medula espinhal [12, 65, 61]. Embora já tenha sido detectada em alguns neurônios [72], não existem evidências claras de que os neurônios sintetizem e liberem este tipo de mediador [188]. Sendo assim, o TNF- $\alpha$  liberado das células gliais ativadas parece ser uma das substâncias que medeia a interação glia-neurônio no sistema nervoso central.

Ao interagirem com os neurônios na medula espinhal, as substâncias oriundas das células gliais causam a liberação de substância P e aminoácidos excitatórios das fibras aferentes primárias e, conseqüentemente, aumentam a excitabilidade dos neurônios de transmissão da dor [76, 171]. Os mediadores liberados dos neurônios sensoriais aumentam ainda mais a ativação glial gerando, assim, uma resposta dolorosa amplificada e persistente [189]. Desta forma, a glia ativada aumenta a exposição dos neurônios de transmissão da dor a aminoácidos excitatórios, prostaglandinas, óxido nítrico, substância P e citocinas pró-inflamatórias, fatores estes que são classicamente reconhecidos

como mediadores capazes de gerar estados de dor intensa e que usualmente assume-se que sejam derivados apenas de neurônios.

Ao aumentarem a excitabilidade neuronal, os mediadores liberados pelas células gliais na medula espinhal contribuem para o processo de sensibilização central. Uma das conseqüências da sensibilização central, sob condições patológicas, é a facilitação do processo neuronal eferente, o reflexo da raiz dorsal [25, 152, 196]. O reflexo da raiz dorsal pode modular a dor tanto pelo seu efeito central, por causar a liberação de neurotransmissores do terminal central das fibras aferentes primárias na medula espinhal, o que contribui para a geração do potencial de ação pós-sináptico excitatório [42, 43, 41] quanto pelo seu efeito periférico, estimulando a liberação de neuropeptídeos no terminal periférico das fibras aferentes primárias culminado com uma excitação ainda maior destas fibras [100, 164, 147, 102]. Além dos efeitos sobre a excitabilidade neuronal e conseqüentemente sobre a dor, o reflexo da raiz dorsal também modula a inflamação ao causar a liberação de substâncias nos tecidos periféricos, as quais contribuem para um processo denominado de inflamação neurogênica. Já é de longa data que se tem conhecimento de que a estimulação de nervos periféricos induz e/ou aumenta a inflamação local [13] e que esta reação inflamatória pode ser abolida por denervação [78], comprovando o envolvimento de uma ativação eferente dos neurônios aferentes primários neste processo. Além disso, a presença do componente neurogênico parece estar presente em uma variedade de doenças inflamatórias [60]. Estudos em modelos experimentais de artrite demonstram que após a estimulação mecânica da articulação, o reflexo da raiz dorsal pode ser registrado em fibras C e contribui para a inflamação neurogênica ao promover o aumento da liberação de neuropeptídeos dos terminais destas fibras presentes na articulação [100, 164, 147, 102]. Tais neuropeptídeos incluem a substância P e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), os quais causam vasodilatação e extravasamento plasmático articular [33, 200, 46, 94, 166, 146]. Além disso, a inflamação neurogênica também está associada com eventos como a atração e degranulação de mastócitos, hiperemia e aumento da adesão de leucócitos ao endotélio vascular [105, 157, 66]. Estudos de Sluka e colaboradores [164], em modelo de inflamação articular induzida por kaolin/carragenina, demonstraram que após rizotomia ocorre redução de aproximadamente 50 % na circunferência da articulação inflamada demonstrando o efeito do reflexo da raiz dorsal sobre a modulação do edema periférico.

Baseado nestes estudos que demonstram que substâncias liberadas pelas células gliais ativadas podem alterar a sensibilização central, um evento que está relacionado com a geração do reflexo da raiz dorsal, nossa hipótese é que o reflexo da raiz dorsal direta ou indiretamente sofre modulação pela ativação da glia na medula espinhal. Conseqüentemente, a ativação das células gliais na medula espinhal além de contribuir para a geração e manutenção da dor, também pode estar envolvida com o incremento e a perpetuação da inflamação em tecidos periféricos como o articular.



## 1.6 Novas perspectivas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas

Entender a sequência e a natureza dos eventos que governam a comunicação entre neurônios e glia é crítico para a descoberta de novos mecanismos e alvos para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. O reconhecimento de que os neurônios expressam receptores para as substâncias liberadas pela glia, e vice-versa, revelou algo que até então havia passado despercebido, a interação entre o sistema nervoso central e sistema imune, e o mais importante, que o resultado desta interação é a modulação de mecanismos que geram um dos sintomas mais comuns em muitas doenças, a dor [193]. Porém, poucos estudos foram realizados para investigar a contribuição deste evento para a dor inflamatória, e talvez devido a isso muito pouco ainda tenha sido explorado sobre o potencial que esta interação apresenta em modular também a inflamação periférica.

A relevância desta interação neurônio-glia-tecido periférico também pode ajudar a explicar algumas características peculiares de certas doenças, como por exemplo, a simetria observada na artrite reumatóide ou porque o indivíduo apresenta um quadro de dor difusa e migratória como na fibromialgia. Além disso, alterações na interação entre o sistema nervoso central e o sistema imune também podem fazer parte dos mecanismos pelos quais muitos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios exercem sua funções.

A descoberta de que os neurônios interagem com a glia pode ser um grande passo favorável à aceitação, pela comunidade científica, de que o sistema nervoso central e o sistema imune não podem ser considerados como unidades independentes, mas que eles interagem entre si e o entendimento desta interação pode definir novas estratégias terapêuticas para o controle mais eficiente da inflamação e da dor em doenças em que isso ainda é um problema, como as artropatias [158]. Desta forma, o tratamento da dor e da inflamação em muitas doenças não se resumiria apenas na inibição da atividade neuronal aferente, mas também deverá envolver igualmente estratégias para reduzir a atividade eferente das fibras sensoriais e o estado da interação neurônio-glia.



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar qual a contribuição da ativação das células gliais no corno dorsal da medula espinhal para a dor e para a inflamação articular induzida por LPS em ratos pré-sensibilizados com carragenina. Além disso, investigar quais substâncias estariam envolvidos na sinalização neurônio-glia e, vice-versa, e sugerir novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite.

### 2.2 Objetivos específicos

- avaliar o efeito da injeção intratecal dos inibidores metabólicos das células gliais, fluorocitrato e minociclina, e da co-administração destes com furosemida, na incapacitação, no diâmetro articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzidos por LPS;
- verificar se a administração sistêmica de aminoglutetimida, um inibidor da síntese de corticóides, altera os efeitos do fluorocitrato e da minociclina;
- verificar o efeito da fractalcina, do TNF- $\alpha$  e dos anticorpos anti-fractalcina e anti-TNF- $\alpha$ , administrados por via intratecal, na incapacitação, no diâmetro articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzidos por LPS;
- verificar o efeito da co-administração de fluorocitrato ou anti-TNF- $\alpha$  com fractalcina na incapacitação, no diâmetro articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzidos por LPS;
- analisar o efeito da injeção intratecal e sistêmica de talidomida, um inibidor da síntese de TNF- $\alpha$ , na incapacitação, no diâmetro articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzidos por LPS;
- determinar a imunoreatividade para os marcadores específicos da atividade de astrócitos (GFAP) e microglia (OX-42) na medula espinhal em animais naïve, artríticos e que receberam os tratamentos acima mencionados.



## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus*, machos e pesando entre 250-350 gramas. Os ratos foram criados no Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC), transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia após o desmame e, posteriormente, para o biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN). No LANEN, os ratos foram agrupados em caixas contendo 6 animais e mantidos sob temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) e livre acesso à água e ração. Para prevenir possíveis infecções parasitárias, cada grupo de 6 ratos recebeu uma suspensão contendo albendazol dissolvido na água de beber (0,4 mg/ml; total de 500 ml/6 ratos), durante 3 dias consecutivos. Ao final do tratamento, cada animal recebeu um jato de spray de fipronil líquido (Frontline<sup>®</sup>, 1 jato = 1,5 ml = 4 mg) no dorso e no sentido contrário ao do crescimento dos pelos. Durante a aplicação, massageou-se os pelos para que o produto atingisse a pele. Estes tratamentos foram realizados um mês antes dos experimentos, ou seja, quando os animais apresentavam 2 meses de idade. Não observou-se alterações nos experimentos devidas aos tratamentos com estes fármacos. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 horas, após ambientação prévia dos ratos por pelo menos 1 hora na sala onde o experimento seria realizado. Todos os experimentos foram realizados seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor [205] e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo 23080.005219/2006-51. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de ratos utilizados nos experimentos.

## 3.2 Fármacos, reagentes e soluções

### 3.2.1 Fármacos e o respectivo veículo utilizado na diluição.

- Carragenina ( $\kappa$ /lambda, BDH Chemicals Ltd., UK). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- LPS lipopolissacarídeo de *E. coli*, 055:B5, Difco, USA). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- Fluorocitrato (*Fluorocitric acid barium salt*, Sigma-Aldrich, USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Minociclina *Minocycline hydrochloride*, Sigma-Aldrich, USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Furosemida (Galena Química Farmacêutica Ltd., Brasil). Veículo: bicarbonato de sódio 1,29 %; pH 7,8;
- Aminoglutetimida (Orimeten®), Novartis, Brasil). Veículo: água destilada;
- Talidomida (FUNED, Brasil). Veículo: PBS/DMSO 1 %, pH 7,4;
- Anti-fractalcina (*Anti-human Fractalkine*, PeproTech, Inc., USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Fractalcina (*Human Fractalkine*, PeproTech, Inc., USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Anti-TNF (*Anti-rat TNF- $\alpha$* , PeproTech, Inc., USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- TNF- $\alpha$  (*Rat-TNF- $\alpha$* , PeproTech, Inc., USA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Cloral hidratado (Vetec Química Fina Ltda, Brasil). Veículo: solução fisiológica 0,9%.

### 3.2.2 Reagentes e soluções

- PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Paraformaldeído (solução a 4 % em PBS, pH 7,4; Vetec, Brasil);
- Meio para congelamento de tecido (*Optimal Cutting Temperature - O.C.T. - embedding medium*; Sakura Finetechnical Co. Ltd., Japão);
- Gelatina porcina (*Gelatin from porcine skin, Type A*; Sigma-Aldrich, USA);

- Conservante para gelatina (1 %, *Chromium (III) potassium sulfate dodecahydrate*, 98+ %, *A.C.S. reagent*; Sigma-Aldrich, USA);
- Triton X-100 (solução a 0,1 % em PBS, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Soro fetal bovino (5 %; Cultilab, USA);
- Albumina bovina (1 %, *Albumin from bovine serum*, >= 97 % *agarose gel electrophoresis*; Sigma-Aldrich, USA);
- Anticorpo policlonal anti-GFAP (*polyclonal rabbit anti-GFAP*, diluição 1:500; Dako Cytomation, USA);
- Anticorpo monoclonal anti-CD 11b/c (*OX-42, monoclonal mouse anti-rat CD 11b/c*, diluição 1:200; Invitrogen, USA);
- Anticorpo anti-IgG de coelho (*fluorescein isothiocyanate - FITC*, diluição 1:100; Sigma, USA);
- Anticorpo anti-IgG de camundongo (*Alexa Fluor Red 546*, diluição 1:500; Invitrogen, USA);
- Glicerina tamponada (pH 9; Vetec, Brasil);
- Anestésico inalatório isoflurano (Abbott, Argentina)

### 3.3 Modelo experimental de artrite induzida por carragenina/LPS

O modelo de artrite induzida por carragenina/LPS tem como objetivo a indução de uma monoartrite na articulação fêmuro-tibial de ratos. Este modelo experimental foi desenvolvido baseado na condição clínica conhecida como artrite reativa (ReA - *Reactive arthritis*), uma monoartrite que se manifesta após infecções primárias extraarticulares (principalmente no trato gastrointestinal) causadas por bactérias gram negativas como a *Yersinia enterocolitica* [180]. Nestes pacientes, encontrou-se LPS no fluido sinovial das articulações acometidas, mas nenhum vestígio de bactérias viáveis [54, 53]. Desta forma, o LPS bacteriano parece ser um componente importante para a indução da artrite a para a manutenção da resposta inflamatória articular nestes pacientes [71, 162].

Além do LPS, traumas prévios na articulação também parecem constituir um fator que predis põe os pacientes para o desenvolvimento deste tipo de artrite [109, 2]. Sendo assim, a prévia sensibilização das articulação dos ratos com carragenina teve

como objetivo mimetizar um trauma inespecífico na articulação de uma maneira controlada, o que predispõem os ratos à uma reação inflamatória articular mais prolongada e duradoura ao LPS. Desta forma, este modelo experimental reproduz sinais e sintomas característicos da artrite reativa, mas que também são observados em outras artropatias, constituindo assim, uma ferramenta útil para identificar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da artrite em humanos.

A monoartrite em ratos foi evocada pela injeção de dois compostos na articulação: inicialmente os ratos receberam uma injeção intra-articular de carragenina diluída em solução fisiológica 0,9 % (300  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ /articulação); 72 horas após a carragenina, os ratos receberam uma segunda injeção, na mesma articulação pré-tratada com carragenina, de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) diluído em solução fisiológica 0,9 %. Antes de quaisquer injeções, a articulação foi previamente depilada e tratada com solução antiséptica de iodo-polvidine (PVP-I, 10 %). As injeções foram realizadas sem anestesia e, para evitar o estresse, os ratos foram gentilmente contidos com auxílio de um cone de borracha macio apenas pelo tempo necessário para a realização da injeção.

## 3.4 Testes comportamentais

### 3.4.1 Teste algométrico

A nocicepção articular foi avaliada através do teste de incapacitação articular previamente descrito por Tonussi e Ferreira [181]. Uma das vantagens deste teste comportamental é que a quantificação da incapacitação articular independe do experimentador, pois é realizada por um sistema de registro computadorizado. Assim, os ratos são submetidos a deambulação em um cilindro de aço inox (30 cm de diâmetro), giratório (velocidade constante de 3 r.p.m.) pelo período de 1 minuto (Figura 3.1 a). Para que um computador registre a incapacitação articular, uma sapatilha metálica é acoplada em cada uma das patas traseiras do animal, mas apenas uma delas (a direita) é conectada ao computador através de um fio condutor (Figura 3.1 b). Assim, o computador registra o tempo total que aquela pata fica sem tocar a superfície do cilindro durante o período de 1 minuto, o que é denominado de tempo de elevação da pata (TEP; segundos) e constitui a medida de incapacitação articular. Imediatamente antes da administração do LPS, o TEP dos ratos varia entre 10 e 15 segundos (TEP basal). Observa-se um aumento do TEP apenas na pata cuja articulação fêmuro-tibial recebe a injeção de carragenina/LPS [20]. Além disso, apenas agentes que promovem ativação dos nociceptores articulares são capazes de induzir a incapacitação articular. Por outro lado, substâncias que causam sensibilização dos nociceptores, como a prostaglandina E2, não promovem incapacitação articular [181]. A sapatilha, por si só, também não altera o TEP dos animais [181]. O TEP é avaliado imediatamente antes da injeção de LPS (tempo=0) e subsequentemente a cada hora por um período



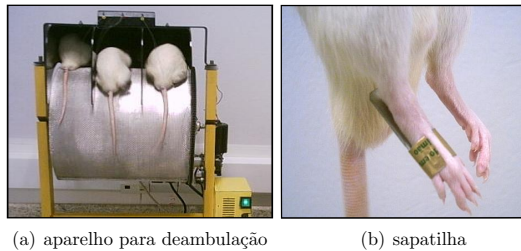


Figura 3.1: (a) Aparelho para avaliação da incapacitação articular. Um cilindro em rotação constante permite a deambulação dos ratos e o registro do tempo de elevação da pata (TEP), ou seja, a medida da incapacitação articular; (b) Foto ilustrativa de uma sapatilha metálica acoplada à pata do rato.

de 6 horas (tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). No dia anterior a cada experimento, os animais são ambientados e treinados no sistema de registro de incapacitação articular a fim de aprenderem a deambular sem cair do cilindro e a se adaptarem ao uso das sapatilhas.

### 3.4.2 Mensuração do edema articular

O edema articular induzido pela injeção de carragenina/LPS foi quantificado através da medida do diâmetro da articulação fêmuro-tibial (eixo médio-lateral), com auxílio de um paquímetro não digital (Figura 3.2). As medidas foram realizadas ime-



Figura 3.2: Foto ilustrativa da medida do diâmetro articular com auxílio de um paquímetro não digital.

diatamente após cada registro do tempo de elevação da pata (TEP), ou seja, a cada hora por um período de 6 horas (tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). A medida basal do diâmetro articular (tempo=0) foi realizada imediatamente antes da injeção de LPS. Para isso, os ratos foram imobilizados em um cone se borracha macio apenas pelo

período necessário para a medida do diâmetro articular. Os dados são apresentados como a diferença entre o diâmetro articular mensurado imediatamente antes da injeção intra-articular de LPS e as medidas subsequentes obtidas ao longo de 6 horas de avaliação.

## 3.5 Métodos

### 3.5.1 Injeção intratecal

A injeção de fármacos pela via intratecal foi realizada segundo o método descrito por Mestre e colaboradores [113]. Para a realização das injeções, os animais foram anestesiados com isoflurano (2 % em oxigênio hospitalar). Uma agulha (BD Ultra Fine; comprimento: 12,7 mm; calibre: 0,33 mm ou 29 Gauge) foi cuidadosamente inserida perpendicularmente no espaço intervertebral L5 e L6 até atingir o espaço subaracnóide (Figura 3.3). Um movimento abrupto da cauda do rato foi observado quando a agulha entrou no espaço subaracnóide, o que é denominado de *flick* da cauda e utilizado como indicador de sucesso na punção. Os ratos não apresentaram nenhum outro comportamento ou sinal de dor durante a injeção e no período de recuperação da anestesia. O volume de líquido injetado não excedeu 10  $\mu$ l. A agulha foi mantida por 5 segundos no local a fim de evitar refluxo do líquido injetado.

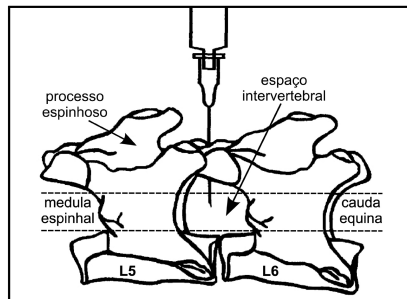


Figura 3.3: Figura ilustrativa da injeção intratecal. O diagrama mostra o local de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6. Adaptado de [113].

### 3.5.2 Imunohistoquímica

O estado de ativação dos astrócitos e da microglia no corno dorsal da medula espinhal dos ratos foi caracterizado através de técnica de imunohistoquímica. Após 6 horas de avaliação da incapacitação e do edema articular, os ratos foram anestesiados

com hidrato de cloral (15 %; 0,5 g/kg; i.p.) e perfundidos pela via transcardíaca com PBS (0,1 M; pH 7,4; 300 ml), seguido de solução de paraformaldeído (PFA 4 %; pH 7,4; 500 ml). Após a perfusão, o segmento L4-L5 da medula espinhal foi removido, pós-fixado em PFA 4 % por 4 horas e subsequentemente crioprotectado em solução de sacarose (30 %; pH 7,4) por 12 horas a 4 °C. Após, a medula foi congelada em meio específico para congelamento (O.C.T.) e armazenada a -80 °C até o uso. Os blocos contendo as medulas congeladas foram cortados a 12  $\mu\text{m}$  de espessura ( $n=6-8$  cortes/rato) com auxílio de um criostato. Imediatamente após, os cortes foram montadas em lâminas de vidro limpas e previamente gelatinizadas com gelatina porcina (1 %; pH 7,4). Subsequentemente, os cortes de medula foram processadas para imunohistoquímica seguindo os seguintes passos: (1) lavagem com PBS (3x 5 minutos); (2) incubação em temperatura ambiente com Triton X-100 0,1 % por 30 minutos; (3) incubação em temperatura ambiente com soro fetal bovino (5 %) e albumina (1 %) para bloqueio dos sítios inespecíficos, sendo que ambos foram diluídos em PBS (pH 7,4) e a incubação perdurou por 1 hora; (4) incubação com os anticorpos primários anti-GFAP (diluição 1:500) e anti-CD 11b/c (diluição 1:200) por 12 horas a 4 °C; (5) lavagem com PBS (3x 5 minutos); (6) incubação com os anticorpos secundários FITC (1:100) e Alexa Fluor 546 (1:500) por 2 horas em temperatura ambiente. Após as incubações, os cortes de medula foram lavados novamente com PBS (3x 5 minutos), montados com glicerina tamponada (pH 9) e lamínula limpa, e visualizados em microscópio de fluorescência equipado com câmera digital para captura das imagens.

Para minimizar uma possível variação na imunohistoquímica realizada em dias distintos, amostras de medula de ratos que recebem diferentes tratamentos foram processadas simultaneamente. Além disso, amostras incubadas apenas com os anticorpos primários foram utilizadas para verificar se o tecido apresentava autofluorescência. Não observou-se autofluorescência no tecido utilizado neste estudo. Amostras incubadas apenas com os anticorpos secundários foram utilizadas como controle negativo em todos os experimentos. Amostras com marcação simples, ou seja, contendo apenas anti-GFAP/FITC ou apenas anti-CD 11b/c/Alexa Fluor 546 foram utilizadas para determinar se haveria interferência entre os fluoróforos (*bleed-through* ou *crossover*) devido a alguma falha na separação espectrofotométrica pelos filtros do microscópio utilizado na captura das imagens. O *bleed-through* ou *crossover* foi detectado e corrigido durante a análise das imagens utilizando o software Image J [143].

### 3.5.3 Análise das imagens fluorescentes

Os principais passos na análise de imagens fluorescentes são a escolha e o preparo do equipamento de captura das imagens, a captura, o armazenamento e a seleção e quantificação de objetos nas imagens [127]. Alguns problemas como o ruído emitido pelo sistema de captura, a iluminação não homogênea e a interferência entre fluoróforos devem ser corrigidos antes da análise das imagens.

### 3.5.3.1 Correção de interferentes nas imagens digitais

(a) **Ruído.** A imagem digital é formada por pixels organizados em uma estrutura bidimensional cuja intensidade é variável. Por exemplo, uma imagem 12 bit apresenta de 0 a 4096 intensidades distintas na escala do cinza. As imagens produzidas por câmeras digitais podem apresentar uma variação aleatória do brilho ou da informação da cor de cada pixel, o que é denominado de ruído (Figura 3.4 a). Fatores que contribuem para a produção de ruído incluem o tempo de exposição da imagem e a temperatura do equipamento de captura, os quais geram o ruído de leitura e o ruído térmico, respectivamente [155]. Quanto maior o tempo de exposição e a temperatura do equipamento, maior será o ruído. A fim de eliminar estes interferentes, selecionou-se o melhor tempo de exposição para a captura das imagens e controlou-se a temperatura da sala do microscópio (20 °C) durante todo o experimento, já que não se dispunha de uma câmera CCD refrigerada. Mesmo com a adoção destes procedimentos, as imagens ainda apresentavam ruído remanescente. Sendo assim, os valores médios do ruído de leitura mais o ruído térmico foram eliminados das imagens teste utilizando-se uma imagem de referência contendo apenas o ruído. A imagem de referência foi obtida sem a excitação ultravioleta, a cada 30 minutos do experimento e com o mesmo tempo de exposição usado para as imagens teste. Desta forma, a imagem de referência é formada pela quantidade de sinal produzido pelo detector na ausência de incidência de luz (*dark current*). Durante a análise quantitativa das imagens fluorescentes, subtraiu-se a imagem de referência contendo o ruído de todas as imagens teste, obtendo-se, assim, a imagem final livre de ruído.

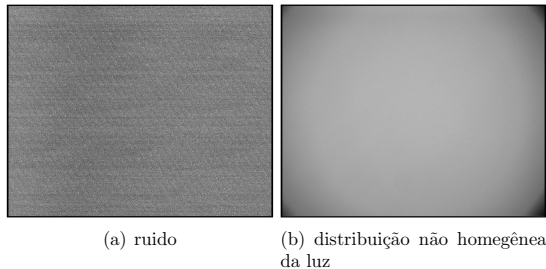


Figura 3.4: (a) Ruído produzido pela câmera digital utilizada na captura das imagens fluorescentes; (b) distribuição não homogênea da luz.

(b) **Iluminação não homogênea.** Um dos problemas mais comuns, independente do tipo de câmera e microscópio utilizados na captura de imagens, é a distribuição não homogênea da luz na imagem, o que é também conhecido como sombreamento (*shading* ou *flat field*) [99] (Figura 3.4, b). Variações pixel-a-pixel na sensibilidade

do detector e/ou distorções na trajetória óptica são os principais responsáveis pelo aparecimento deste tipo de artefato em imagens 2-D. Frequentemente, a iluminação não homogênea é visualizada apenas quando o brilho e o contraste da imagem são alterados em um software de edição de imagens. A correção deste artefato (*flat field correction*) [194] é necessária para melhorar esteticamente as imagens e, principalmente, a qualidade das imagens digitais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas. A fim de eliminar este artefato, imagens de uma lâmina fluorescente de referência (Chroma, Rockingham, USA), a qual possui fluorescência perfeitamente homogênea, foram capturadas a cada 30 minutos do experimento e com o mesmo tempo de exposição usado para as imagens teste. Durante a análise das imagens, subtraiu-se a imagem de referência contendo o ruído, como mencionado anteriormente, e imediatamente após, dividiu-se pixel por pixel a imagem teste pela imagem fluorescente de referência. Tanto a imagem de referência contendo o ruído quanto a imagem fluorescente de referência foram capturadas toda vez que houve mudança da objetiva ou dos parâmetros de capturas das imagens, por exemplo, tempo de exposição e resolução.

**(c) Interferência entre fluoróforos.** A interferência entre fluoróforos (*bleed-through* ou *crossover*) é uma falha na separação espectrofotométrica pelos filtros do microscópio utilizados na captura das imagens marcadas com dois ou mais fluoróforos. Os fluoróforos são excitados pela luz ultravioleta e apresentam emissão de fluorescência em um determinado comprimento de onda. No caso de dois fluoróforos (A e B), frequentemente, a emissão do fluoróforo A é parcialmente detectada pelo filtro destinado a detectar o fluoróforo B, ocorrendo a sobreposição ou cruzamento entre as curvas de emissão dos dois fluoróforos (Figura 3.5, C). O *bleed-through* ou *crossover* foi detectado e corrigido durante a análise das imagens utilizando o software Image J [143]. Para isso, amostras com marcação simples, ou seja, contendo apenas anti-GFAP/FITC ou apenas anti-CD 11b/c/Alexa Fluor 546 foram preparadas e as imagens capturadas para posterior correção da interferência entre os fluoróforos.

### 3.5.3.2 Captura e armazenamento das imagens

As imagens foram capturadas com microscópio de fluorescência (Olympus, modelo BX-41) equipado com filtros para os fluoróforos FITC e Alexa Fluor 546 (U-MWG2 e U-MWB2, respectivamente; Olympus), câmera digital (3,3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging<sup>TM</sup>) e um software de aquisição das imagens (Qcapture Pro 5.1, Qimaging<sup>TM</sup>). Os cortes de medula espinhal foram visualizados com objetiva de 10x e as imagens da região de interesse (corno dorsal ipsilateral) foram capturadas em escala de cinza (12-bit) e resolução de 2048x1536 (3 megapixels).

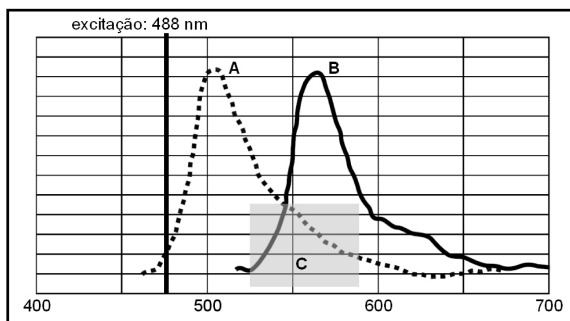


Figura 3.5: Interferência entre os fluoróforos A e B. A, fluoróforo com emissão em 495-521 nm; B, fluoróforo com emissão em 556-573 nm; C, região onde a emissão do fluoróforo A é parcialmente detectada pelo filtro destinado a detectar apenas o fluoróforo B e vice-versa.

### 3.5.4 Seleção da região de interesse na medula espinhal

A análise quantitativa foi realizada em uma região de interesse (RI) pré-selecionada no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal (ME) dos ratos (RI-ME, Figura 3.6). A seleção da região de interesse foi baseada na técnica previamente descrita por Fu

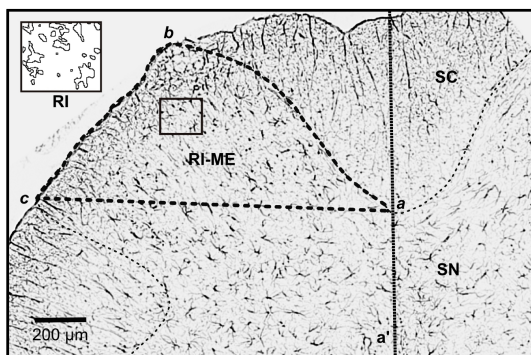


Figura 3.6: A área delimitada (a, b, c) representa a região de interesse (RI) pré-selecionada no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal (ME) utilizada para a análise quantitativa. RI, porção representativa da RI-ME contendo a delimitação do tecido imunoreativo a ser quantificado. SC, substância cinzenta; SN, substância negra.

e colaboradores [48]. Inicialmente, realizou-se o ajuste do brilho e do contraste da imagem a fim de visualizar a borda entre as substâncias negra e cinzenta. Em seguida, definiu-se três pontos referência a serem utilizados para delimitar a região de interesse, os pontos  $a$ ,  $b$  e  $c$ . Estes pontos foram definidos com base no estudo anatômico da medula espinhal em ratos [122]. Assim, uma linha vertical foi traçada perpendicularmente ao canal central da medula espinhal. O ponto  $a$  está localizado na intersecção entre as substâncias branca e cinzenta e a linha de referência; os pontos  $b$  e  $c$  estão localizados na borda externa do corno dorsal. Uma linha reta foi traçada conectando os pontos  $b$  e  $c$ . O mesmo critério foi aplicado para todos os cortes utilizados na análise quantitativa.

### 3.5.5 Análise quantitativa

A quantificação do número de astrócitos e microglia apresenta algumas limitações devido à sua morfologia complexa. Quando ativadas, estas células hipertrofiam formando aglomerados que dificultam a quantificação das células individualmente. Uma alternativa é a determinação da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo, uma técnica adaptada de Popovich e colaboradores [137]. A hipertrofia que ocorre quando os astrócitos e a microglia são ativados é detectada através de um aumento na área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo em uma determinada região de interesse. Porém, a medida da área proporcional não reflete necessariamente mudanças no número de células, mas na magnitude do infiltrado celular e/ou estado de ativação de células específicas, como os astrócitos e a microglia [31]. Assim, o aumento na área proporcional indica uma resposta celular inflamatória de maior magnitude.

Inicialmente, com auxílio do software Image J [143], selecionou-se a região de interesse na medula espinhal (RI-ME), conforme detalhado anteriormente. Em seguida, o tecido imunoreativo dentro da região de interesse foi selecionado e de região imunoreativa, RI (Figura 3.6). Para isso, foram determinadas intensidades de fluorescência mínima e máxima que permitissem a seleção apenas do tecido imunoreativo, ou seja, o sinal fluorescente inespecífico (*background*) não foi utilizado para a estimativa da área proporcional. Para a estimativa da área proporcional, a área total ocupada pelo tecido imunoreativo (RI) foi dividida pela área da região de interesse pré-selecionadas na medula espinhal (RI-ME). Este cálculo foi realizado considerando que as regiões de interesse tinham tamanhos ligeiramente distintos. Sendo assim, obteve-se uma área proporcional imunoreativa (API) para cada corte individualmente, expresso como porcentagem da área total do RI-ME. A seguir, calculou-se a média da área proporcional imunoreativa para cada grupo experimental. Os dados foram representados como a média  $\pm$  E.P.M. da área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 em unidades arbitrárias. Para melhor visualização das diferenças, os dados foram normalizados. Selecionou-se o grupo que apresentava o maior valor de área proporcional imunoreativa. Os grupos que apresentavam valor de área proporcional imunoreativa menor foram divididos pelo maior. Assim, o grupo cujo valor era maior ficou igual a 1 e os

demais proporcionais. Esta normalização foi realizada apenas para a melhor visualização das diferenças, sendo que a análise estatística foi realizada sempre com os dados brutos.

### 3.5.6 Contagem de leucócitos no fluido sinovial

A quantificação de leucócitos no fluido sinovial foi realizada segundo a técnica previamente publicada por Bressan e colaboradores [20, 21]. Seis horas após a injeção de LPS, coletou-se 5  $\mu$ l do fluido sinovial da articulação inflamada para o preparo de uma lâmina de esfregaço, a qual foi posteriormente corada com May-Grünwald-Giemsa. Estas lâminas foram utilizadas para contagem diferencial de leucócitos (MON, mononucleares e PMN, polimorfonucleares) em microscópio óptico e objetiva de 100x (Figura 3.7). A seguir, a cavidade sinovial foi lavada com 100  $\mu$ l de solução fisiológica 0,9 % contendo EDTA 5 %. Este lavado sinovial foi diluído em líquido de Turk (1:20) por 5 minutos e uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem total de leucócitos (TL; células/mm<sup>2</sup>).

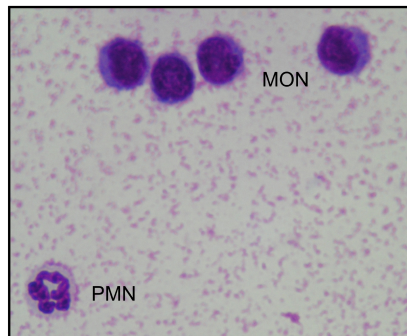


Figura 3.7: Leucócitos presentes no fluido sinovial de ratos. MON, mononucleares e PMN, polimorfonucleares.

## 3.6 Protocolo experimental

O esquema a seguir (Figura 3.8) mostra um resumo do protocolo experimental adotado no presente estudo.



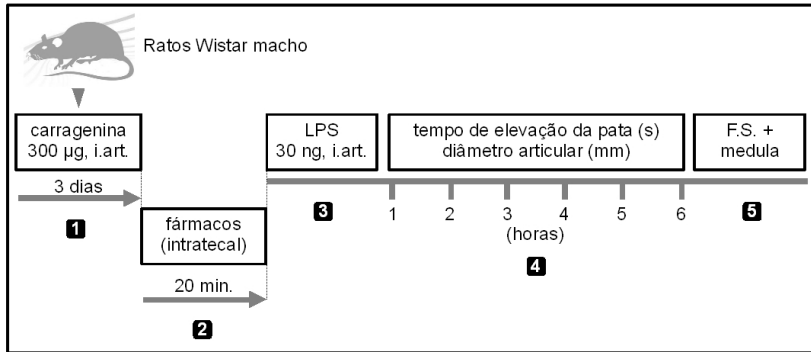


Figura 3.8: Protocolo experimental. (1) ratos Wistar macho naïve receberam, inicialmente, uma injeção intra-articular de carragenina. O tratamento com diferentes fármacos, pela via intratecal, foi realizado 20 minutos (2) antes da injeção intra-articular de LPS (3). Uma hora após o LPS, iniciou-se as medidas do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular (4). Após 6 horas de avaliação do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular, coletou-se o fluido sinovial (FS) seguido de perfusão transcardíaca, procedimento necessário para a coleta de um segmento da medula espinhal utilizado nos ensaios de imunohistoquímica.

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 3.0<sup>®</sup>. Para análise das curvas de incapacitação e edema articular, utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas. Assim, apenas as variabilidades entre os diferentes grupos experimentais foi avaliada. Realizou-se a comparação das curvas, como um todo, entre os diferentes grupos experimentais. O relevante neste estudo foi verificar o efeito dos fármacos sobre a intensidade da nocicepção ou edema durante um determinado período de tempo como um todo. Desta forma, considerou-se apenas uma variável, o que justifica a escolha do método estatístico. No caso da contagem de leucócitos sinoviais e da área proporcional imunoreativa utilizou-se ANOVA de uma via para medidas simples. O pós teste de Dunnett foi aplicado sempre que a diferença de  $p < 0,05$  foi detectada. Os grupos experimentais foram compostos de 6 animais e os dados foram representados como a média  $\pm$  E.P.M.



## 4 Resultados

### 4.1 Curva dose-resposta dos efeitos do LPS na incapacitação e edema articular em ratos sensibilizados com carragenina.

Uma curva dose-resposta de LPS foi realizada a fim de escolher a dose submáxima de LPS que permitisse observar tanto potencialização quanto inibição da incapacitação e do edema articular após o tratamento dos ratos com diferentes fármacos. Setenta e duas horas após sensibilização com carragenina ( $300 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ /articulação), os ratos receberam diferentes concentrações de LPS intra-articular (0,003; 0,03; 30 ou 1000 ng) (Figura 4.1). Assim, as doses escolhidas foram de 0,03 e 30 ng/ $50 \mu\text{l}$ .

Dentre as características deste modelo, cabe salientar que apenas a combinação carragenina/LPS é capaz de produzir um processo inflamatório articular em que é possível avaliar a incapacitação e o edema articular até 6 horas após a injeção intra-articular de LPS. Duas injeções de solução fisiológica 0,9 %, com intervalo de 72 horas ou a combinação de carragenina ( $300 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ /articulação)/solução fisiológica 0,9 %, também com intervalo de 72 horas, não promovem incapacitação e edema articular comparáveis ao que é observado quando o estímulo é carragenina/LPS (Figura 4.2). Além disso, a quantidade de LPS utilizada nos experimentos não promove nocicepção e edema articular em articulações naïve comparável ao que é observado quando ocorre a pré-sensibilização com LPS (Figura 4.2).

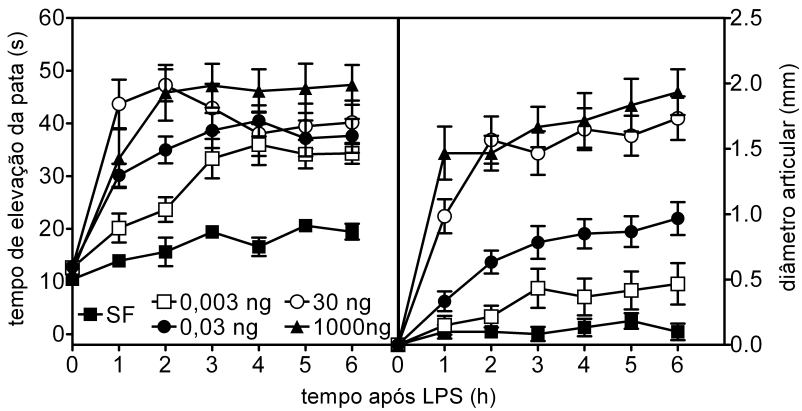


Figura 4.1: Curva dose-resposta dos efeitos do LPS na incapacitação e edema articular em ratos sensibilizados com carragenina. LPS ( $50 \mu\text{l}$ ) foi administrado por via intra-articular 72 horas após a carragenina ( $300 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (SF). O tempo zero (0 h) representa a medida basal da incapacitação e edema articular coletados imediatamente antes da injeção de LPS. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=6$ ).

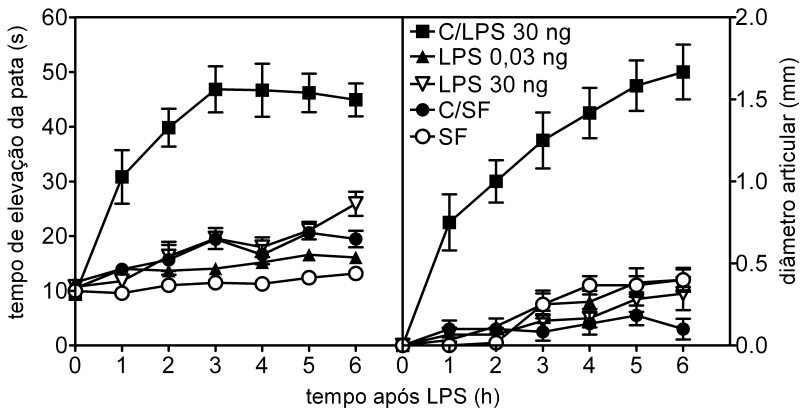


Figura 4.2: Curva de carragenina/LPS (C/LPS), somente LPS (LPS), carragenina (C/SF) ou solução fisiológica (SF) intra-articular. C/LPS, LPS (30 ng) 72 horas após carragenina (300  $\mu$ g); LPS, LPS 0,03 ou 30 ng 72 horas após solução fisiológica; C/SF, solução fisiológica (SF) 72 horas após carragenina (C, 300  $\mu$ g); SF, somente solução fisiológica (50  $\mu$ l). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6).

## 4.2 Fluorocitrato e minociclina inibem a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos por LPS.

A primeira etapa deste estudo foi avaliar o efeito dos inibidores da ativação glial (fluorocitrato e minociclina), administrados por via intratecal, na incapacitação e no edema articular induzidos por LPS (30 ng; 50  $\mu$ l; i.art.). Em paralelo, realizou-se a contagem de leucócitos no fluido sinovial a fim de verificar uma possível influência destes inibidores sobre a migração celular na articulação. O mecanismo de ação do fluorocitrato envolve a inibição da enzima aconitase que, no ciclo de Krebs, é responsável pela conversão do acetato em glutamina, um substrato que entra especificamente nos astrócitos e microglia [58]. Já a minociclina, um derivado da tetraciclina, age especificamente na microglia e seus efeitos incluem a inibição das enzimas microglias óxido nítrico sintase induzida e enzima conversora de IL-1 $\beta$  [178]. A microglia também inibe a proliferação das células microgliais e a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) [178].

A incapacitação articular foi avaliada através do tempo de elevação da pata (TEP, s), o edema articular através do aumento do diâmetro articular (DA, mm) e o infiltrado de leucócitos no fluido sinovial através da contagem de leucócitos totais (LT/mm<sup>3</sup>), mononucleares (MON/mm<sup>3</sup>) e polimorfonucleares (PMN/mm<sup>3</sup>). As menores doses de fluorocitrato (0,3 nmol;  $p < 0,01$ ) e minociclina (6 nmol;  $p < 0,05$  e 24 nmol;  $p < 0,01$ ) reduziram significativamente o aumento do diâmetro articular induzido pelo LPS, porém sem alterar a incapacitação (Figura 4.3). Com o aumento da dose, observou-se um incremento no efeito inibitório do fluorocitrato (1 e 3 nmol;  $p < 0,01$ ) e da minociclina (50 e 100 nmol;  $p < 0,01$ ) sobre o diâmetro articular, o que foi acompanhado de uma redução significativa da incapacitação. A dose maior de fluorocitrato (3 nmol) também reduziu a quantidade de leucócitos totais, mononucleares e polimorfonucleares no fluido sinovial (Tabela 4.1). Posteriormente, a fim de verificar se os efeitos antinociceptivo e anti edematogênico do fluorocitrato e da minociclina intratecal poderiam ser resultantes da sua difusão para os tecidos periféricos, ambos foram administrados 20 minutos antes do LPS pela via intraperitoneal. Apenas as doses maiores de fluorocitrato e minociclina foram testadas considerando que estas doses foram as que promoveram efeito inibitório tanto na incapacitação quanto no diâmetro articular. Ambos, fluorocitrato e minociclina intraperitoneal não produziram efeitos significativos sobre a incapacitação e o diâmetro articular e nem sobre a migração de leucócitos (Figura 4.4), sugerindo que nestas condições experimentais não ocorreu um efeito sistêmico adicional ao efeito medular destes fármacos.

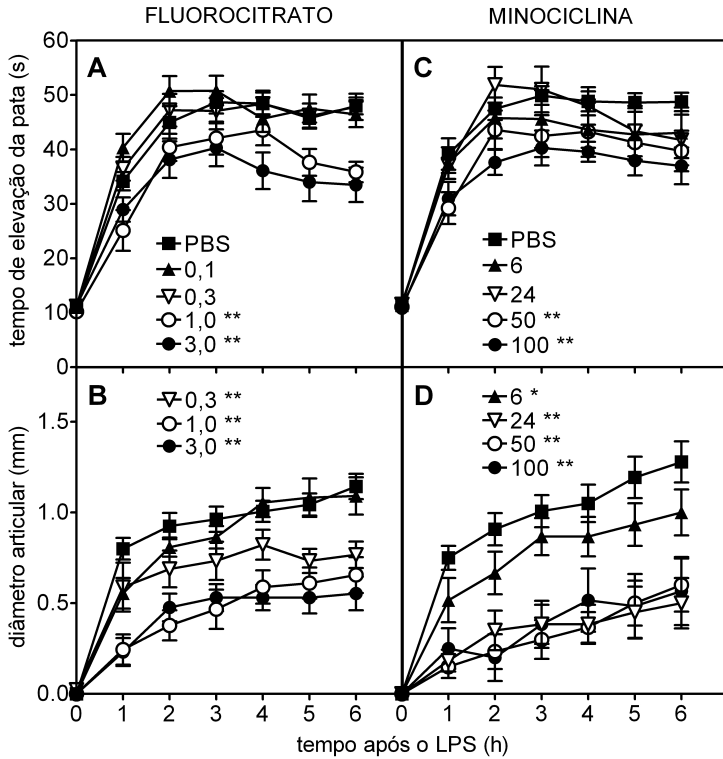


Figura 4.3: Fluorocitrato e minociclina intratecal inibem a incapacitação (A, C) e o aumento do diâmetro articular (B, D) induzidos por LPS. Fluorocitrato e minociclina, cuja dose está representada em nanomoles, foram administrados por via intratecal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett).

Tabela 4.1: Contagem de leucócitos no fluido sinovial 6 horas após a injeção intra-articular de LPS. Os dados são apresentados como a contagem total de leucócitos (LT) e a diferença percentual em relação ao grupo controle. MON, mononucleares; PMN, polimorfonucleares; LT, leucócitos totais; \*\*,  $p < 0,01$ .

| TRATAMENTO           | MON (%)     | PMN (%)     | LT (%)      | LT (/mm <sup>3</sup> ) |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| <b>Fluorocitrato</b> |             |             |             |                        |
| controle             |             |             |             | 7250±1184              |
| 0,1 nmol             | -11,4±14,7  | -9,8±12,0   | 1,7±13,8    | 6775±908               |
| 0,3 nmol             | -28,8±15,4  | -31,2±24,5  | -34,3±18,1  | 6760±1312              |
| 1 nmol               | -25,2±7,9   | -24,4±14,0  | -34,1±13,2  | 5770±960               |
| 3 nmol               | -37,0±6,1** | -40,2±9,6** | -34,4±7,2** | 4991±780**             |
| <b>Minociclina</b>   |             |             |             |                        |
| controle             |             |             |             | 5125±1073              |
| 6 nmol               | -15,8±14,2  | -27,7±9,9   | -21,1±8,4   | 3966±389               |
| 24 nmol              | -24,4±10,9  | -40,5±10,7  | -31,8±12,8  | 3491±453               |
| 50 nmol              | 4,9±19,3    | -51,6±13,2  | -21,1±10,3  | 4041±527               |
| 100 nmol             | -2,5±12,6   | -32,3±19,0  | -16,2±11,2  | 4291±576               |



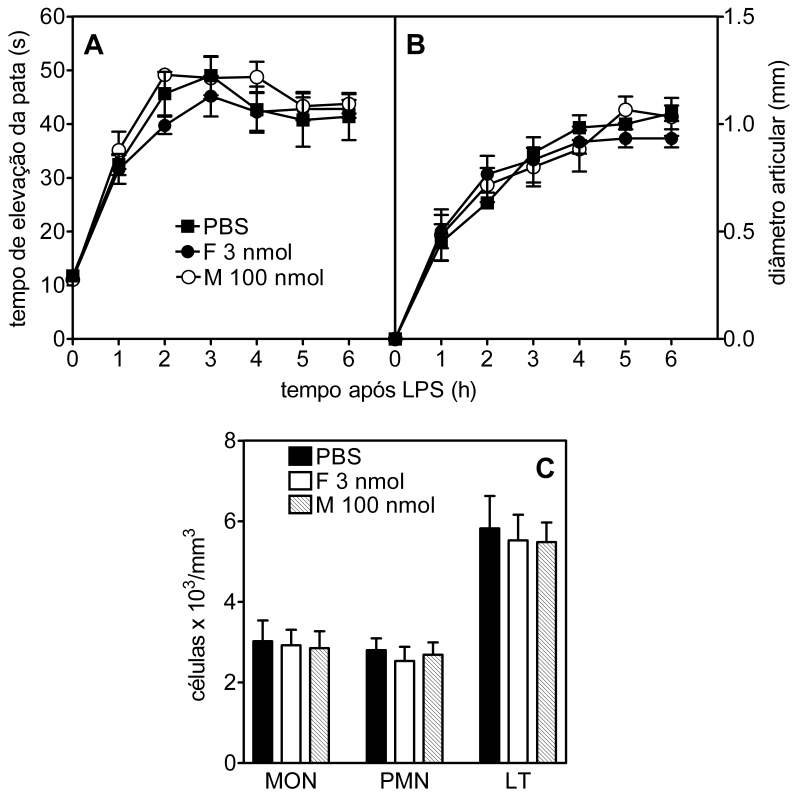


Figura 4.4: Fluorocitrato (F) e minociclina (M) intraperitoneal não alteram a incapacitação (A), o aumento do diâmetro articular (B) e a migração de leucócitos (C) induzidos por LPS. Fluorocitrato e minociclina foram administrados por via intraperitoneal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (i.p.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). Não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

### 4.3 Efeito da co-administração de furosemida com fluorocitrato ou minociclina na incapacitação, diâmetro articular e migração de leucócitos.

Uma possível explicação para o efeito antiedematogênico significativo do fluorocitrato e da minociclina é a inibição do reflexo da raiz dorsal. Para testar esta hipótese, utilizou-se a furosemida, uma ferramenta farmacológica reconhecida por inibir o co-transportador neuronal NKCC1 [196] e consequentemente modular o reflexo da raiz dorsal [195]. Inicialmente, realizou-se uma curva dose-resposta dos efeitos da furosemida intratecal (3, 10 e 30  $\mu\text{g}$ ) para avaliar seu perfil de ação no modelo de artrite induzida por LPS e para escolher a dose mais apropriada a ser administrada com fluorocitrato e minociclina. Furosemida inibiu de maneira dose-dependente a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos pelo LPS (Figura 4.5). A maior dose de furosemida (furo; 30  $\mu\text{g}$ ) também inibiu a migração de leucócitos totais (controle:  $10266 \pm 405$ ; furo:  $7091 \pm 785$  células/ $\text{mm}^3$ ,  $p < 0,05$ ) e mononucleares (controle:  $6604 \pm 185$ ; furo:  $4470 \pm 451$  células/ $\text{mm}^3$ ,  $p < 0,05$ ). A dose de 10  $\mu\text{g}$  de furosemida foi utilizada para co-administração com fluorocitrato e minociclina pois foi a menor dose efetiva tanto na inibição da incapacitação quanto do diâmetro articular.

Na próxima etapa do estudo, furosemida (10  $\mu\text{g}$ ) foi administrada 5 minutos antes da injeção intratecal de fluorocitrato (3 nmol) ou minociclina (100 nmol). Os grupos controle positivo receberam fluorocitrato ou minociclina intratecal co-administrados com PBS (10  $\mu\text{l}$ , i.t.). Tanto fluorocitrato quanto minociclina reproduziram os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico observados em experimentos anteriores. A co-administração de furosemida com fluorocitrato ou minociclina não produziu efeito inibitório adicional na incapacitação e nem no diâmetro articular (Figura 4.6). O efeito inibitório do fluorocitrato na migração de leucócitos também não foi alterado quando co-administrado com PBS (Figura 4.7).

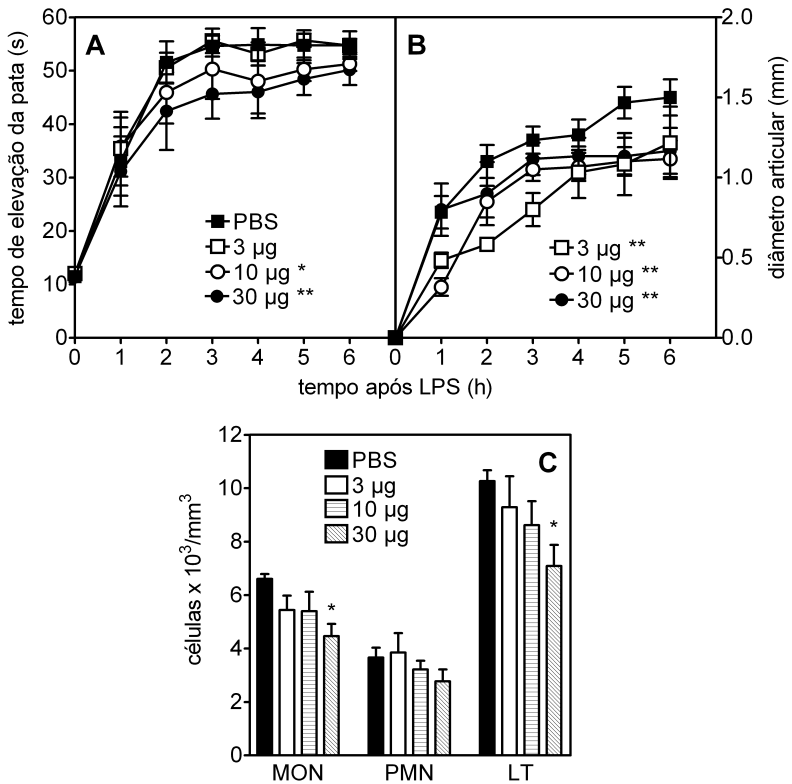


Figura 4.5: Furosemida intratecal inibe a incapacitação (A), o aumento do diâmetro articular (B) e a migração de leucócitos (C) induzidos por LPS. Furosemida intratecal foi administrada 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato de sódio 1,29 % (pH 7,8; 10 µl, i.t.). Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

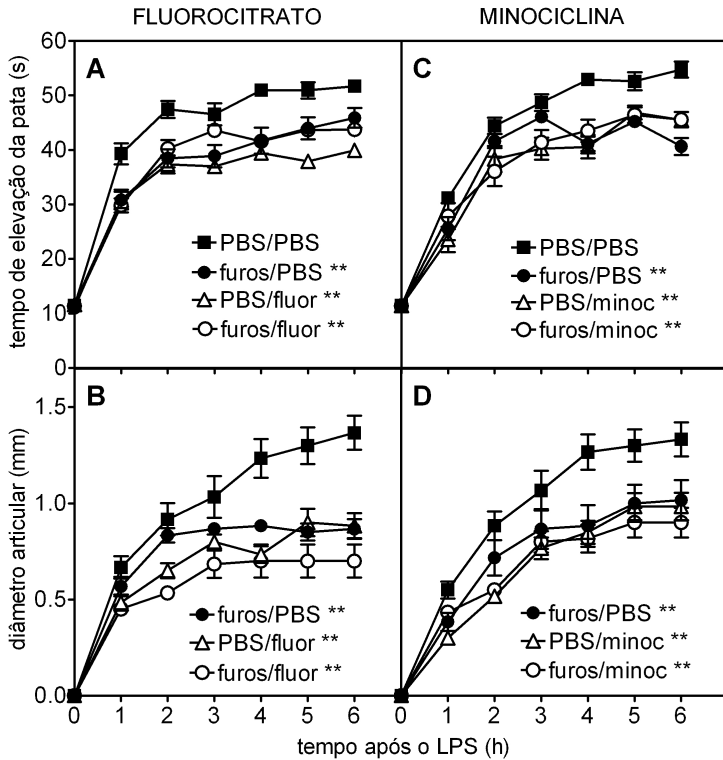


Figura 4.6: Furosemda não alterou o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do fluorocitrato (A, B) e da minociclina (C, D). Furosemda (furos; 10  $\mu$ g, i.t.) foi administrada 5 minutos antes do fluorocitrato ou da minociclina. Fluorocitrato (fluor, 3 nmol) ou minociclina (minoc, 100 nmol) foram administrados 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato de sódio 1,29 %, pH 7,8 ou PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \*\* representa a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,01$  (Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett).

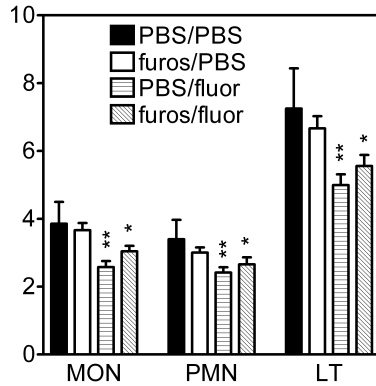


Figura 4.7: Furosemida não altera o efeito do inibitório do fluorocitrato sobre a migração de leucócitos. Furosemida (furo; 10  $\mu\text{g}$ , i.t.) foi administrada 5 minutos antes do fluorocitrato. Fluorocitrato (fluor, 3 nmol) foi administrado 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu\text{l}$ , i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

#### **4.4 Aminoglutetimida não altera os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina.**

Eventos que podem modular o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal potencialmente interferem com a resposta inflamatória [88, 112]. A fim de verificar se o efeito antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina estaria sob influência de um aumento nos níveis de corticóides endógenos, administrou-se o inibidor da síntese de corticóides, a aminoglutetimida (50 mg/kg, oral) 60 minutos antes da injeção intratecal de fluorocitrato (0,3 nmol) ou minociclina (24 nmol). Os controles incluíram os grupos que foram pré-tratados com água destilada por via oral e posteriormente receberam fluorocitrato (fluor) ou minociclina (minoc) intratecal e o grupo que recebeu aminoglutetimida (AG) por via oral e PBS intratecal. O pré-tratamento com aminoglutetimida não alterou a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e nem a migração de leucócitos (Figura 4.8). Estes dados sugerem que o efeito antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina não é influenciado por um possível aumento nos níveis de corticóides endógenos.

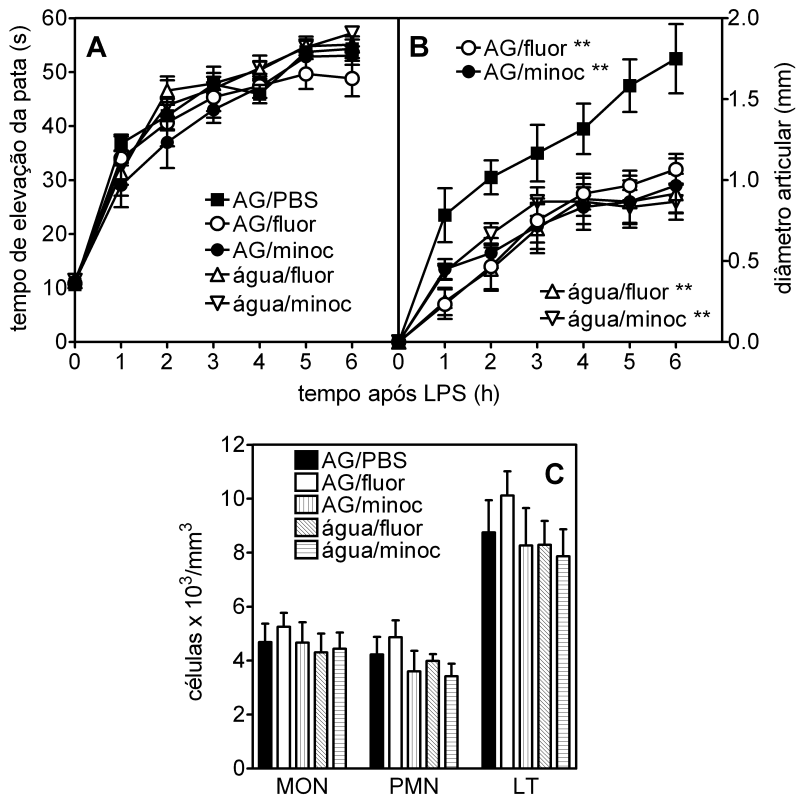


Figura 4.8: Aminoglutetimida não altera o efeito antinociceptivo (A) e anti edematogênico (B) do fluorocitrato e da minociclina e não possui efeito sobre a migração de leucócitos (C). A aminoglutetimida (AG; 50 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 minutos antes do fluorocitrato ou da minociclina. fluorocitrato e minociclina foram administrados 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). Os controles incluíram os grupos que foram pré-tratados com água destilada por via oral e posteriormente receberam fluorocitrato (fluor; 0,3 nmol, i.t.) ou minociclina (minoc; 24 nmol, i.t.) e o grupo que recebeu aminoglutetimida (AG) por via oral e PBS intratecal. Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). Não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

## 4.5 LPS intra-articular aumenta a imunoreatividade do GFAP e CD11b/c no corno dorsal da medula espinhal de ratos.

O estado de ativação dos astrócitos e da microglia foi avaliado 6 horas após a injeção intra-articular de LPS através de imunofluorescência dupla. Os cortes de medula espinhal foram incubados com os anticorpos anti-GFAP e OX-42, específicos para a marcação de astrócitos e microglia, respectivamente. A análise quantitativa foi realizada através da determinação da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo. Os ratos naïve apresentaram imunoreatividade basal para GFAP e OX-42 distribuída de maneira homogênea na medula espinhal em ambas as substâncias, branca e cinzenta (Figura 4.9). Tanto os astrócitos quanto a microglia apresentaram ramificações longas e finas distribuídas aleatoriamente em todas as direções a partir do citoplasma perinuclear, caracterizando um estado de repouso ou de ativação basal destas células (Figura 4.10 A, C). Em resposta à injeção intra-articular de LPS, a glia ramificada transformou-se em células ativadas caracterizadas por hipertrofia e retração dos processos celulares. A microglia adquiriu forma arredondada ou amebóide, uma alteração morfológica que indica que estas células estão no estado reativo ou fagocítico (Figura 4.10 B, D). A hipertrofia dos astrócitos e da microglia resultou em um aumento significativo da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo (API), tanto para o GFAP (naïve:  $0,56 \pm 0,08$ ; LPS:  $1,00 \pm 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) quanto para o OX-42 (naïve:  $0,72 \pm 0,05$ ; LPS:  $1,00 \pm 0,04$ ;  $p < 0,001$ ) no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal (Figura 4.11 A, B). Curiosamente, o LPS também promoveu aumento da área proporcional no lado contralateral da medula espinhal (GFAP:  $p < 0,001$ ; OX-42:  $p < 0,01$ ), porém este incremento na ativação dos astrócitos e da microglia foi menor que o observado no lado ipsilateral (GFAP - LPS ipsi x contralateral:  $p < 0,001$ ; OX-42 - LPS ipsi x contralateral:  $p < 0,001$ ) (Figura 4.11 A, B). Não houve diferença significativa na área proporcional quando comparados os lados contra e ipsilateral dos ratos naïve. Alterações na área proporcional imunoreativa dos grupos naïve e carragenina/LPS estão ilustrados na Figura 4.12 e na Figura 4.13.



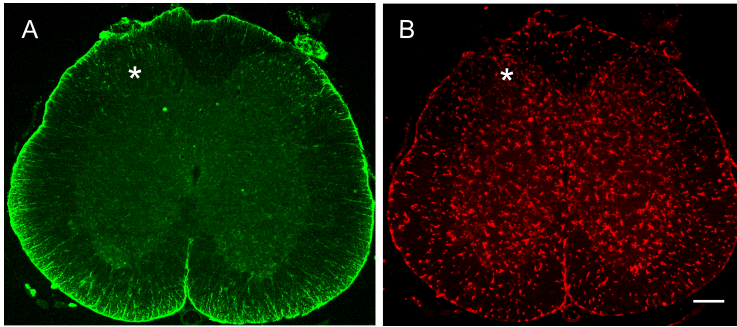


Figura 4.9: Imunoreatividade do GFAP e CD11b/c na medula espinal de ratos. A, Anti-GFAP, marcação específica para astrócitos; B, anticorpo OX-42, marcação específica para microglia; \*, corno dorsal ipsilateral da medula espinal; Escala: 200  $\mu$ m.

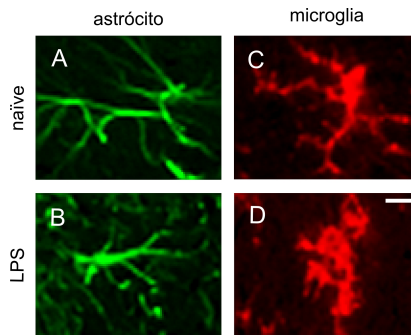


Figura 4.10: Morfologia dos astrócitos e da microglia na medula espinal de ratos naïve e após a injeção intra-articular LPS (30 ng). A, C: astrócitos e microglia ramificados, com processos celulares longos e finos; B, D: células ativadas caracterizadas morfologicamente por hipertrofia, encurtamento dos processos celulares e formato amebóide, particularmente da microglia. Escala: 10  $\mu$ m.

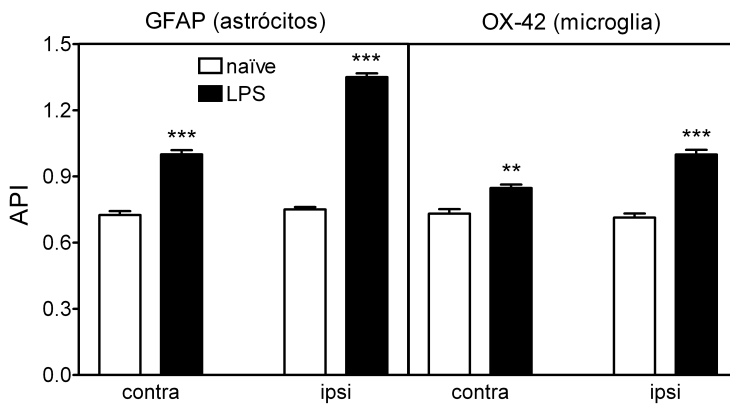


Figura 4.11: Aumento da área proporcional imunoreativa (API) ao GFAP e OX-42 ipsi e contralateral em ratos naïve, 6 horas após a injeção intra-articular LPS (30 ng). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=6-8$  cortes/rato;  $n=6$  ratos). \*\* e \*\*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente (Teste  $t$  de Student).

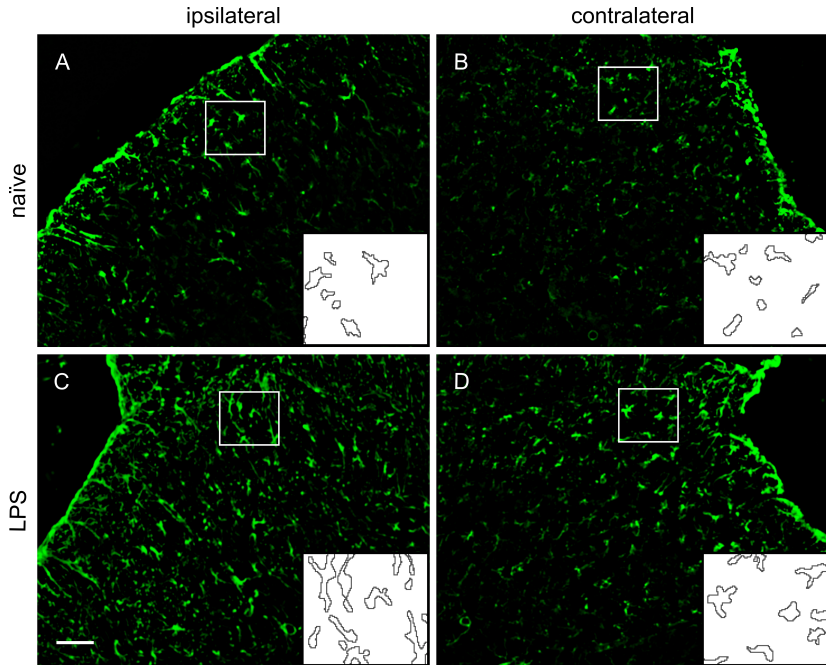


Figura 4.12: Alterações na área proporcional imunoreativa para GFAP (astrócitos) em ratos naïve e tratados com carragenina/LPS. Os painéis são imagens representativas da imunoreatividade para GFAP no corno dorsal ipsi (A, C) e contralateral (B, D) da medula espinhal (L4-L5). As inserções apresentam uma porção representativa da área proporcional imunoreativa para cada grupo. A, B: imunoreatividade basal para o GFAP em ratos naïve; C, D: aumento da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP em ratos que receberam injeção intra-articular de carragenina/LPS. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

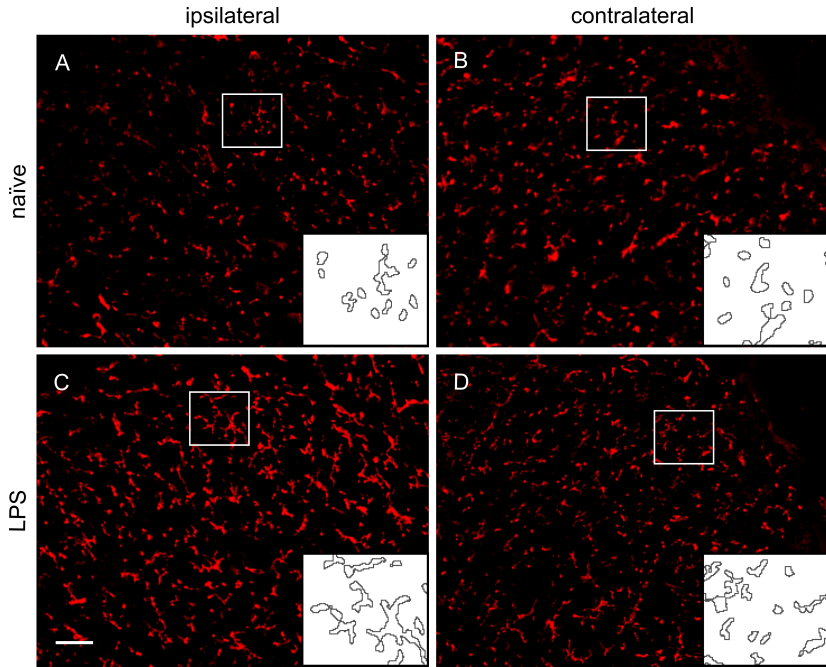


Figura 4.13: Alterações na área proporcional imunoreativa para OX-42 (microglia) em ratos naïve e tratados com carragenina/LPS. Os painéis são imagens representativas da imunoreatividade para OX-42 no corno dorsal ipsi (A, C) e contralateral (B, D) da medula espinhal (L4-L5). As inserções apresentam uma porção representativa da área proporcional imunoreativa para cada grupo. A, B: imunoreatividade basal para OX-42 em ratos naïve; C, D: aumento da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao OX-42 em ratos que receberam injeção intra-articular de carragenina/LPS. Escala: 100  $\mu\text{m}$ .

## **4.6 Fluorocitrato e minociclina reduzem a expressão de GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal de ratos.**

Nesta etapa do estudo avaliou-se o efeito do fluorocitrato e da minociclina na área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP e ao OX-42 parâmetro utilizado na avaliação do estado de ativação de astrócitos e da microglia, respectivamente. As mesmas doses de fluorocitrato e minociclina que promoveram inibição da incapacitação e do edema articular também promoveram redução significativa da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP ( $p < 0,01$ ) e OX-42 ( $p < 0,01$ ) (Figura 4.14). As alterações na área proporcional imunoreativa dos grupos naïve, LPS, fluorocitrato 3 nmol e minociclina 100 nmol estão ilustrados na Figura 4.15.

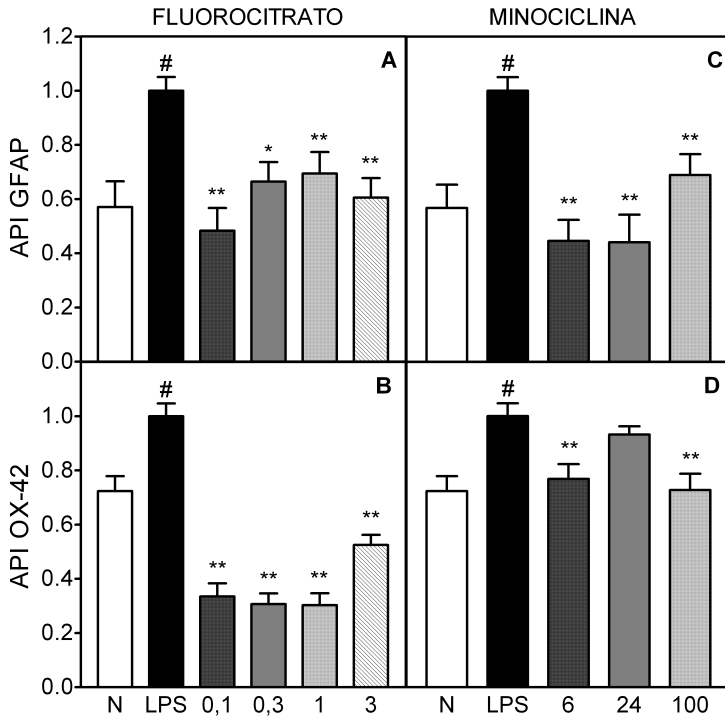


Figura 4.14: Fluorocitrato (A, B) e minociclina (C, D) reduzem a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinal. Fluorocitrato e minociclina, cuja dose está representada em nmol, foram administrados por via intratecal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle (LPS) com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente. # representa a diferença estatística entre os grupos naïve e LPS com  $p < 0,001$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

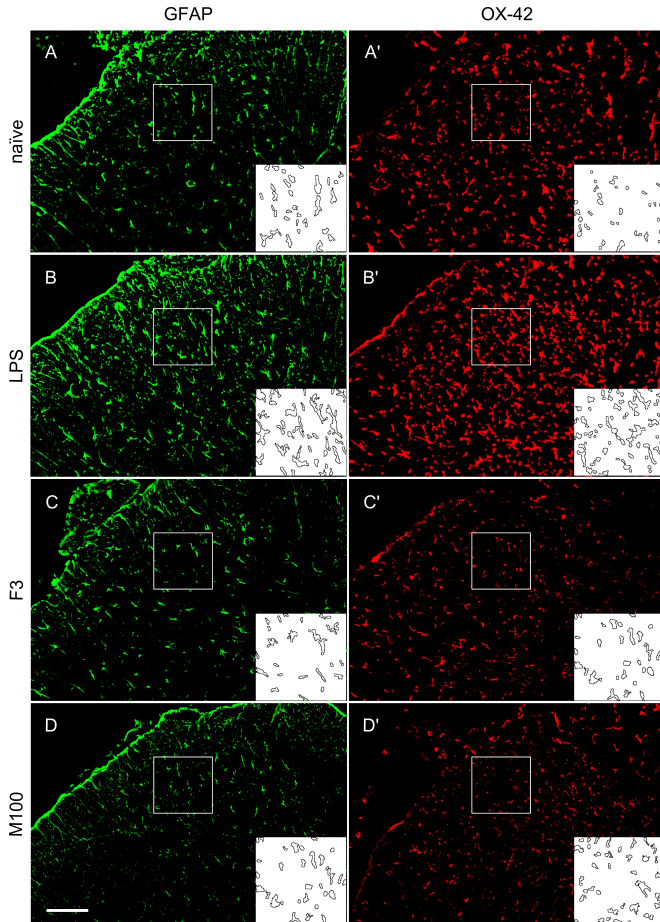


Figura 4.15: Alterações na área proporcional imunoreativa em ratos naïve, controle (LPS) e tratados com fluorocitrato (F3, 3 nmol) ou minociiclina (M100, 100 nmol). Os painéis representam a imunoreatividade para GFAP (A, B, C e D) e OX-42 (A', B', C' e D') no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal (L4-L5). As inserções apresentam uma porção representativa da área proporcional imunoreativa para cada grupo. A, A': imunoreatividade basal para GFAP e OX-42 em ratos naïve; B, B': aumento da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP e OX-42 no grupo que recebeu injeção intra-articular de LPS; C, C' e D, D': redução da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP e OX-42 nos grupos que receberam fluorocitrato ou minociiclina intratecal. Escala: 100  $\mu$ m.

## 4.7 Anti-fractalcina inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular, a migração de leucócitos no fluido sinovial e a imunoreatividade do GFAP e CD11b/c na medula espinhal.

Os resultados previamente obtidos neste estudo apontam para o envolvimento da ativação de astrócitos e microglia na geração e manutenção da nocicepção e edema articular induzidos pelo LPS. A próxima etapa foi avaliar quais substâncias poderiam estar mediando a interação neurônio-glia na medula espinhal. Estudos prévios na literatura sugerem que mediadores liberados dos neurônios na medula espinhal em resposta a estímulos periféricos como lesão e/ou inflamação de nervos podem interagir com receptores localizados nas células gliais induzindo sua ativação [193]. Dentre estas substâncias encontra-se a fractalcina, uma quimiocina expressa constitutivamente em neurônios, liberada na forma solúvel após intensa atividade neuronal [27] e que se liga à receptores exclusivamente presentes na glia [70, 186]. Sendo assim, nesta etapa do estudo verificou-se o envolvimento da fractalcina na geração e manutenção da incapacitação e do edema articular induzidos pelo LPS. Inicialmente, administrou-se o anticorpo anti-fractalcina por via tecal a fim de neutralizar a fractalcina possivelmente liberada endogenamente devido à inflamação articular induzida pelo LPS. A anti-fractalcina (aF) reduziu significativamente tanto a incapacitação/tempo de elevação da pata (TEP controle:  $44,5 \pm 2,7$  s; aF 0,1  $\mu\text{g}$ :  $43,9 \pm 4,4$  s; aF 1  $\mu\text{g}$ :  $38,2 \pm 3,2$  s,  $p < 0,01$ ) quanto o aumento do diâmetro articular (DA controle:  $0,75 \pm 0,09$  mm; aF 0,1  $\mu\text{g}$ :  $0,68 \pm 0,09$  mm; aF 1  $\mu\text{g}$ :  $0,36 \pm 0,10$  mm,  $p < 0,01$ ) induzidos pelo LPS e promoveu uma significativa redução da contagem de leucócitos no fluido sinovial mononucleares ( $p < 0,05$ ), polimorfonucleares ( $p < 0,05$ ) e leucócitos totais ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.16). Os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fractalcina intratecal foram acompanhados de uma redução significativa da área proporcional ocupada pelo tecido imunoreativo ao GFAP ( $p < 0,001$ ) e OX-42 ( $p < 0,001$ ) (Figura 4.17). Estes dados apontam para a fractalcina como sendo umas das substâncias liberadas pelos neurônios na medula espinhal em resposta à inflamação articular induzida pelo LPS que estaria contribuindo para a ativação glial.



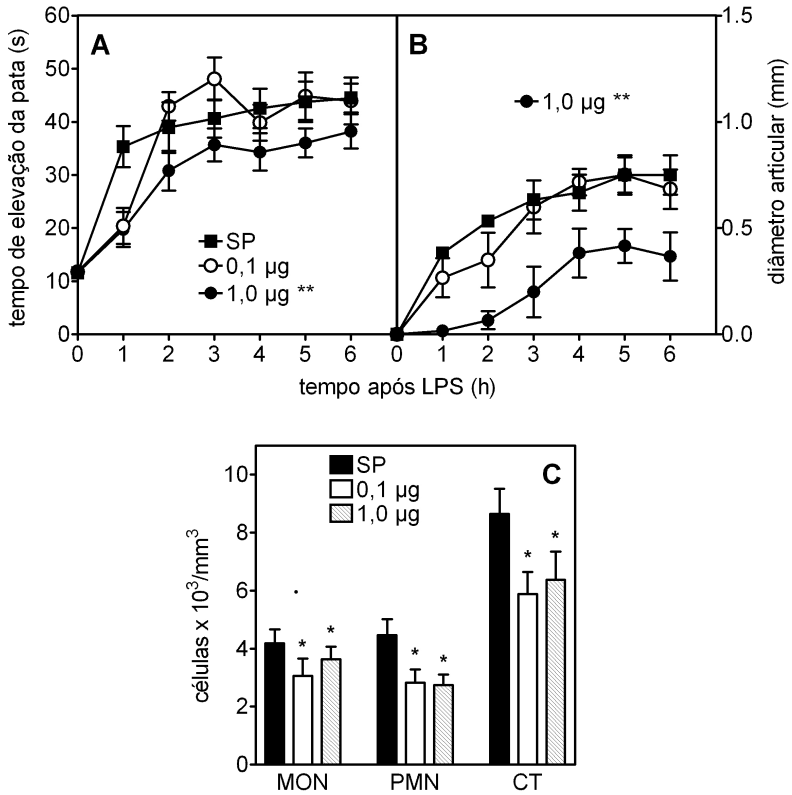


Figura 4.16: Anti-fractalaina foi administrada por via intratecal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu soro pré-ímune (SP, 10 µl, i.t.). Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

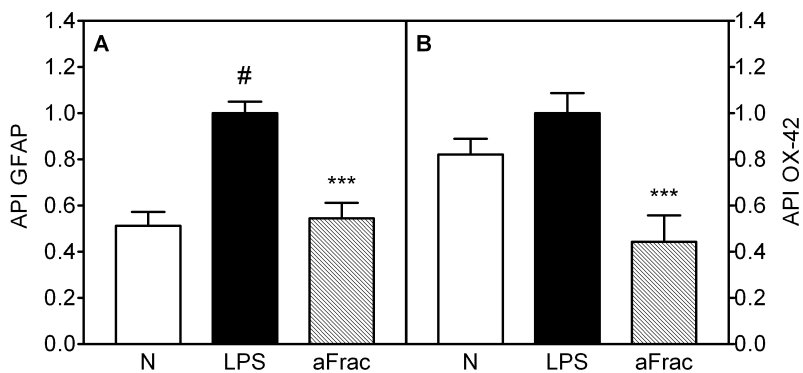


Figura 4.17: Anti-fractalcina reduz a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP (A) e OX-42 (B) no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal. Anti-fractalcina (aFrac; 1  $\mu$ g) foi administrada por via intratecal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu soro pré-imune (SP, 10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). \*\*\* representa a diferença estatística em relação ao controle (LPS) com  $p < 0,001$ . # representa a diferença estatística entre os grupos naïve (N) e LPS com  $p < 0,001$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

## 4.8 Fractalcina exógena aumenta a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS.

Posteriormente, verificou-se qual o efeito da administração intratecal de fractalcina exógena na incapacitação, no aumento do diâmetro articular e na migração de leucócitos induzidos por LPS. A dose de LPS utilizada neste experimento foi de 0,03 ng, pois produz curvas de incapacitação e aumento do diâmetro articular submáximas permitindo a visualização de potencialização após a injeção intratecal de fármacos. Fractalcina produziu um aumento significativo e dose-dependente do diâmetro articular (0,3 e 30 ng,  $p < 0,01$ ) e da contagem de leucócitos mononucleares (0,3 e 30 ng,  $p < 0,05$ ), polimorfonucleares (0,03; 0,3 e 30 ng  $p < 0,05$ ) e leucócitos totais (0,3 e 30 ng,  $p < 0,05$ ) (Figura 4.18). Adicionalmente verificou-se se os efeitos hipernociceptivo e proedematogênico da fractalcina poderiam ser resultantes da difusão deste fármaco para fora da medula espinhal e consequentemente de um efeito sistêmico adicional ao efeito medular. Para isso, fractalcina (30 ng) foi administrada por via sistêmica (intravenosa) nas mesmas condições do experimento em que se avaliou seu efeito intratecal. Nestas condições, fractalcina não produziu efeito significativo sobre a incapacitação (TEP controle:  $21,4 \pm 2,7$  s; frac:  $20,2 \pm 1,2$  s) e edema articular (DA controle:  $0,50 \pm 0,01$  mm; frac:  $0,46 \pm 0,08$  mm) e nem sobre a contagem de leucócitos mononucleares (controle:  $643 \pm 136$ ; frac:  $727 \pm 128$  células/mm<sup>3</sup>), polimorfonucleares (controle:  $156 \pm 28$ ; frac:  $130 \pm 50$  células/mm<sup>3</sup>) e leucócitos totais (controle:  $800 \pm 139$ ; frac:  $858 \pm 139$  células/mm<sup>3</sup>) (Figura 4.19).

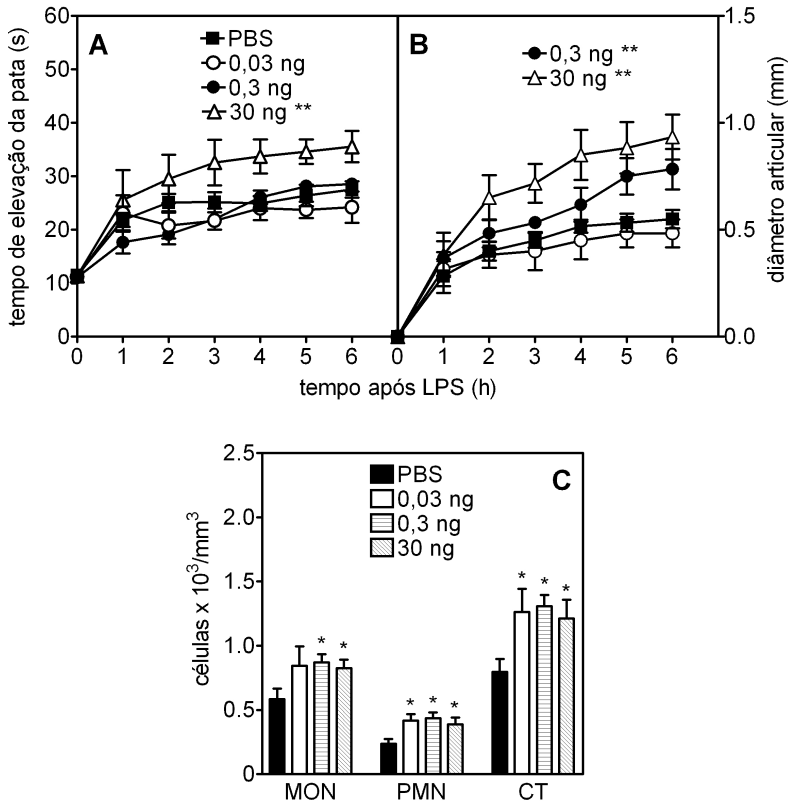


Figura 4.18: Fractalcina intratecal aumenta a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. Fractalcina foi administrada por via intratecal 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

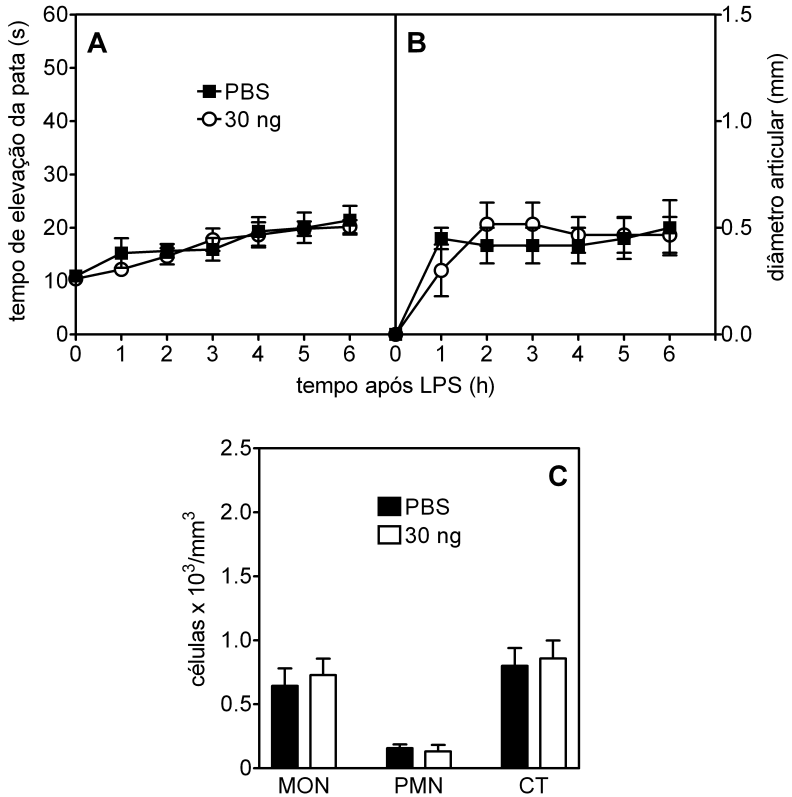


Figura 4.19: Fractalcina intravenosa não altera a incapacitação, o diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. Fractalcina foi administrada por via intravenosa 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

## **4.9 Fluorocitrato reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina.**

Considerando que os efeitos da fractalcina podem ser devidos à sua ação na ativação da glia, realizou-se o pré-tratamento dos ratos com fluorocitrato (0,1 mmol; i.t.) 5 minutos antes da administração de fractalcina (30 ng; i.t.). O objetivo desta etapa do estudo foi verificar se o bloqueio parcial da ativação glial seria capaz de reverter as ações da fractalcina. Tanto fractalcina quanto fluorocitrato co-administrados com PBS reproduziram os efeitos observados em experimentos anteriores (Figura 4.3 e Figura 4.18). O pré-tratamento com fluorocitrato reverteu a hipernocicepção, o efeito pró-edematogênico da fractalcina e o aumento na contagem de leucócitos mononucleares (Figura 4.20). O fluorocitrato intratecal reduziu a área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal, enquanto que a fractalcina aumentou significativamente apenas a área proporcional imunoreativa para GFAP. O fluorocitrato reverteu significativamente o aumento da área proporcional imunoreativa para GFAP induzido pela fractalcina (Figura 4.21).

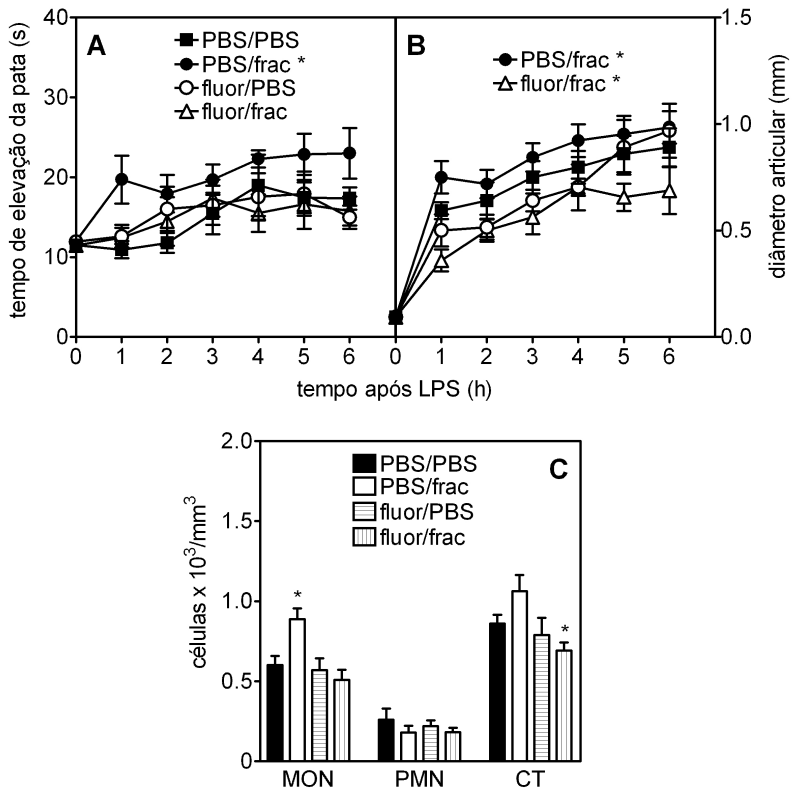


Figura 4.20: Fluorocitrato reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina. Fluorocitrato (fluor; 0,1 nmol, i.t.) foi administrado 5 minutos antes da fractalcina. Fractalina (frac; 30 ng, i.t.) foi administrada 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* representa a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

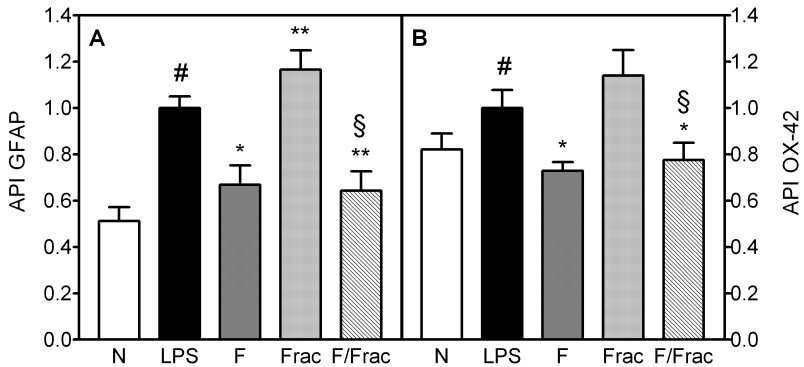


Figura 4.21: Efeito da co-administração de fluorocitrato com fractalcina na área proporcional imunoreativa (API) para GFAP (A) e OX-42 (B) no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal. Fluorocitrato (F; 0,1 nmol, i.t.) foi administrado 5 minutos antes da fractalcina. Fractalcina (Frac; 30 ng, i.t.) foi administrada 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle (LPS) com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. # representa a diferença estatística entre os grupos naïve (N) e LPS ( $p < 0,001$ ); § representa a diferença estatística entre os grupos fractalcina (Frac) e fluorocitrato (F) co-administrado com fractalcina (F/Frac) com  $p < 0,01$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).



## 4.10 Anti-TNF- $\alpha$ reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina.

Estudos prévios demonstraram que estados de dor exagerada estão associados a ativação glial no sistema nervoso central [50, 48, 193, 57]. A glia ativada libera substâncias capazes de interagir com os receptores presentes nos neurônios da medula espinhal, alterando sua atividade e, desta forma, contribuindo para a geração e a manutenção da dor [76, 171]. O TNF- $\alpha$  tem sido cogitado como uma destas substâncias. Desta forma, a fim de verificar se o efeito da fractalcina, substância que ativa as células gliais, poderia envolver a liberação de TNF- $\alpha$  da glia na medula espinhal, administrou-se o anticorpo anti-TNF- $\alpha$  por via intratecal 5 minutos antes da fractalcina. Inicialmente realizou-se uma curva dose-resposta de anti-TNF- $\alpha$  intratecal. A dose menor de anti-TNF- $\alpha$  (0,1  $\mu\text{g}$ ) já promoveu inibição máxima do diâmetro ( $p < 0,001$ ) e da incapacitação articular ( $p < 0,05$ ). As doses maiores (0,5 e 1  $\mu\text{g}$ ) mantiveram o efeito anti-edematogênico ( $p < 0,001$ ) mas perderam o efeito anti-nociceptivo (Figura 4.22). A maior dose de anti-TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g}$ ) também reduziu a migração de leucócitos no fluido sinovial. A dose de 0,1  $\mu\text{g}$  de anti-TNF- $\alpha$  foi selecionada para ser co-administrada com fractalcina porque foi a dose efetiva em reduzir ambos, incapacitação e diâmetro articular. A administração de anti-TNF- $\alpha$  5 minutos antes da fractalcina resultou em reversão tanto do efeito hipernociceptivo quanto pró-edematogênico desta quimiocina (Figura 4.23). Anti-TNF- $\alpha$  ou fractalcina co-administrados com PBS reproduziram os efeitos observados nos experimentos anteriores. Exceto para o anti-TNF- $\alpha$ /PBS, o qual não promoveu efeito anti-edematogênico neste experimento, possivelmente devido à dose do estímulo flogístico, o LPS, ser menor (0,03 ng) e não produzir aumento do diâmetro articular sensível à inibição com anti-TNF- $\alpha$ . O anti-TNF- $\alpha$  intratecal reduziu a área proporcional imunoreativa para GFAP ( $p < 0,01$ ) e OX-42 ( $p < 0,05$ ) no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal, enquanto que a fractalcina aumentou significativamente apenas a área proporcional imunoreativa para GFAP ( $p < 0,01$ ). A co-administração de anti-TNF- $\alpha$  com fractalcina não alterou significativamente a área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 (Figura 4.24).

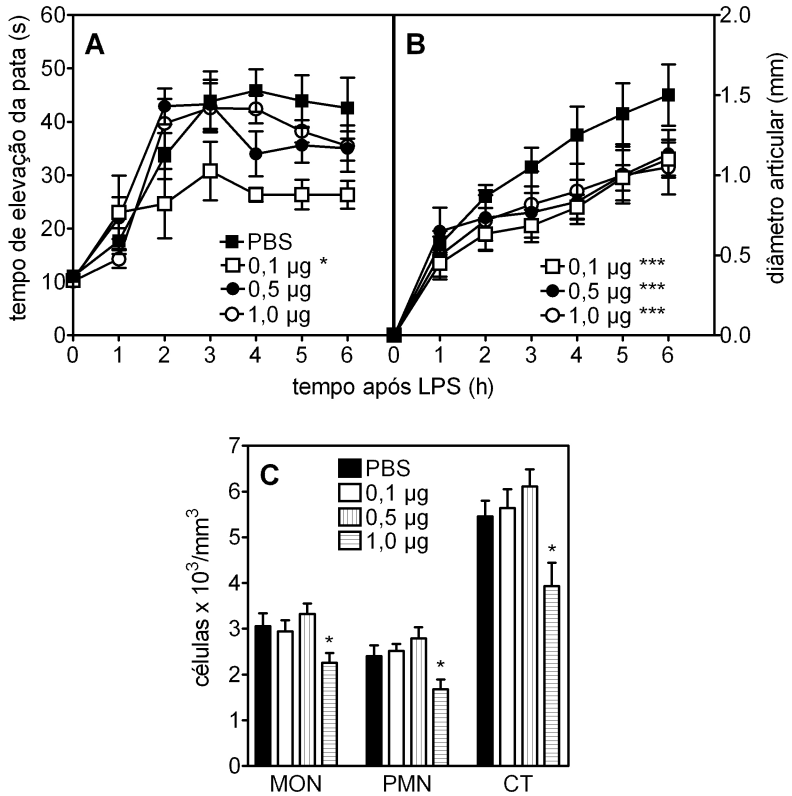


Figura 4.22: Anti-TNF- $\alpha$  intratecal inibe a incapacitação e o aumento do diâmetro articular induzidos por LPS. Anti-TNF- $\alpha$  foi administrado 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,001$ , respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

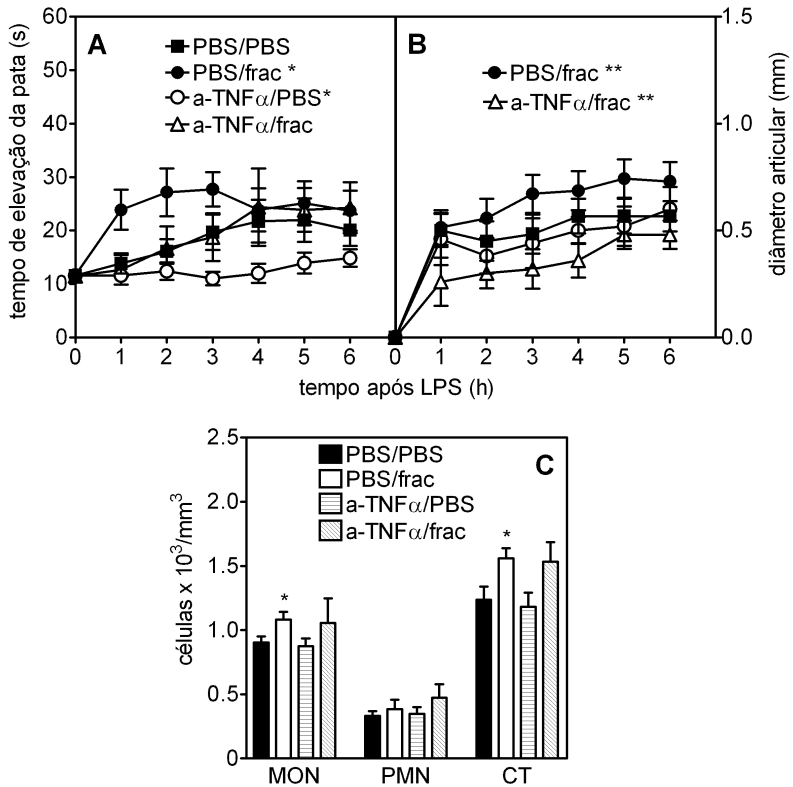


Figura 4.23: Anti-TNF- $\alpha$  reverte os efeitos hipernociceptivo e pró-edematogênico da fractalcina. Anti-TNF- $\alpha$  (0,1  $\mu$ g, i.t.) foi administrado 5 minutos antes da fractalcina. Fractalcina (frac; 30 ng, i.t.) foi administrada 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

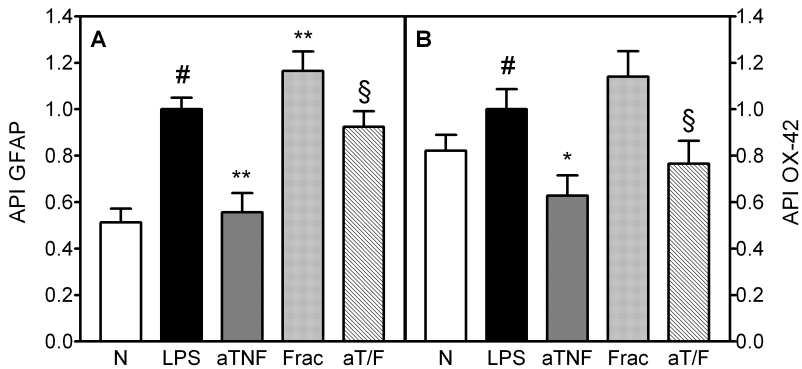


Figura 4.24: Efeito da co-administração de anti-TNF- $\alpha$  com fractalcina (aT/F) na área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal. Anti-TNF- $\alpha$  (aTNF; 0,1  $\mu$ g, i.t.) foi administrado 5 minutos antes da fractalcina. Fractalcina (Frac; 30 ng, i.t.) foi administrada 20 minutos antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle (LPS) com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. # representa a diferença estatística entre os grupos naïve (N) e LPS ( $p < 0,001$ ); § representa a diferença estatística entre os grupos fractalcina (Frac) e anti-TNF- $\alpha$  (aT) co-administrado com fractalcina (aT/Frac) com  $p < 0,05$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

### **4.11 TNF- $\alpha$ exógeno aumenta a incapacitação e o diâmetro articular induzidos por LPS.**

Posteriormente verificou-se qual o efeito da administração intratecal de TNF- $\alpha$  exógeno na incapacitação, no aumento do diâmetro articular e na migração de leucócitos induzidos por LPS. A dose de LPS utilizada neste experimento foi de 0,03 ng, pois produz curvas de incapacitação e aumento do diâmetro articular submáximas permitindo a visualização de potencialização após a injeção intratecal de fármacos. TNF- $\alpha$  produziu um aumento significativo e dose-dependente do diâmetro articular (1 e 100 pg,  $p < 0,001$ ; 10,  $p < 0,05$ ; ). Curiosamente, apenas a dose menor (1 pg) promoveu exacerbação da incapacitação articular induzida por LPS ( $p < 0,001$ ) (Figura 4.25). O TNF- $\alpha$  não alterou significativamente a migração de leucócitos totais, mononucleares e polimorfonucleares para o fluido sinovial e nem a área proporcional imunoreativa para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal (Figura 4.26).

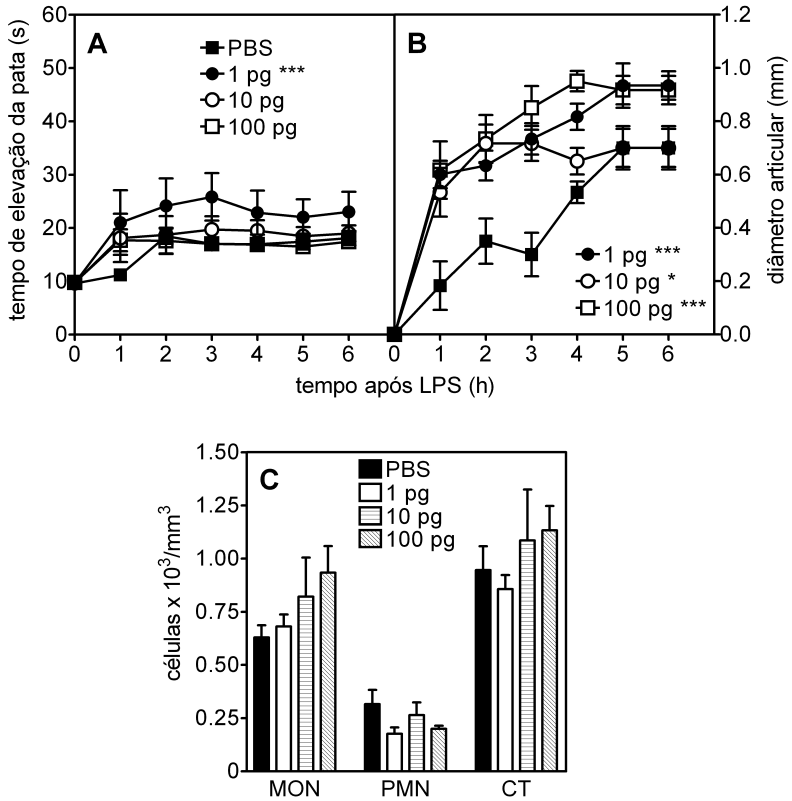


Figura 4.25: TNF- $\alpha$  intratecal aumenta a incapacitação e o diâmetro articular induzidos por LPS. TNF- $\alpha$  foi administrado 2 horas antes do LPS (0,03 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* e \*\*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e 0,001, respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

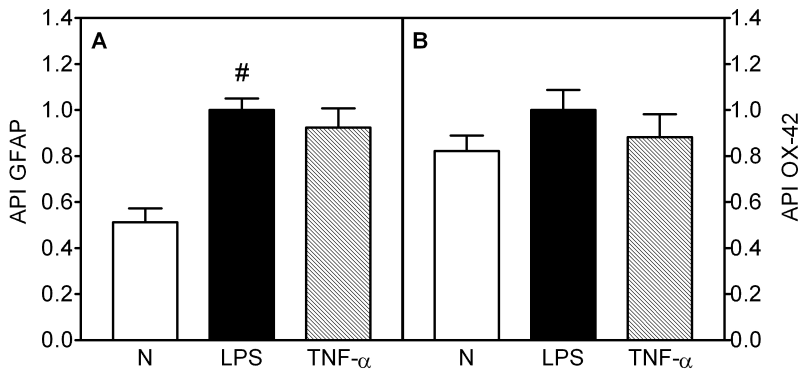


Figura 4.26: O TNF- $\alpha$  não alterou a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP (A) e OX-42 (B) no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal. O TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ g) foi administrado por via intratecal 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu PBS (10  $\mu$ l, i.t.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). # representa a diferença estatística entre os grupos naïve (N) e LPS com  $p < 0,001$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

## **4.12 Talidomida intraperitoneal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS.**

A talidomida é fármaco reconhecido por inibir a produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina envolvida no desenvolvimento e na manutenção da inflamação e da dor em diferentes doenças incluindo as artropatias [156, 123, 182, 20]. Neste estudo, avaliou-se inicialmente o efeito da talidomina administrada pela via intraperitoneal 1 hora antes da injeção intra-articular de LPS. O tratamento sistêmico com talidomida promoveu uma redução dose-dependente da incapacitação, do diâmetro articular e da migração de leucócitos para o fluido sinovial (Figura 4.27). As doses menores de talidomida já produziram efeito inibitório significativo do diâmetro articular (10 mg/kg,  $p < 0,01$ ) enquanto que não alteraram a incapacitação. Com o aumento da dose, o efeito anti-edematosogênico ficou ainda mais pronunciado (30 e 100 mg/kg,  $p < 0,01$ ) e foi acompanhado de inibição da incapacitação (30 e 100 mg/kg,  $p < 0,01$ ). A talidomida promoveu uma redução significativa e dependente da dose da migração de leucócitos totais, mononucleares e polimorfonucleares (Figura 4.27 C).



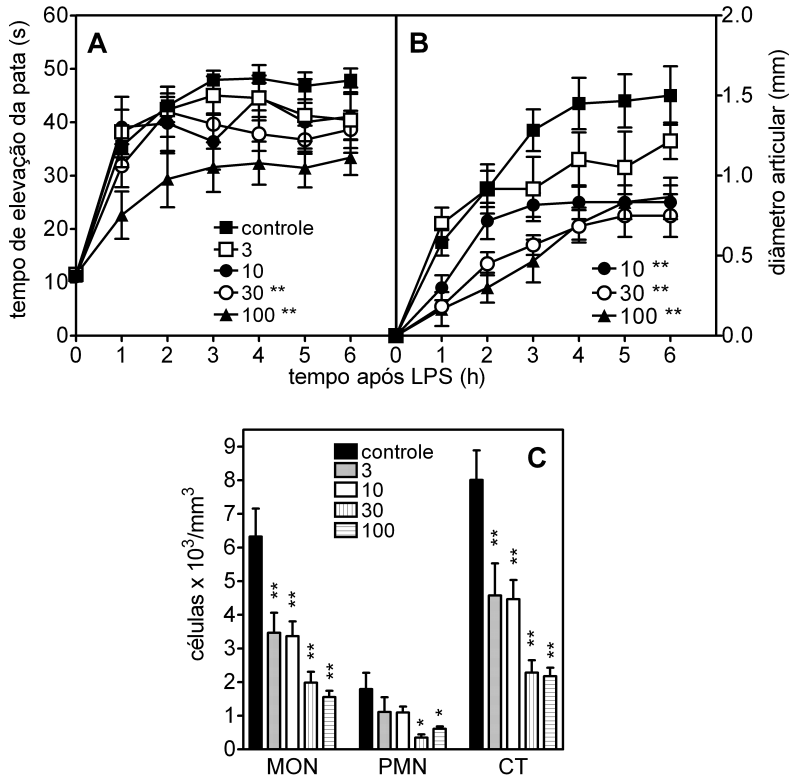


Figura 4.27: Talidomida inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. Talidomida (i.p.) foi administrada 1 hora minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). As doses estão representadas em mg/kg. O grupo controle recebeu DMSO 1 % em PBS (i.p.). Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

### **4.13 Talidomida intratecal inibe a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS.**

Tendo em vista que o TNF- $\alpha$  demonstrou estar envolvido no processo de sensibilização central contribuindo, assim, para o desenvolvimento e a manutenção da nocicepção e do edema inflamatório desencadados pelo LPS, investigou-se qual seria o efeito de um bloqueio central da produção desta citocina. Para isso, a talidomida foi administrada pela via intratecal 20 minutos antes do LPS. Nestas condições, ambas as doses de talidomida testadas (10 e 100  $\mu\text{g}$ ) promoveram uma redução significativa da incapacitação ( $p < 0,01$ ) e do edema articular ( $p < 0,001$ ). Curiosamente, a talidomida também reduziu a da migração de leucócitos polimorfonucleares no fluido sinovial (Figura 4.28).

Considerando os efeitos hiponociceptivo e antiedematogênico da talidomida obtidos no experimento anterior, verificou-se se tais efeitos poderiam ser resultantes da difusão deste fármaco para fora da medula espinhal e conseqüentemente de um efeito sistêmico adicional ao efeito medular. Para isso, a talidomida foi administrada pela via subcutânea nas mesmas condições do experimento em que se avaliou seu efeito intratecal. Nestas condições, apenas a dose maior (100  $\mu\text{g}$ ) promoveu efeito inibitório significativo na incapacitação e na migração de leucócitos, enquanto que nenhuma dose foi capaz de alterar significativamente o diâmetro articular (Figura 4.29).

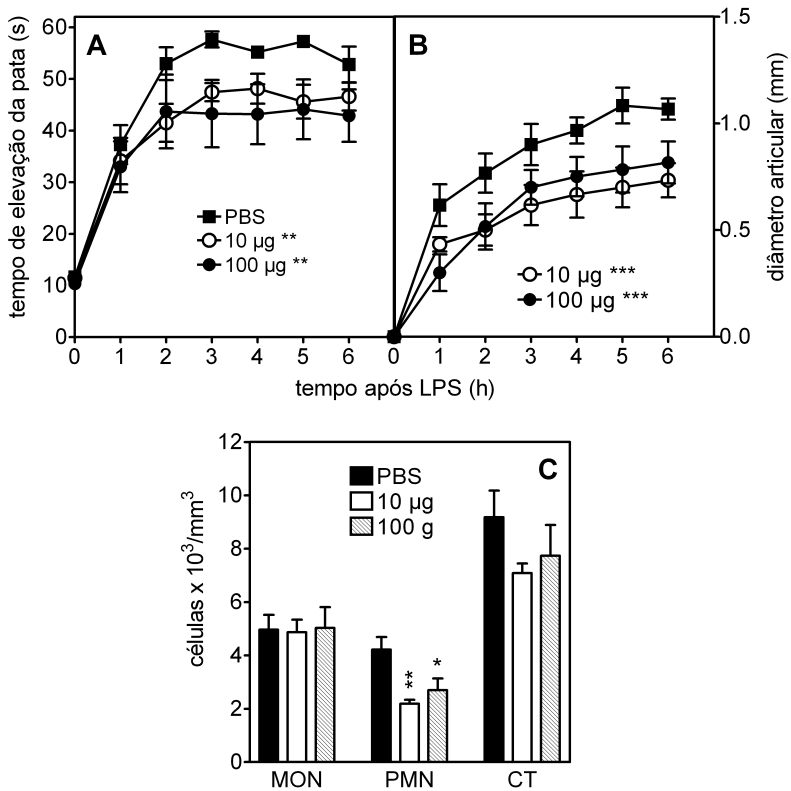


Figura 4.28: Talidomida intratecal reduz a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. Talidomida (i.t.) foi administrada 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu DMSO 1 % em PBS (10 µl, i.t.). Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). \*, \*\* e \*\*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$ , 0,01 e 0,001, respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

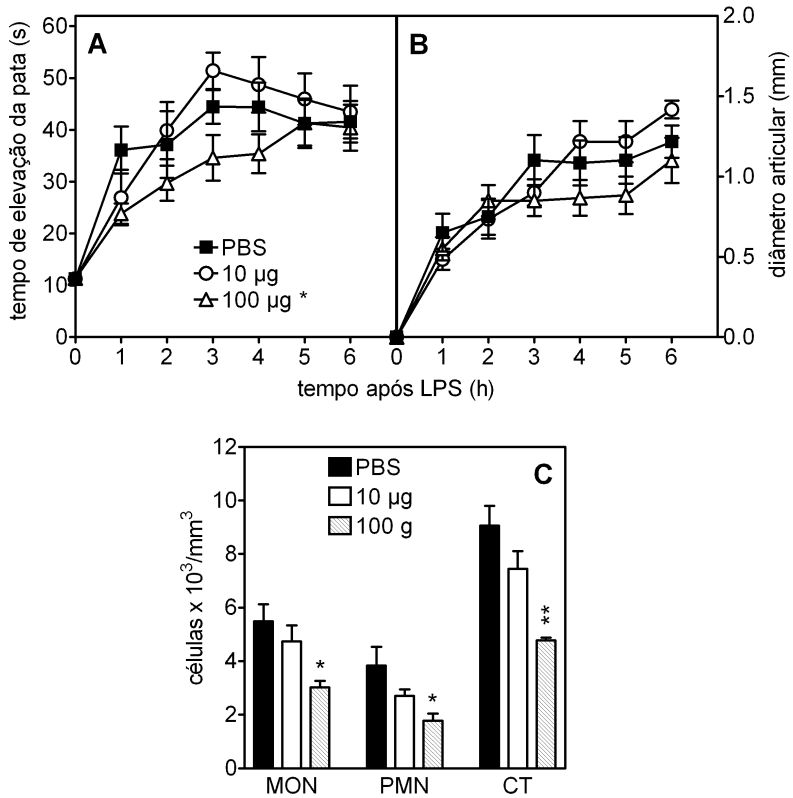


Figura 4.29: Talidomida subcutânea em dose baixa não altera a incapacitação, o aumento do diâmetro articular e a migração de leucócitos induzidos por LPS. Talidomida foi administrada 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.). O grupo controle recebeu DMSO 1 % em PBS (s.c.). Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). \* e \*\* representam a diferença estatística em relação ao controle com  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente (A, B: Anova de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett; C: Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).

#### 4.14 Talidomida intraperitoneal e intratecal reduzem a expressão de GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal de ratos.

O efeito da talidomida sobre a atividade dos astrócitos e da microglia na medula espinhal foi avaliado através da determinação da área proporcional imunoreativa para GFAP (astrócitos) e OX-42 (microglia). Tanto o tratamento sistêmico, que promoveu inibição da incapacitação, do diâmetro articular e da migração de leucócitos, quanto o intratecal reduziram significativamente a área proporcional imunoreativa para ambos, GFAP e OX-42 (Figura 4.30).

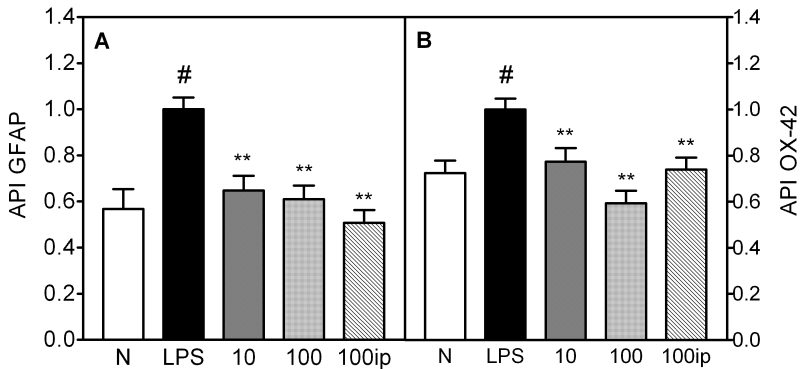


Figura 4.30: Talidomida reduz a área proporcional imunoreativa (API) para GFAP e OX-42 no corno dorsal ipsilateral da medula espinhal. Talidomida foi administrada 60 ou 20 minutos antes do LPS (30 ng, i.art.) por via intraperitoneal ou intratecal, respectivamente. O grupo controle recebeu DMSO 1 % em PBS (i.t. ou i.p.). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8 fatias/rato; n=6 ratos). \*\* representa a diferença estatística em relação ao controle (LPS) com  $p < 0,01$ . # representa a diferença estatística entre os grupos naïve e LPS com  $p < 0,001$ , 6 horas após a administração de LPS (Anova de uma via seguida do pós teste de Dunnett).



## 5 Discussão

O tratamento de doenças em que a causa ainda é desconhecida e, nas quais, o componente inflamatório apresenta grande importância no desenvolvimento e na manutenção dos sintomas, tem sido um dos grandes desafios na clínica médica. As artropatias, por exemplo, são doenças que comprometem seriamente a qualidade de vida das pessoas e cujo tratamento, baseado na inibição dos processos inflamatórios articulares, ainda deixa a desejar. Investigações recentes têm sugerido que, além do componente inflamatório periférico, o sistema nervoso central também participa direta ou indiretamente, interagindo com o sistema imune, para o desenvolvimento e manutenção, por exemplo, da dor persistente em diversas doenças [118]. No entanto, ainda muito pouco foi explorado sobre o papel do sistema nervoso central na inflamação que ocorre em doenças como a artrite. Baseado na hipótese deste estudo, as células gliais podem interagir com os neurônios na medula espinhal e alterar a inflamação periférica. Desta forma, a modulação de um evento que ocorre no sistema nervoso central emerge como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

### 5.1 Evidências da modulação da inflamação articular pela glia.

Os estudos apontam que a glia, especificamente astrócitos e microglia, contribui para o desenvolvimento e manutenção da dor patológica e crônica [118]. Além disso, existem evidências de que o sistema nervoso central é capaz de influenciar a resposta inflamatória em tecidos periféricos. Exemplos disso incluem a redução no acúmulo de leucócitos em tecidos periféricos após a estimulação de receptores de adenosina [18, 170] e o bloqueio da inflamação articular com antagonistas do receptor não-NMDA, como o CNQX [167, 147]. Moléculas de sinalização incluindo a MAP quinase p38, expressa principalmente na microglia e numa pequena população de neurônios das lâminas I e II da medula espinhal, também têm demonstrado estarem envolvidas na modulação de respostas inflamatórias periféricas [68, 19]. O bloqueio seletivo da MAP quinase p38 reduz o edema de pata, a inflamação sinovial e as evidências radiográficas de destruição articular na artrite induzida por adjuvante em ratos [19]. O presente estudo demonstrou que a inibição da atividade de astrócitos e da microglia, com fluorocitrato e minociclina, respectivamente, reduz significativamente o edema e o acúmulo de

leucócitos na articulação do joelho de ratos monoartríticos. A especificidade do fluorocitrato e da minociclina para as células gliais [58, 178] constitui uma evidência direta do envolvimento destas células nos efeitos periféricos observados no presente estudo, quando comparado com os estudos citados anteriormente. Além disso, o edema articular foi reduzido por doses de fármaco menores que as requeridas para a inibição da nocicepção, sugerindo que o mecanismo envolvido no controle medular da inflamação periférica é mais sensível à inibição da função glial que os mecanismos envolvidos na transmissão da nocicepção.

Uma explicação para o efeito do fluorocitrato e da minociclina neste estudo é a inibição da sensibilização central que ocorre no corno dorsal da medula espinhal e a consequente redução do reflexo da raiz dorsal. O aumento da sensibilização nas sinapses do corno dorsal tem demonstrado ser crítica para a geração de potenciais de ação antidrômicos retrógrados nos terminais centrais das fibras aferentes primárias, os quais saem para fora da medula espinhal em direção aos terminais periféricos num evento chamado de reflexo da raiz dorsal [196]. O reflexo da raiz dorsal pode aumentar a liberação de peptídeos vasoativos [83] e possivelmente prostaglandina E2 [28, 9] dos nociceptores, o que contribui para a inflamação articular. Através da inibição da ativação de astrócitos e da microglia, fluorocitrato e minociclina podem estar suprimindo a liberação de mediadores na medula espinhal responsáveis por sensibilizar os terminais centrais das fibras aferentes primárias e gerar o reflexo da raiz dorsal [65, 132].

O reflexo da raiz dorsal é um fenômeno dependente do gradiente de íons cloreto mantido pelo co-transportador NKCC1 [196], o qual é sensível ao bloqueio da furosemida [133]. Desta forma, a furosemida e outros diuréticos de alça têm sido usados para inibir a despolarização aferente primária que leva à geração do reflexo da raiz dorsal [151]. De acordo com a hipótese proposta anteriormente, a administração intratecal de furosemida reduziu o edema articular e a nocicepção. Além disso, a co-administração de furosemida com fluorocitrato ou minociclina reduziu os efeitos antiedematogênico e hiponociceptivo quando comparado com os efeitos produzidos pela furosemida sozinha. Estes achados sugerem que os efeitos dos inibidores da glia, bem como o efeito da furosemida neste modelo, podem ser mediados pelo mesmo mecanismo, ou seja, a inibição da geração do reflexo da raiz dorsal. Se os inibidores da ativação glial estivessem atuando por um mecanismo de ação complementar, seria observado uma somação de efeitos. Além disso, o efeito antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina não foi revertido pela aminoglutetimida, sugerindo que um possível aumento dos níveis de esteróides endógenos, devido à estimulação da medula espinhal ou outras condições estressantes inesperadas, parece não ser o responsável pelo efeito antiedematogênico do fluorocitrato e da minociclina. Estudos prévios demonstraram que, condições estressantes como o exercício físico, são capazes de alterar o edema articular em ratos, o qual é prevenido pelo tratamento com aminoglutetimida.

Mudanças no estado de ativação dos astrócitos e da microglia podem ser caracterizadas através de diferentes parâmetros, incluindo o aumento da expressão de moléculas como os filamentos intermediários presentes no citoplasma dos astrócitos (GFAP, *glial*



*fibrillary acidic protein*) e as integrinas  $\beta 2$  (CD11b e CD11c) presentes na microglia, moléculas reconhecidas por anticorpos específicos denominados anti-GFAP e OX-42, respectivamente [191]. GFAP e CD11b/c (OX-42) são os marcadores mais utilizados para a detecção de astrócitos e microglia, uma vez que eles são constitutivamente expressos e o aumento da sua expressão está associada com ativação destas células. Neste estudo, observou-se uma significativa redução na imunoreatividade para GFAP e CD11b/c no corno dorsal ipsilateral da medula espinal, evidenciando o efeito inibitório do fluorocitrato e da minociclina na atividade glial.

O efeito anti-inflamatório do fluorocitrato e da minociclina foi acompanhado de inibição da nocicepção articular. O envolvimento dos astrócitos e da microglia na geração e manutenção de estados de dor crônica tem sido mostrado em estudo prévios e a redução ou inibição da função glial diminui a hiperalgesia e a alodinia [141, 29, 50, 117]. Uma vez ativados, astrócitos e microglia liberam substâncias que estimulam ainda mais estas células contribuindo para o aumento e a manutenção de estados de dor persistente [191]. Neste estudo, o efeito antinociceptivo do fluorocitrato e da minociclina sugere o envolvimento da atividade glial na medula espinal na nocicepção evocada pelo LPS intra-articular.

Curiosamente, os inibidores da ativação glial afetaram o acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, um achado de grande relevância especialmente porque este evento tem um papel importante para o processo degenerativo que ocorre na artrite. A inibição do acúmulo de leucócitos pode ser devido à inibição da liberação de peptídeos vasoativos na articulação, uma vez que a substância P e outros neuropeptídeos podem exercer funções importantes sobre as células inflamatórias [159, 128].

## 5.2 Mediadores inflamatórios envolvidos na interação neurônio-glia na medula espinal.

Entender a sequência e a natureza dos eventos que determinam a comunicação entre neurônios e glia é fundamental para a descoberta de mecanismos e alvos terapêuticos para o tratamento da dor e inflamação crônica. Embora se conheça pouco sobre a sinalização entre neurônios e glia, especula-se que a ativação da glia depende de sinais liberados das fibras aferentes primárias na medula espinal [32, 35]. Dentre estes sinais, a fractalcina (CX3CL1) é um dos candidatos que apresenta características particulares [116]. Quando administrada na medula espinal, esta quimiocina promove hipersensibilidade térmica [119, 114] e mecânica [119, 114, 30], eventos que são prevenidos por antagonistas desta quimiocina, deleção do seu receptor, o CX3CR1, ou bloqueio da própria fractalcina [119, 114, 30]. Além disso, a ativação dos receptores CX3CR1 pela fractalcina resulta em comportamento nociceptivo, ativação da MAP quinase p38 [30, 204] e liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico [114].

O presente estudo demonstrou que a injeção intratecal de fractalcina foi capaz de

exacerbar todos os parâmetros avaliados, a nocicepção, o edema articular e o acúmulo de leucócitos no fluido sinovial. Estudos prévios demonstraram que a fractalcina não altera a transmissão sináptica excitatória de neurônios das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal [204]. Além disso, os receptores da fractalcina são expressos, predominantemente, na glia [8, 186, 103]. Sendo assim, sugere-se que os efeitos pró-edematogênico e hipernociceptivo da fractalcina, observados neste estudo, se devem à uma ação desta quimiocina nas células gliais. Outra evidência disso é o aumento da imunoreatividade dos marcadores específicos da ativação glial, GFAP (astrócitos) e CD11b/c (microglia), após a injeção intratecal de fractalcina. O bloqueio da ativação da glia com fluorocitrato resultou em reversão dos efeitos da fractalcina, achados que corroboram com a idéia de que a interação neurônio-glia na medula espinhal ocorre via liberação de fractalcina atuando em seus respectivos receptores presentes na glia. Por outro lado, a neutralização da fractalcina através da injeção de anticorpos específicos na medula espinhal, reduziu tanto a nocicepção quanto o edema articular e o acúmulo de leucócitos no fluido sinovial dos ratos e, em adição também reduziu a imunoreatividade para o GFAP e CD11b/c na medula espinhal. Estes achados confirmam a hipótese de que a estimulação inflamatória periférica com carragenina/LPS promove liberação de fractalcina na medula espinhal, a qual constitui um dos mediadores importantes para a ativação glial neste modelo.

Uma vez ativadas, as células gliais secretam mediadores pró-inflamatórios incluindo citocinas como o TNF- $\alpha$  [64], cujo receptor é expresso nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal [65]. Desta forma, o aumento da nocicepção evocada pela fractalcina neste estudo pode ser interpretada como resultante do aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios pela glia, os quais alteram a sensibilização neuronal na medula espinhal. O aumento da sensibilização na medula espinhal também contribui para o reflexo da raiz dorsal [196] que, por sua vez, incrementa a liberação de peptídeos vasoativos [83] e, possivelmente, prostaglandina E2 [28, 9] dos nociceptores nos tecidos periféricos exacerbando a inflamação.

Estudos prévios têm demonstrado que o TNF- $\alpha$  participa da morte celular mediada por neuroinflamação no sistema nervoso central nas doenças de Alzheimer e Parkinson, na esclerose múltipla e em diversas outras complicações no sistema nervoso central [184]. Na medula espinhal, o TNF- $\alpha$  está envolvido no desenvolvimento e na manutenção da dor [132, 115]. No presente estudo, a injeção intratecal de TNF- $\alpha$  promoveu exacerbação da nocicepção induzida por carragenina/LPS, sugerindo que esta citocina é capaz de alterar a nocicepção articular através de suas ações no sistema nervoso central. Da mesma forma, o TNF- $\alpha$  também induziu um aumento significativo do edema articular, uma evidência do controle que o sistema nervoso central pode exercer sobre a inflamação periférica.

A participação do TNF- $\alpha$  na modulação da inflamação periférica e da nocicepção articular foi confirmada através do bloqueio desta citocina na medula espinhal com anticorpos específicos. O anti-TNF- $\alpha$  reverteu os efeitos pró-edematogênico e hipernociceptivo da fractalcina, demonstrando que a glia ativada, dentre outras substâncias

pela fractalcina, pode estar liberando TNF- $\alpha$ , o qual interage com os neurônios contribuindo para a inflamação e para a nocicepção articular. O anti-TNF- $\alpha$  também reduziu a imunoreatividade do GFAP e CD11b/c no corno dorsal da medula espinhal. Uma explicação para este achado seria o bloqueio dos efeitos do TNF- $\alpha$ , pelo anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , no aumento da atividade neuronal medular, a qual estaria influenciando a atividade glial através da liberação de fractalcina. Por outro lado, a glia expressa receptores para o TNF- $\alpha$ , e o anti-TNF- $\alpha$  também poderia estar bloqueando uma ação direta do TNF- $\alpha$  nestas células. Estudos prévios demonstraram que o TNF- $\alpha$  apresenta um papel chave na inflamação periférica induzida por LPS em ratos pré-sensibilizados com carragenina [20], assim como pode afetar diretamente a atividade dos neurônios da medula espinhal [65, 132]. Portanto, o TNF- $\alpha$  é uma citocina que contribui para a inflamação articular e para a nocicepção quando liberado tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central. Estes achados evidenciam que fármacos que inibem a produção desta citocina, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central, apresentam potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas em que o TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória importante.

Atualmente, as estratégias terapêuticas para o tratamento da artrite são baseadas na inibição da produção ou no bloqueio da ação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , o que tem chamado a atenção pela eficácia associada com poucos efeitos colaterais, pelo menos a curto prazo [101]. No entanto, a maioria destes agentes não atravessam a barreira hematoencefálica, o que limita seu uso no tratamento de doenças em que o sistema nervoso central também contribui para o evento inflamatório que ocorre nos tecidos periféricos. Contudo, os estudos têm demonstrado que existem alternativas terapêuticas, dentre elas fármacos como a talidomida e seus análogos, os quais apresentam potencial para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. A talidomida foi recentemente aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de doenças como o eritema nodoso leproso e a estomatite esofágica em pacientes com HIV. Porém, este fármaco apresenta potencial terapêutico para muitas outras doenças. A reemergência da talidomida na prática clínica é devida, em parte, ao seu amplo espectro farmacológico e às suas propriedades imunomodulatórias, que incluem a inibição da expressão de moléculas de adesão e a supressão da produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos e pela microglia [156, 135].

Um dos achados de grande relevância neste estudo foi o efeito anti-inflamatório periférico da talidomida administrada na medula espinhal. Este efeito consistiu em redução do edema articular e do acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, o que foi similar, porém, mais potente, do que o efeito da talidomida sistêmica. Além disso, o efeito anti-inflamatório periférico da talidomida intratecal parece ser devido a uma ação restrita deste fármaco no compartimento medular, o que resultaria em redução dos seus efeitos colaterais.

Pouco se conhece sobre os efeitos imunomodulatórios da talidomida administrada na medula espinhal no que diz respeito à dor e à inflamação, porém, o presente estudo demonstra que, parte da ação hiponociceptiva e anti-inflamatória observada com a tal-

idomida sistêmica, pode ser explicada pela sua ação no sistema nervoso central. Existem estudos importantes que suportam esta idéia. Primeiro, que a talidomida atravessa a barreira hematoencefálica [69, 10, 184] e, segundo, que a injeção intraperitoneal de talidomida inibe a ativação da MAP quinase p38, do NF- $\kappa$ B e a expressão de TNF- $\alpha$  na medula espinhal [199, 51]. Estes achados sugerem que a talidomida sistêmica pode atingir o sistema nervoso central e inibir a ação de citocinas inflamatórias importantes na medula espinhal. Um exemplo é o TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória liberada pelas células gliais e que age na medula espinhal modificando a excitabilidade dos terminais centrais das fibras aferentes primárias, contribuindo assim, para os estados de dor exagerada [12, 115, 132]. Desta forma, o efeito hiponociceptivo da talidomida intratecal pode ser devido à sua ação inibitória na liberação de TNF- $\alpha$  na medula espinhal, e a conseqüente redução na sensibilização direta dos neurônios por esta citocina [65, 132]. Contudo, ainda não se conhece como a injeção de talidomida na medula espinhal pode diminuir a inflamação periférica. Estudos demonstraram que o aumento na sensibilização dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal é crítico para a geração de potenciais de ação nos terminais centrais das fibras aferentes primárias. Estes potenciais de ação são propagados de maneira retrógrada em direção aos tecidos periféricos, num evento denominado reflexo da raiz dorsal (RRD) [196]. O reflexo da raiz dorsal pode levar à liberação de peptídeos vasoativos [165] e, possivelmente, prostraglandina E2 [28, 9] dos nociceptores, contribuindo para a inflamação articular. Baseado nisso, a hipótese do presente estudo é de que o efeito da talidomida intratecal seria resultante da inibição da sensibilização dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal, e a conseqüente redução do reflexo da raiz dorsal.

Outro achado relevante neste estudo foi a inibição do acúmulo de leucócitos no fluido sinovial causado pela talidomida intratecal, especialmente porque este evento é importante para a degeneração que ocorre em doenças reumáticas. A redução do infiltrado de leucócitos também pode ser devido a uma inibição da liberação de neuropeptídeos vasoativos nos tecidos periféricos. A substância P e outros neuropeptídeos parecem exercer funções importantes na migração de células inflamatórias, o que explicaria, em parte, os achados deste estudo [159, 128].

A redução na atividade das células gliais na medula espinhal pela talidomida sugere que estas células podem estar desempenhando um papel importante na sensibilização central, já que são a maior fonte de citocinas no sistema nervoso central. Estudos prévios demonstraram que a talidomida inibe a liberação de TNF- $\alpha$  de células microgliais fetais humanas [104], a ativação do NF- $\kappa$ B [51] e da MAP quinase p38 [199], bem como a gliose e alterações vasculares [153]. Na medula espinhal, a ativação do NF- $\kappa$ B em astrócitos também está envolvida com a sensibilização central [16]. A ativação da MAP quinase p38 também foi detectada nas células microgliais presentes na medula espinhal, após lesões em tecidos periféricos, e pode estar relacionada com a produção de citocinas e outros mediadores. O bloqueio seletivo da MAP quinase p38 na medula espinhal de ratos artríticos, através da injeção do inibidor SB203580, reduziu significativamente o edema de pata, a inflamação sinovial e as evidências ra-

diográficas de destruição articular [19], o que ressalta a importância desta quinase na inflamação articular.

A aplicação de imunomoduladores ou agentes citostáticos pela via intratecal tem sido realizada para o tratamento de diversas formas de câncer, e apresenta a vantagem da baixa incidência de neurotoxicidade. Porém, ainda são reportadas lesões decorrentes deste tipo de manipulação, as quais incluem comprometimento motor, alterações intestinais e urinárias [92]. A administração de glicocorticóides pela via intratecal também tem sido avaliada para o tratamento de dor neuropática e causada por câncer. Os resultados são promissores [74, 197], porém, as substâncias utilizadas como conservantes nas formulações dos glicocorticóides ainda causam certa neurotoxicidade, o que tem limitado a utilização desta rota de administração de fármacos [125].

O melhor entendimento dos efeitos colaterais da talidomida tem levado à maior utilização deste fármaco. Uma alta incidência de neuropatia periférica, trombose de veias profundas, erupções cutâneas e sedação ainda tem sido observada após o tratamento sistêmico com talidomida [93, 185]. No entanto, considerando a facilidade que a talidomida tem de atravessar a barreira hematoencefálica, ainda assim parece ser um fármaco mais seguro para o sistema nervoso central que outros agentes quimioterápicos, como por exemplo, o metotrexato e a ciclosporina [163]. Sendo assim, a administração de talidomida ou seus análogos diretamente no sistema nervoso central parece ser uma alternativa na redução dos efeitos sistêmicos deste fármaco, porém, estudos cuidadosos devem ser realizados para se estabelecer a segurança na utilização deste tipo de fármaco e a via de administração. A administração espinhal de talidomida também possibilitaria o uso de doses baixas deste fármaco, apenas a quantidade suficiente para se obter os efeitos desejados, reduzindo assim, o risco dos efeitos colaterais observados com o tratamento sistêmico prolongado. Não trata-se apenas de mera especulação o fato de que, num futuro próximo, os imunomoduladores poderem ser liberados cronicamente na medula espinhal para o controle de doenças inflamatórias, como já tem sido realizado tratamento de alguns tipos de dor crônica.



## 6 Conclusão

- O aumento da atividade das células gliais na medula espinhal contribui para a inflamação articular induzida por LPS;
- O mecanismo de ação sugerido para o efeito anti-inflamatório dos inibidores da ativação glial, fluorocitrato e minociclina, é a redução da sensibilização central e, conseqüentemente, do reflexo da raiz dorsal;
- A fractalcina e o TNF- $\alpha$ , liberados na medula espinhal, são mediadores importantes para o aumento da atividade das células gliais e dos neurônios aferentes primários, respectivamente, contribuindo assim, para a nocicepção e a inflamação articular induzida por LPS;
- A talidomida reduz a inflamação articular através de suas ações na medula espinhal, as quais envolvem a inibição da atividade das células gliais;
- A administração espinhal de imunomoduladores pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, porém, estudos cuidadosos devem ser realizados para se estabelecer a segurança na utilização destes fármacos utilizando esta via de administração.

A Figura 6.1 esquematiza a interação entre neurônios e glia na medula espinhal, proposto pelo presente estudo, e como esta interação contribui para a inflamação articular.

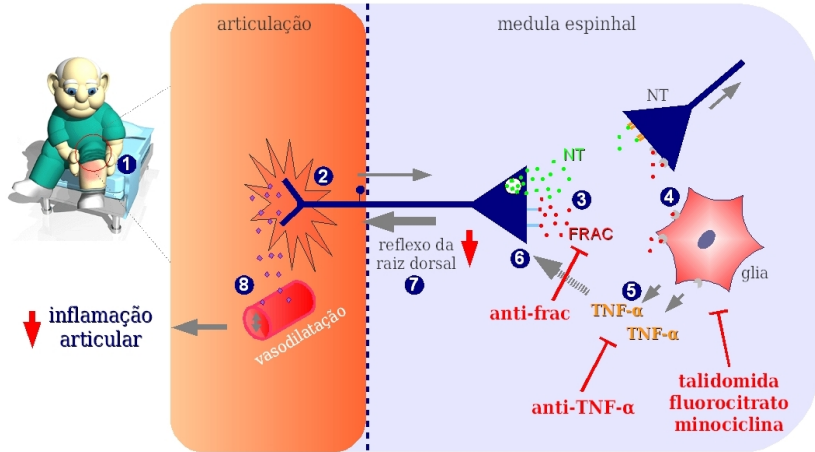


Figura 6.1: Esquema da interação entre neurônios e glia e a modulação da inflamação articular. (1) A lesão e/ou inflamação dos tecidos articulares resulta em sensibilização periférica, um processo que envolve a ativação dos nociceptores (2); (3) Na medula espinhal, ocorre o processo de sensibilização central, que é caracterizado pela liberação de neurotransmissores (NT) e fractalcina (FRAC); (4) Os neurotransmissores e a fractalcina interagem com seus respectivos receptores presentes na glia, ativando estas células; (5) Uma vez ativadas, a microglia libera substâncias como o TNF- $\alpha$ , o qual interage com as fibras aferentes primárias (6) contribuindo para o reflexo da raiz dorsal (7); (8) O resultado do reflexo da raiz dorsal é a liberação de neuropeptídeos dos terminais periféricos dos nociceptores, o que contribui para a inflamação através do aumento da vasodilatação, do extravasamento plasmático e do acúmulo de leucócitos. O bloqueio da ativação da glia com minociclina e fluorocitrato, do TNF- $\alpha$  com talidomida ou anti-TNF- $\alpha$  e da fractalcina com anti-fractalcina, resulta em redução da inflamação articular, um processo que parece envolver a inibição do reflexo da raiz dorsal.



## Referências Bibliográficas

- [1] AKUNDI, R. S., CANDELARIO-JALIL, E., HESS, S., HÜLL, M., LIEB, K., GEBICKE-HAERTER, P. J., AND FIEBICH, B. L. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *Glia* 51, 3 (Aug 2005), 199–208. (citado na página 9)
- [2] ALCALAY, M., DEBLAIS, F., AZAIS, I., AND BONTOUX, D. Post-traumatic reactive arthritis. Etiologic, clinical and diagnostic aspects. Apropos of 6 cases. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 56, 11 (Nov 1989), 725–729. (citado na página 17)
- [3] ALCORN, N., SAUNDERS, S., AND MADHOK, R. Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. *Drug Saf* 32, 12 (2009), 1123–1134. (citado na página 2)
- [4] ALLIOT, F., LECAIN, E., GRIMA, B., AND PESSAC, B. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4 (Feb 1991), 1541–1545. (citado na página 5)
- [5] ALOISI, F. Immune function of microglia. *Glia* 36, 2 (Nov 2001), 165–179. (citado na página 5)
- [6] ALVAREZ-MAUBECIN, V., GARCIA-HERNANDEZ, F., WILLIAMS, J. T., AND BOCKSTAELE, E. J. V. Functional coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 20, 11 (Jun 2000), 4091–4098. (citado na página 3)
- [7] ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P., AND HAYDON, P. G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 5 (May 1999), 208–215. (citado na página 3)
- [8] ASENSIO, V. C., AND CAMPBELL, I. L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* 22, 11 (Nov 1999), 504–512. (citado nas páginas 7, 8, and 76)
- [9] AVERBECK, B., REEH, P. W., AND MICHAELIS, M. Modulation of CGRP and PGE2 release from isolated rat skin by alpha-adrenoceptors and kappa-opioid-receptors. *Neuroreport* 12, 10 (Jul 2001), 2097–2100. (citado nas páginas 74, 76, and 78)

- [10] BAIRD, R., VAN ZYL-SMIT, R. N., IVESON, A., DUDDY, J., AND RASSAM, S. M. B. Thalidomide is highly effective in a patient with meningeal acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma* 45, 1 (Jan 2004), 179–181. (citado na página 78)
- [11] BANATI, R. B., GEHRMANN, J., SCHUBERT, P., AND KREUTZBERG, G. W. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7 (1993), 111–118. (citado na página 9)
- [12] BAO, L., ZHU, Y., ELHASSAN, A. M., WU, Q., XIAO, B., ZHU, J., AND LINDGREN, J. U. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. *Neuroreport* 12, 18 (Dec 2001), 3905–3908. (citado nas páginas 9 and 78)
- [13] BAYLISS, W. M. On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *J Physiol* 26, 3-4 (Feb 1901), 173–209. (citado na página 10)
- [14] BAZAN, J. F., BACON, K. B., HARDIMAN, G., WANG, W., SOO, K., ROSSI, D., GREAVES, D. R., ZLOTNIK, A., AND SCHALL, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 6617 (Feb 1997), 640–644. (citado na página 8)
- [15] BESONG, G., BATTAGLIA, G., D’ONOFRIO, M., MARCO, R. D., NGOMBA, R. T., STORTO, M., CASTIGLIONE, M., MANGANO, K., BUSCETI, C. L., NICOLETTI, F. R., BACON, K., TUSCHE, M., VALENTI, O., CONN, P. J., BRUNO, V., AND NICOLETTI, F. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. *J Neurosci* 22, 13 (Jul 2002), 5403–5411. (citado na página 7)
- [16] BETTONI, I., COMELLI, F., ROSSINI, C., GRANUCCI, F., GIAGNONI, G., PERI, F., AND COSTA, B. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. *Glia* 56, 12 (Sep 2008), 1312–1319. (citado na página 78)
- [17] BOILLÉE, S., YAMANAKA, K., LOBSIGER, C. S., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., KASSIOTIS, G., KOLLIAS, G., AND CLEVELAND, D. W. Onset and progression in inherited als determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 5778 (Jun 2006), 1389–1392. (citado na página 5)
- [18] BONG, G. W., ROSENGREN, S., AND FIRESTEIN, G. S. Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation. The role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest* 98, 12 (Dec 1996), 2779–2785. (citado na página 73)
- [19] BOYLE, D. L., JONES, T. L., HAMMAKER, D., SVENSSON, C. I., ROSENGREN, S., ALBANI, S., SORKIN, L., AND FIRESTEIN, G. S. Regulation of

- peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med* 3, 9 (Sep 2006), e338. (citado nas páginas 73 and 79)
- [20] BRESSAN, E., CUNHA, F. D. Q., AND TONUSSI, C. R. Contribution of TNF-alpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. *Cytokine* 36, 1-2 (Oct 2006), 83–89. (citado nas páginas 18, 26, 66, and 77)
- [21] BRESSAN, E., AND TONUSSI, C. R. Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflamm Res* 57, 12 (Dec 2008), 586–592. (citado nas páginas 2 and 26)
- [22] BRIERLEY, J. B., AND BROWN, A. W. The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: I. the intrinsic microglia. *J Comp Neurol* 211, 4 (Nov 1982), 397–406. (citado na página 5)
- [23] BRUCE-KELLER, A. J. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res* 58, 1 (Oct 1999), 191–201. (citado na página 3)
- [24] CARDONA, A. E., PIORO, E. P., SASSE, M. E., KOSTENKO, V., CARDONA, S. M., DIJKSTRA, I. M., HUANG, D., KIDD, G., DOMBROWSKI, S., DUTTA, R., LEE, J.-C., COOK, D. N., JUNG, S., LIRA, S. A., LITTMAN, D. R., AND RANSOHOFF, R. M. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9, 7 (Jul 2006), 917–924. (citado na página 5)
- [25] CERVERO, F., AND LAIRD, J. M. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain* 68, 1 (Nov 1996), 13–23. (citado na página 10)
- [26] CHAN, W. Y., KOHSAKA, S., AND REZAIE, P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53, 2 (Feb 2007), 344–354. (citado na página 5)
- [27] CHAPMAN, G. A., MOORES, K., HARRISON, D., CAMPBELL, C. A., STEWART, B. R., AND STRIJOS, P. J. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci* 20, 15 (Aug 2000), RC87. (citado nas páginas 8 and 50)
- [28] CHOPRA, B., GIBLETT, S., LITTLE, J. G., DONALDSON, L. F., TATE, S., EVANS, R. J., AND GRUBB, B. D. Cyclooxygenase-1 is a marker for a sub-population of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12, 3 (Mar 2000), 911–920. (citado nas páginas 74, 76, and 78)
- [29] CLARK, A. K., GENTRY, C., BRADBURY, E. J., MCMAHON, S. B., AND MALCANGIO, M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* 11, 2 (Feb 2007), 223–230. (citado nas páginas 8 and 75)

- [30] CLARK, A. K., YIP, P. K., GRIST, J., GENTRY, C., STANILAND, A. A., MARCHAND, F., DEHVARI, M., WOTHERSPOON, G., WINTER, J., ULLAH, J., BEVAN, S., AND MALCANGIO, M. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 25 (Jun 2007), 10655–10660. (citado nas páginas 8, 9, and 75)
- [31] COGGESHALL, R. E., AND LEKAN, H. A. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 364, 1 (Jan 1996), 6–15. (citado na página 25)
- [32] COLBURN, R. W., RICKMAN, A. J., AND DELEO, J. A. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 157, 2 (Jun 1999), 289–304. (citado na página 75)
- [33] COLPAERT, F. C., DONNERER, J., AND LEMBECK, F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. *Life Sci* 32, 16 (Apr 1983), 1827–1834. (citado na página 10)
- [34] COSTIGAN, M., MOSS, A., LATREMOLIERE, A., JOHNSTON, C., VERMA-GANDHU, M., HERBERT, T. A., BARRETT, L., BRENNER, G. J., VARDEH, D., WOOLF, C. J., AND FITZGERALD, M. T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci* 29, 46 (Nov 2009), 14415–14422. (citado na página 2)
- [35] COULL, J. A. M., BEGGS, S., BOUDREAU, D., BOIVIN, D., TSUDA, M., INOUE, K., GRAVEL, C., SALTER, M. W., AND KONINCK, Y. D. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 7070 (Dec 2005), 1017–1021. (citado nas páginas 5, 9, and 75)
- [36] COYLE, D. E. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23, 1 (May 1998), 75–83. (citado nas páginas 5 and 7)
- [37] CROWN, E. D., YE, Z., JOHNSON, K. M., XU, G.-Y., MCADOO, D. J., AND HULSEBOSCH, C. E. Increases in the activated forms of ERK 1/2, p38 MAPK, and CREB are correlated with the expression of at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Exp Neurol* 199, 2 (Jun 2006), 397–407. (citado nas páginas 5 and 7)
- [38] DAILEY, M., MANDERS, E., SOLL, D., AND TERASAKI, M. Confocal microscopy of live cells. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* 3 (2005). (citado na página 6)
- [39] DONG, Y., AND BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 2 (Nov 2001), 180–190. (citado na página 4)

- [40] DREYFUS, C. F., DAI, X., LERCHER, L. D., RACEY, B. R., FRIEDMAN, W. J., AND BLACK, I. B. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo. *J Neurosci Res* 56, 1 (Apr 1999), 1–7. (citado na página 4)
- [41] DUCHEN, M. R. Excitation of mouse motoneurons by GABA-mediated primary afferent depolarization. *Brain Res* 379, 1 (Jul 1986), 182–187. (citado na página 10)
- [42] ECCLES, J. C., KOZAK, W., AND MAGNI, F. Dorsal root reflexes of muscle group I afferent fibres. *J Physiol* 159 (Nov 1961), 128–146. (citado na página 10)
- [43] ECCLES, J. C., SCHMIDT, R. F., AND WILLIS, W. D. Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *J Physiol* 161 (May 1962), 282–297. (citado na página 10)
- [44] ERICHSEN, D., LOPEZ, A. L., PENG, H., NIEMANN, D., WILLIAMS, C., BAUER, M., MORGELLO, S., COTTER, R. L., RYAN, L. A., GHORPADE, A., GENDELMAN, H. E., AND ZHENG, J. Neuronal injury regulates fractalkine: relevance for HIV-1 associated dementia. *J Neuroimmunol* 138, 1-2 (May 2003), 144–155. (citado na página 8)
- [45] FERRARI, D., CHIOZZI, P., FALZONI, S., SUSINO, M. D., MELCHIORRI, L., BARICORDI, O. R., AND VIRGLIO, F. D. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* 159, 3 (Aug 1997), 1451–1458. (citado na página 9)
- [46] FERRELL, W. R., AND RUSSELL, N. J. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat. *J Physiol* 379 (Oct 1986), 407–416. (citado na página 10)
- [47] FOR DISEASE CONTROL, C., AND (CDC), P. Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults—united states, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 50, 7 (Feb 2001), 120–125. (citado na página 1)
- [48] FU, K. Y., LIGHT, A. R., MATSUSHIMA, G. K., AND MAIXNER, W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res* 825, 1-2 (Apr 1999), 59–67. (citado nas páginas 7, 25, and 59)
- [49] GARRISON, C. J., DOUGHERTY, P. M., AND CARLTON, S. M. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol* 129, 2 (Oct 1994), 237–243. (citado na página 7)
- [50] GARRISON, C. J., DOUGHERTY, P. M., KAJANDER, K. C., AND CARLTON, S. M. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565, 1 (Nov 1991), 1–7. (citado nas páginas 7, 59, and 75)

- [51] GENOVESE, T., MAZZON, E., ESPOSITO, E., PAOLA, R. D., CAMINITI, R., MELI, R., BRAMANTI, P., AND CUZZOCREA, S. Effect of thalidomide on signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Shock* 30, 3 (Sep 2008), 231–240. (citado na página 78)
- [52] GISLASON, G. H., RASMUSSEN, J. N., ABILDSTROM, S. Z., SCHRAMM, T. K., HANSEN, M. L., FOSBØL, E. L., SØRENSEN, R., FOLKE, F., BUCH, P., GADSBØLL, N., RASMUSSEN, S., POULSEN, H. E., KØBER, L., MADSEN, M., AND TORP-PEDERSEN, C. Increased mortality and cardiovascular morbidity associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic heart failure. *Arch Intern Med* 169, 2 (Jan 2009), 141–149. (citado na página 2)
- [53] GRANFORS, K., JALKANEN, S., LINDBERG, A. A., MÄKI-IKOLA, O., VON ESSEN, R., LAHESMAA-RANTALA, R., ISOMÄKI, H., SAARIO, R., ARNOLD, W. J., AND TOIVANEN, A. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet* 335, 8691 (Mar 1990), 685–688. (citado na página 17)
- [54] GRANFORS, K., JALKANEN, S., VON ESSEN, R., LAHESMAA-RANTALA, R., ISOMÄKI, O., PEKKOLA-HEINO, K., MERILAHTI-PALO, R., SAARIO, R., ISOMÄKI, H., AND TOIVANEN, A. Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. *N Engl J Med* 320, 4 (Jan 1989), 216–221. (citado na página 17)
- [55] HAIBEL, H., AND SPECKER, C. Disease-modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 27, 4 Suppl 55 (2009), S159–S163. (citado na página 2)
- [56] HAINS, B. C., KLEIN, J. P., SAAB, C. Y., CRANER, M. J., BLACK, J. A., AND WAXMAN, S. G. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 23, 26 (Oct 2003), 8881–8892. (citado na página 7)
- [57] HASHIZUME, H., DELEO, J. A., COLBURN, R. W., AND WEINSTEIN, J. N. Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine* 25, 10 (May 2000), 1206–1217. (citado na página 59)
- [58] HASSEL, B., PAULSEN, R. E., JOHNSEN, A., AND FONNUM, F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 576, 1 (Mar 1992), 120–124. (citado nas páginas 32 and 74)
- [59] HELMICK, C. G., FELSON, D. T., LAWRENCE, R. C., GABRIEL, S., HIRSCH, R., KWOH, C. K., LIANG, M. H., KREMERS, H. M., MAYES, M. D.,

- MERKEL, P. A., PILLEMER, S. R., REVELLE, J. D., STONE, J. H., AND WORKGROUP, N. A. D. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum* 58, 1 (Jan 2008), 15–25. (citado na página 1)
- [60] HERBERT, M. K., AND HOLZER, P. Neurogenic inflammation. Pathophysiology and clinical implications. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37, 7 (Jul 2002), 386–394. (citado na página 10)
- [61] HERMANN, G. E., HOLMES, G. M., AND ROGERS, R. C. TNF-alpha modulation of visceral and spinal sensory processing. *Curr Pharm Des* 11, 11 (2005), 1391–1409. (citado na página 9)
- [62] HIDE, I. Mechanism of production and release of tumor necrosis factor implicated in inflammatory diseases. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121, 3 (Mar 2003), 163–173. (citado na página 9)
- [63] HOES, J. N., JACOBS, J. W. G., BOERS, M., BOUMPAS, D., BUTTGEREIT, F., CAEYERS, N., CHOY, E. H., CUTOLO, M., SILVA, J. A. P. D., ESSELENS, G., GUILLEVIN, L., HAFSTROM, I., KIRWAN, J. R., ROVENSKY, J., RUSSELL, A., SAAG, K. G., SVENSSON, B., WESTHOVENS, R., ZEIDLER, H., AND BIJLSMA, J. W. J. EULAR evidence-based recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 66, 12 (Dec 2007), 1560–1567. (citado na página 1)
- [64] HOLGUIN, A., O'CONNOR, K. A., BIEDENKAPP, J., CAMPISI, J., WIESELER-FRANK, J., MILLIGAN, E. D., HANSEN, M. K., SPATARO, L., MAKSIMOVA, E., BRAVMANN, C., MARTIN, D., FLESHNER, M., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). *Pain* 110, 3 (Aug 2004), 517–530. (citado na página 76)
- [65] HOLMES, G. M., HEBERT, S. L., ROGERS, R. C., AND HERMANN, G. E. Immunocytochemical localization of TNF type 1 and type 2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res* 1025, 1-2 (Oct 2004), 210–219. (citado nas páginas 9, 74, 76, 77, and 78)
- [66] HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol* 30, 1 (Jan 1998), 5–11. (citado na página 10)
- [67] HORNER, P. J., AND PALMER, T. D. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. la vida loca! *Trends Neurosci* 26, 11 (Nov 2003), 597–603. (citado na página 4)

- [68] HUA, X.-Y., SVENSSON, C. I., MATSUI, T., FITZSIMMONS, B., YAKSH, T. L., AND WEBB, M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci* 22, 10 (Nov 2005), 2431–2440. (citado na página 78)
- [69] HUANG, F., GU, J., ZHAO, W., ZHU, J., ZHANG, J., AND YU, D. T. Y. One-year open-label trial of thalidomide in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 47, 3 (Jun 2002), 249–254. (citado na página 78)
- [70] HUGHES, P. M., BOTHAM, M. S., FRENTZEL, S., MIR, A., AND PERRY, V. H. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 37, 4 (Mar 2002), 314–327. (citado nas páginas 8 and 50)
- [71] HUPPERTZ, H. I., AND HEESEMAN, J. Experimental Yersinia infection of human synovial cells: persistence of live bacteria and generation of bacterial antigen deposits including “ghosts”, nucleic acid-free bacterial rods. *Infect Immun* 64, 4 (Apr 1996), 1484–1487. (citado na página 17)
- [72] IGNATOWSKI, T. A., COVEY, W. C., KNIGHT, P. R., SEVERIN, C. M., NICKOLA, T. J., AND SPENGLER, R. N. Brain-derived TNF-alpha mediates neuropathic pain. *Brain Res* 841, 1-2 (Sep 1999), 70–77. (citado na página 9)
- [73] IKEDA-MATSUO, Y., IKEGAYA, Y., MATSUKI, N., UEMATSU, S., AKIRA, S., AND SASAKI, Y. Microglia-specific expression of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 contributes to lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production. *J Neurochem* 94, 6 (Sep 2005), 1546–1558. (citado na página 9)
- [74] INADA, T., KUSHIDA, A., SAKAMOTO, S., TAGUCHI, H., AND SHINGU, K. Intrathecal betamethasone pain relief in cancer patients with vertebral metastasis: a pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 51, 4 (Apr 2007), 490–494. (citado na página 79)
- [75] INAGAKI, N., FUKUI, H., ITO, S., AND WADA, H. Type-2 astrocytes show intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in response to various neuroactive substances. *Neurosci Lett* 128, 2 (Jul 1991), 257–260. (citado na página 3)
- [76] INOUE, A., IKOMA, K., MORIOKA, N., KUMAGAI, K., HASHIMOTO, T., HIDE, I., AND NAKATA, Y. Interleukin-1-beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem* 73, 5 (Nov 1999), 2206–2213. (citado nas páginas 3, 9, and 59)



- [77] INOUE, K. ATP receptors of microglia involved in pain. *Novartis Found Symp* 276 (2006), 263–72; discussion 273–81. (citado na página 9)
- [78] JANCÓS, N., JANCÓS-GÁBOR, A., AND SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 31, 1 (Sep 1967), 138–151. (citado na página 10)
- [79] JI, R.-R., KOHNO, T., MOORE, K. A., AND WOOLF, C. J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26, 12 (Dec 2003), 696–705. (citado na página 9)
- [80] JIN, S.-X., ZHUANG, Z.-Y., WOOLF, C. J., AND JI, R.-R. P38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 10 (May 2003), 4017–4022. (citado na página 7)
- [81] JORDAN, K. M., ARDEN, N. K., DOHERTY, M., BANNWARTH, B., BILJLSMA, J. W. J., DIEPPE, P., GUNTHER, K., HAUSELMANN, H., HERRERO-BEAUMONT, G., KAKLAMANIS, P., LOHMANDER, S., LEEB, B., LEQUESNE, M., MAZIERES, B., MARTIN-MOLA, E., PAVELKA, K., PENDLETON, A., PUNZI, L., SERNI, U., SWOBODA, B., VERBRUGGEN, G., ZIMMERMAN-GORSKA, I., DOUGADOS, M., AND FOR INTERNATIONAL CLINICAL STUDIES INCLUDING THERAPEUTIC TRIALS ESCISIT, S. C. EULAR recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 62, 12 (Dec 2003), 1145–1155. (citado na página 1)
- [82] JUNG, S., ALIBERTI, J., GRAEMMEL, P., SUNSHINE, M. J., KREUTZBERG, G. W., SHER, A., AND LITTMAN, D. R. Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 11 (Jun 2000), 4106–4114. (citado na página 8)
- [83] K. A. SLUKA, H REES, W. W. Fiber types contributing to dorsal root reflexes induced by joint inflammation in cats and monkeys. *J Neurophysiol* 74 (1995), 981–989. (citado nas páginas 74 and 76)
- [84] KÖHIDAI, L. Chemotaxis: the proper physiological response to evaluate phylogeny of signal molecules. *Acta Biol Hung* 50, 4 (1999), 375–394. (citado na página 8)
- [85] KHOURY, J. E., TOFT, M., HICKMAN, S. E., MEANS, T. K., TERADA, K., GEULA, C., AND LUSTER, A. D. Cer2 deficiency impairs microglial accumula-

- tion and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13, 4 (Apr 2007), 432–438. (citado na página 5)
- [86] KILTZ, U., VAN DER HEIJDE, D., MIELANTS, H., FELDTKELLER, E., BRAUN, J., AND PATIENT INITIATIVE GROUP, P. A. R. E. U. L. A. R. ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis: the patient version. *Ann Rheum Dis* 68, 9 (Sep 2009), 1381–1386. (citado na página 1)
- [87] KÖLLER, H., SIEBLER, M., AND HARTUNG, H. P. Immunologically induced electrophysiological dysfunction: implications for inflammatory diseases of the CNS and PNS. *Prog Neurobiol* 52, 1 (May 1997), 1–26. (citado na página 3)
- [88] KOSTEN, T. A., AND AMBROSIO, E. HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with lewis and fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 27, 1-2 (2002), 35–69. (citado na página 40)
- [89] KREMER, J. M., GENOVESE, M. C., CANNON, G. W., CALDWELL, J. R., CUSH, J. J., FURST, D. E., LUGGEN, M. E., KEYSTONE, E., WEISMAN, M. H., BENSEN, W. M., KAINE, J. L., RUDERMAN, E. M., COLEMAN, P., CURTIS, D. L., KOPP, E. J., KANTOR, S. M., WALTUCK, J., LINDSLEY, H. B., MARKENSON, J. A., STRAND, V., CRAWFORD, B., FERNANDO, I., SIMPSON, K., AND BATHON, J. M. Concomitant leflunomide therapy in patients with active rheumatoid arthritis despite stable doses of methotrexate. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 137, 9 (Nov 2002), 726–733. (citado na página 2)
- [90] KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19, 8 (Aug 1996), 312–318. (citado nas páginas 3, 4, and 5)
- [91] KURITZKY, L., AND WEAVER, A. Advances in rheumatology: coxibs and beyond. *J Pain Symptom Manage* 25, 2 Suppl (Feb 2003), S6–20. (citado na página 1)
- [92] KWONG, Y.-L., YEUNG, D. Y. M., AND CHAN, J. C. W. Intrathecal chemotherapy for hematologic malignancies: drugs and toxicities. *Ann Hematol* 88, 3 (Mar 2009), 193–201. (citado na página 79)
- [93] LAFFITTE, E., AND REVUZ, J. Thalidomide: an old drug with new clinical applications. *Expert Opin Drug Saf* 3, 1 (Jan 2004), 47–56. (citado na página 79)
- [94] LAM, F. Y., AND FERRELL, W. R. Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser doppler perfusion imaging. *Neuroscience* 52, 2 (Jan 1993), 443–449. (citado na página 10)

- [95] LANGMAN, M. J., JENSEN, D. M., WATSON, D. J., HARPER, S. E., ZHAO, P. L., QUAN, H., BOLOGNESE, J. A., AND SIMON, T. J. Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA* 282, 20 (Nov 1999), 1929–1933. (citado na página 2)
- [96] LEDEBOER, A., JEKICH, B. M., SLOANE, E. M., MAHONEY, J. H., LANGER, S. J., MILLIGAN, E. D., MARTIN, D., MAIER, S. F., JOHNSON, K. W., LEINWAND, L. A., CHAVEZ, R. A., AND WATKINS, L. R. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates Paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain Behav Immun* 21, 5 (Jul 2007), 686–698. (citado na página 9)
- [97] LEDEBOER, A., SLOANE, E. M., MILLIGAN, E. D., FRANK, M. G., MAHONY, J. H., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115, 1-2 (May 2005), 71–83. (citado nas páginas 5 and 7)
- [98] LEO, J. A. D., TAWFIK, V. L., AND LACROIX-FRALISH, M. L. The tetrapartite synapse: path to cns sensitization and chronic pain. *Pain* 122, 1-2 (May 2006), 17–21. (citado na página 7)
- [99] LEONG, F. J. W.-M., BRADY, M., AND MCGEE, J. O. Correction of uneven illumination (vignetting) in digital microscopy images. *J Clin Pathol* 56, 8 (Aug 2003), 619–621. (citado na página 22)
- [100] LEVINE, J. D., MOSKOWITZ, M. A., AND BASBAUM, A. I. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol* 135, 2 Suppl (Aug 1985), 843s–847s. (citado na página 10)
- [101] LICASTRO, F., CHIAPPELLI, M., IANNI, M., AND PORCELLINI, E. TNF-alpha antagonists: differential clinical effects by different biotechnological molecules. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22, 3 (2009), 567–572. (citado nas páginas 2 and 77)
- [102] LIN, Q., ZOU, X., AND WILLIS, W. D. A-delta and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol* 84, 5 (Nov 2000), 2695–2698. (citado na página 10)
- [103] LINDIA, J. A., MCGOWAN, E., JOCHNOWITZ, N., AND ABBADIE, C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain* 6, 7 (Jul 2005), 434–438. (citado na página 76)
- [104] LOKENSGARD, J. R., HU, S., VAN FENEMA, E. M., SHENG, W. S., AND PETERSON, P. K. Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. *J Infect Dis* 182, 3 (Sep 2000), 983–987. (citado na página 78)

- [105] LYNN, B. Neurogenic inflammation caused by cutaneous polymodal receptors. *Prog Brain Res* 113 (1996), 361–368. (citado na página 10)
- [106] MARCHAND, F., PERRETTI, M., AND MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6, 7 (Jul 2005), 521–532. (citado na página 9)
- [107] MARÍN-TEVA, J. L., DUSART, I., COLIN, C., GERVAIS, A., VAN ROOIJEN, N., AND MALLAT, M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 4 (Feb 2004), 535–547. (citado na página 5)
- [108] MARRIOTT, I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. *Front Biosci* 9 (Sep 2004), 2153–2165. (citado na página 7)
- [109] MASSON, G., THOMAS, P., BONToux, D., AND ALCALAY, M. Influence of trauma on initiation of Reiter's syndrome and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 44, 12 (Dec 1985), 860–861. (citado na página 17)
- [110] MCKENNA, F., BORENSTEIN, D., WENDT, H., WALLEMARK, C., LEFKOWITH, J. B., AND GEIS, G. S. Celecoxib versus diclofenac in the management of osteoarthritis of the knee. *Scand J Rheumatol* 30, 1 (2001), 11–18. (citado na página 2)
- [111] MELLER, S. T., DYKSTRA, C., GRZYBYCKI, D., MURPHY, S., AND GEBHART, G. F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33, 11 (Nov 1994), 1471–1478. (citado na página 7)
- [112] MELLON, R. D., AND BAYER, B. M. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 83, 1-2 (Mar 1998), 19–28. (citado na página 40)
- [113] MESTRE, C., PÉLISSIER, T., FIALIP, J., WILCOX, G., AND ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 32, 4 (Dec 1994), 197–200. (citado na página 20)
- [114] MILLIGAN, E., ZAPATA, V., SCHOENIGER, D., CHACUR, M., GREEN, P., POOLE, S., MARTIN, D., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci* 22, 11 (Dec 2005), 2775–2782. (citado nas páginas 9 and 75)
- [115] MILLIGAN, E. D., O'CONNOR, K. A., NGUYEN, K. T., ARMSTRONG, C. B., TWINING, C., GAYKEMA, R. P., HOLGUIN, A., MARTIN, D., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces

- enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 21, 8 (Apr 2001), 2808–2819. (citado nas páginas 76 and 78)
- [116] MILLIGAN, E. D., SLOANE, E. M., AND WATKINS, L. R. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J Neuroimmunol* 198, 1-2 (Jul 2008), 113–120. (citado na página 75)
- [117] MILLIGAN, E. D., TWINING, C., CHACUR, M., BIEDENKAPP, J., O’CONNOR, K., POOLE, S., TRACEY, K., MARTIN, D., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23, 3 (Feb 2003), 1026–1040. (citado na página 75)
- [118] MILLIGAN, E. D., AND WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10, 1 (Jan 2009), 23–36. (citado nas páginas 4 and 73)
- [119] MILLIGAN, E. D., ZAPATA, V., CHACUR, M., SCHOENIGER, D., BIEDENKAPP, J., O’CONNOR, K. A., VERGE, G. M., CHAPMAN, G., GREEN, P., FOSTER, A. C., NAEVE, G. S., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci* 20, 9 (Nov 2004), 2294–2302. (citado nas páginas 8, 9, and 75)
- [120] MINAMI, T., OKUDA-ASHITAKA, E., HORI, Y., SAKUMA, S., SUGIMOTO, T., SAKIMURA, K., MISHINA, M., AND ITO, S. Involvement of primary afferent C-fibres in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2. *Eur J Neurosci* 11, 6 (Jun 1999), 1849–1856. (citado na página 9)
- [121] MOALEM, G., AND TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51, 2 (Aug 2006), 240–264. (citado na página 9)
- [122] MOLANDER, C., XU, Q., AND GRANT, G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol* 230, 1 (Nov 1984), 133–141. (citado na página 25)
- [123] MOREIRA, A. L., SAMPAIO, E. P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K. A., AND KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on TNF- $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177, 6 (Jun 1993), 1675–1680. (citado na página 66)
- [124] NAIR, A., FREDERICK, T. J., AND MILLER, S. D. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 65, 17 (Sep 2008), 2702–2720. (citado na página 4)

- [125] NELSON, D. A. Dangers from methylprednisolone acetate therapy by intraspinal injection. *Arch Neurol* 45, 7 (Jul 1988), 804–806. (citado na página 79)
- [126] NESIC, O., LEE, J., JOHNSON, K. M., YE, Z., XU, G.-Y., UNABIA, G. C., WOOD, T. G., MCADOO, D. J., WESTLUND, K. N., HULSEBOSCH, C. E., AND PEREZ-POLO, J. R. Transcriptional profiling of spinal cord injury-induced central neuropathic pain. *J Neurochem* 95, 4 (Nov 2005), 998–1014. (citado na página 7)
- [127] OBERHOLZER, M., OSTREICHER, M., CHRISTEN, H., AND BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 105, 5 (May 1996), 333–355. (citado na página 21)
- [128] O’CONNOR, T. M., O’CONNELL, J., O’BRIEN, D. I., GOODE, T., BREDIN, C. P., AND SHANAHAN, F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201, 2 (Nov 2004), 167–180. (citado nas páginas 75 and 78)
- [129] OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON RHEUMATOID ARTHRITIS GUIDELINES, A. C. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. *Arthritis Rheum* 46, 2 (Feb 2002), 328–346. (citado na página 2)
- [130] PALMA, C., MINGHETTI, L., ASTOLFI, M., AMBROSINI, E., SILBERSTEIN, F. C., MANZINI, S., LEVI, G., AND ALOISI, F. Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production. *Glia* 21, 2 (Oct 1997), 183–193. (citado na página 3)
- [131] PAN, Y., LLOYD, C., ZHOU, H., DOLICH, S., DEEDS, J., GONZALO, J. A., VATH, J., GOSSELIN, M., MA, J., DUSSAULT, B., WOOLF, E., ALPERIN, G., CULPEPPER, J., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., AND GEARING, D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387, 6633 (Jun 1997), 611–617. (citado na página 8)
- [132] PARADA, C. A., YEH, J. J., JOSEPH, E. K., AND LEVINE, J. D. TNF receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci* 17, 9 (May 2003), 1847–1852. (citado nas páginas 74, 76, 77, and 78)
- [133] PAYNE, J. A., RIVERA, C., VOIPIO, J., AND KAILA, K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26, 4 (Apr 2003), 199–206. (citado na página 74)
- [134] PERRY, V. H., AND GORDON, S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11, 6 (Jun 1988), 273–277. (citado na página 8)

- [135] PETERSON, P. K., GEKKER, G., BORNEMANN, M., CHATTERJEE, D., AND CHAO, C. C. Thalidomide inhibits lipoarabinomannan-induced upregulation of human immunodeficiency virus expression. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 12 (Dec 1995), 2807–2809. (citado na página 77)
- [136] PODDUBNYI, D., SONG, I.-H., AND SIEPER, J. A systematic comparison of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Exp Rheumatol* 27, 4 Suppl 55 (2009), S148–S151. (citado na página 2)
- [137] POPOVICH, P. G., WEI, P., AND STOKES, B. T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol* 377, 3 (Jan 1997), 443–464. (citado nas páginas 5, 7, and 25)
- [138] PRILLER, J., HAAS, C. A., REDDINGTON, M., AND KREUTZBERG, G. W. Calcitonin gene-related peptide and atp induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* 15, 4 (Dec 1995), 447–457. (citado na página 7)
- [139] QIN, M., WANG, J.-J., CAO, R., ZHANG, H., DUAN, L., GAO, B., XIONG, Y.-F., CHEN, L.-W., AND RAO, Z.-R. The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 55, 4 (Aug 2006), 442–450. (citado na página 3)
- [140] RAFFEINER, B., BOTSIOS, C., OMETTO, F., BERNARDI, L., MONTANTE, A., SFRISO, P., TODESCO, S., AND PUNZI, L. TNF-alpha blockers and infectious risk in rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 61, 3 (2009), 165–173. (citado na página 2)
- [141] RAGHAVENDRA, V., TANGA, F., AND DELEO, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 2 (Aug 2003), 624–630. (citado nas páginas 7 and 75)
- [142] RAGHAVENDRA, V., TANGA, F. Y., AND DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci* 20, 2 (Jul 2004), 467–473. (citado nas páginas 7 and 9)
- [143] RASBAND, W. S. ImageJ - Image processing and analysis in Java. *U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA* (2007). (citado nas páginas 21, 23, and 25)
- [144] RAY, W. A., VARAS-LORENZO, C., CHUNG, C. P., CASTELLSAGUE, J., MURRAY, K. T., STEIN, C. M., DAUGHERTY, J. R., ARBOGAST, P. G., AND GARCÍA-RODRÍGUEZ, L. A. Cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients after hospitalization for serious coronary heart

- disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2, 3 (May 2009), 155–163. (citado na página 2)
- [145] REDDINGTON, M., PRILLER, J., TREICHEL, J., HAAS, C., AND KREUTZBERG, G. W. Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 7 (Jul 1995), 1047–1049. (citado na página 7)
- [146] REES, H., SLUKA, K. A., WESTLUND, K. N., AND WILLIS, W. D. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? *Neuroreport* 5, 7 (Mar 1994), 821–824. (citado na página 10)
- [147] REES, H., SLUKA, K. A., WESTLUND, K. N., AND WILLIS, W. D. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. *J Physiol* 484 ( Pt 2) (Apr 1995), 437–445. (citado nas páginas 10 and 73)
- [148] ROCK, R. B., GEKKER, G., HU, S., SHENG, W. S., CHEERAN, M., LOKENSGARD, J. R., AND PETERSON, P. K. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 4 (Oct 2004), 942–64, table of contents. (citado na página 5)
- [149] ROUACH, N., GLOWINSKI, J., AND GIAUME, C. Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149, 7 (Jun 2000), 1513–1526. (citado na página 3)
- [150] ROUMIER, A., BÉCHADE, C., PONCER, J.-C., SMALLA, K.-H., TOMASELLO, E., VIVIER, E., GUNDELFINGER, E. D., TRILLER, A., AND BESSIS, A. Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci* 24, 50 (Dec 2004), 11421–11428. (citado na página 5)
- [151] RUCHINSKAIA, T. I., AND SVERDLOV, I. S. Furosemide depression of the dorsal root potentials and of the presynaptic inhibition of monosynaptic reflexes in the cat spinal cord. *Neirofiziologija* 20, 4 (1988), 561–563. (citado na página 74)
- [152] RUDOMIN, P., AND SCHMIDT, R. F. Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129, 1 (Nov 1999), 1–37. (citado na página 10)
- [153] RYU, J. K., AND MCLARNON, J. G. Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived TNF-alpha in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 29, 2 (Feb 2008), 254–266. (citado na página 78)
- [154] S, S., L, J., J, R., AND L., K. Chartbook on work and disability in the United States. *InfoUse report. US National Institute on Disability and Rehabilitation Research*. (1998). (citado na página 1)



- [155] SALMON E.D., SIDNEY L. SHAW, J. W. C. M. W.-S. P. S. M. E. Y., AND BLOOM, K. *A high-resolution multimode digital microscope system*. Department of Biology, Univenity of North Carolina Chapel Hill, North Carolina 27599, 1998. (citado na página 22)
- [156] SAMPAIO, E. P., SARNO, E. N., GALILLY, R., COHN, Z. A., AND KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits TNF-alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 173, 3 (Mar 1991), 699–703. (citado nas páginas 66 and 77)
- [157] SCHAIBLE, H. G., AND GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55, 1 (Oct 1993), 5–54. (citado na página 10)
- [158] SCHAIBLE, H.-G., SCHMELZ, M., AND TEGEDER, I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 2 (May 2006), 323–342. (citado na página 11)
- [159] SCHÄFFER, M., BEITER, T., BECKER, H. D., AND HUNT, T. K. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg* 133, 10 (Oct 1998), 1107–1116. (citado nas páginas 75 and 78)
- [160] SHAN, S., QI-LIANG, M.-Y., HONG, C., TINGTING, L., MEI, H., HAILI, P., YAN-QING, W., ZHI-QI, Z., AND YU-QIU, Z. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis? *Neurobiol Dis* 26, 3 (Jun 2007), 558–568. (citado na página 9)
- [161] SHAO, Y., AND MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. *Glia* 11, 2 (Jun 1994), 147–155. (citado na página 3)
- [162] SIEPER, J., BRAUN, J., AND KINGSLEY, G. H. Report on the fourth international workshop on reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 4 (Apr 2000), 720–734. (citado na página 17)
- [163] SIOKA, C., AND KYRITSIS, A. P. Central and peripheral nervous system toxicity of common chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 5 (Apr 2009), 761–767. (citado na página 79)
- [164] SLUKA, K. A., LAWAND, N. B., AND WESTLUND, K. N. Joint inflammation is reduced by dorsal rhizotomy and not by sympathectomy or spinal cord transection. *Ann Rheum Dis* 53, 5 (May 1994), 309–314. (citado nas páginas 2 and 10)
- [165] SLUKA, K. A., REES, H., WESTLUND, K. N., AND WILLIS, W. D. Fiber types contributing to dorsal root reflexes induced by joint inflammation in cats and monkeys. *J Neurophysiol* 74, 3 (Sep 1995), 981–989. (citado na página 78)

- [166] SLUKA, K. A., AND WESTLUND, K. N. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 55, 3 (Dec 1993), 367–377. (citado na página 10)
- [167] SLUKA, K. A., AND WESTLUND, K. N. Centrally administered non-NMDA but not NMDA receptor antagonists block peripheral knee joint inflammation. *Pain* 55, 2 (Nov 1993), 217–225. (citado na página 73)
- [168] SOMMER, C. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 16, 5 (Oct 2003), 623–628. (citado na página 9)
- [169] SONG, P., AND ZHAO, Z. Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res* 39, 3 (Mar 2001), 281–286. (citado na página 7)
- [170] SORKIN, L. S., MOORE, J., BOYLE, D. L., YANG, L., AND FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by spinal adenosine: role of somatic afferent fibers. *Exp Neurol* 184, 1 (Nov 2003), 162–168. (citado na página 73)
- [171] SOUTHALL, M. D., MICHAEL, R. L., AND VASKO, M. R. Intrathecal NSAIDs attenuate inflammation-induced neuropeptide release from rat spinal cord slices. *Pain* 78, 1 (Oct 1998), 39–48. (citado nas páginas 9 and 59)
- [172] SPATARO, L. E., SLOANE, E. M., MILLIGAN, E. D., WIESELER-FRANK, J., SCHOENIGER, D., JEKICH, B. M., BARRIENTOS, R. M., MAIER, S. F., AND WATKINS, L. R. Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J Pain* 5, 7 (Sep 2004), 392–405. (citado na página 3)
- [173] SROGA, J. M., JONES, T. B., KIGERL, K. A., MCGAUGHY, V. M., AND POPOVICH, P. G. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462, 2 (Jul 2003), 223–240. (citado na página 7)
- [174] STENCE, N., WAITE, M., AND DAILEY, M. E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33, 3 (Mar 2001), 256–266. (citado na página 6)
- [175] STREIT, W. J., WALTER, S. A., AND PENNELL, N. A. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57, 6 (Apr 1999), 563–581. (citado na página 5)
- [176] SUN, S., CAO, H., HAN, M., LI, T.-T., PAN, H.-L., ZHAO, Z.-Q., AND ZHANG, Y.-Q. New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* 129, 1-2 (May 2007), 64–75. (citado na página 8)

- [177] SURESH, E. Recent advances in rheumatoid arthritis. *Postgrad Med J* 86, 1014 (Apr 2010), 243–250. (citado na página 2)
- [178] TIKKA, T. M., AND KOISTINAHO, J. E. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 166, 12 (Jun 2001), 7527–7533. (citado nas páginas 32 and 74)
- [179] TOBÓN, G. J., YOUINOU, P., AND SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* (Jan 2010). (citado na página 1)
- [180] TOIVANEN, A., GRANFORS, K., LAHESMAA-RANTALA, R., LEINO, R., STÅHLBERG, T., AND VUENTO, R. Pathogenesis of Yersinia-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects. *Immunol Rev* 86 (Aug 1985), 47–70. (citado na página 17)
- [181] TONUSSI, C. R., AND FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 48, 3 (Mar 1992), 421–427. (citado na página 18)
- [182] TONUSSI, C. R., AND FERREIRA, S. H. TNF-alpha mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. *Pain* 82, 1 (Jul 1999), 81–87. (citado na página 66)
- [183] TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M. W., AND INOUE, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 6950 (Aug 2003), 778–783. (citado na página 7)
- [184] TWEEDIE, D., SAMBAMURTI, K., AND GREIG, N. H. TNF-alpha inhibition as a treatment strategy for neurodegenerative disorders: new drug candidates and targets. *Curr Alzheimer Res* 4, 4 (Sep 2007), 378–385. (citado nas páginas 76 and 78)
- [185] UMAPATHI, T., AND CHAUDHRY, V. Toxic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 18, 5 (Oct 2005), 574–580. (citado na página 79)
- [186] VERGE, G. M., MILLIGAN, E. D., MAIER, S. F., WATKINS, L. R., NAEVE, G. S., AND FOSTER, A. C. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci* 20, 5 (Sep 2004), 1150–1160. (citado nas páginas 7, 8, 9, 50, and 76)

- [187] VILA, M., JACKSON-LEWIS, V., GUÉGAN, C., WU, D. C., TEISMANN, P., CHOI, D. K., TIEU, K., AND PRZEDBORSKI, S. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14, 4 (Aug 2001), 483–489. (citado na página 3)
- [188] VITKOVIC, L., BOCKAERT, J., AND JACQUE, C. Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74, 2 (Feb 2000), 457–471. (citado na página 9)
- [189] WATKINS, L. R., AND MAIER, S. F. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol* 51 (2000), 29–57. (citado nas páginas 7 and 9)
- [190] WATKINS, L. R., AND MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82, 4 (Oct 2002), 981–1011. (citado nas páginas 4 and 7)
- [191] WATKINS, L. R., AND MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 2, 12 (Dec 2003), 973–985. (citado nas páginas 4, 5, 9, and 75)
- [192] WATKINS, L. R., MARTIN, D., ULRICH, P., TRACEY, K. J., AND MAIER, S. F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 71, 3 (Jul 1997), 225–235. (citado na página 9)
- [193] WATKINS, L. R., MILLIGAN, E. D., AND MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 24, 8 (Aug 2001), 450–455. (citado nas páginas 7, 11, 50, and 59)
- [194] WILF, G. S. D. E. *Digital Microscopy*. Elsevier Inc., 2007. (citado na página 23)
- [195] WILLIS, E. F., CLOUGH, G. F., AND CHURCH, M. K. Investigation into the mechanisms by which nedocromil sodium, frusemide and bumetanide inhibit the histamine-induced itch and flare response in human skin in vivo. *Clin Exp Allergy* 34, 3 (Mar 2004), 450–455. (citado na página 36)
- [196] WILLIS, W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res* 124, 4 (Feb 1999), 395–421. (citado nas páginas 10, 36, 74, 76, and 78)
- [197] WU, C. L., AND RAJA, S. N. An update on the treatment of postherpetic neuralgia. *J Pain* 9, 1 Suppl 1 (Jan 2008), S19–S30. (citado na página 79)
- [198] WU, L.-J., KO, S. W., AND ZHUO, M. Kainate receptors and pain: from dorsal root ganglion to the anterior cingulate cortex. *Curr Pharm Des* 13, 15 (2007), 1597–1605. (citado na página 9)

- [199] XU, J.-T., XIN, W.-J., WEI, X.-H., WU, C.-Y., GE, Y.-X., LIU, Y.-L., ZHANG, Y., ZHANG, T., LI, Y.-Y., AND LIU, X.-G. P38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. *Exp Neurol* 204, 1 (Mar 2007), 355–365. (citado na página 78)
- [200] YAKSH, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res* 458, 2 (Aug 1988), 319–324. (citado na página 10)
- [201] YELIN, E., AND KATZ, P. Introduction to special section: epidemiology of the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 61, 10 (Oct 2009), 1283. (citado na página 1)
- [202] ZAI, L. J., AND WRATHALL, J. R. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 50, 3 (May 2005), 247–257. (citado na página 7)
- [203] ZHAO, P., WAXMAN, S. G., AND HAINS, B. C. Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia-neuron signaling by prostaglandin E2 contributes to pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 27, 9 (Feb 2007), 2357–2368. (citado na página 8)
- [204] ZHUANG, Z.-Y., KAWASAKI, Y., TAN, P.-H., WEN, Y.-R., HUANG, J., AND JI, R.-R. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun* 21, 5 (Jul 2007), 642–651. (citado nas páginas 9, 75, and 76)
- [205] ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 2 (Jun 1983), 109–110. (citado na página 15)