

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

THAMYRIS REIS MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 ASSOCIADA ÀS
CÉLULAS DA GLIA NA GÊNESE DA DOR NEUROPÁTICA**

Alfenas/MG 2018

THAMYRIS REIS MORAES

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 ASSOCIADA ÀS
CÉLULAS DA GLIA NA GÊNESE DA DOR NEUROPÁTICA**

Texto apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Orientador: Professor Doutor Giovane Galdino de Souza

Alfenas/MG 2018

THAMYRIS REIS MORAES

“INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 ASSOCIADA
ÀS CÉLULAS DA GLIA NA GÊNESE DA DOR NEUROPÁTICA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Farmacologia da Dor.

Aprovado em: 13/07/18

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Assinatura:



Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Daniele Sirineu Pereira

Assinatura:



Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

Assinatura:



Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMG

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Educacional Santa Clara da Universidade Federal de
Alfenas

Moraes, Thamyris Reis.

Investigação da participação da quimiocina CXCL1 associada às
células da glía na gênese da dor neuropática / Thamyris Reis
Moraes. -- Alfenas, MG, 2018.

78 f.

Orientador: Giovane Galdino de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2018.

Bibliografia.

1. Nocicepção. 2. CXCL1. 3. Glía. 4. Dor Neuropática. I. Souza,
Giovane Galdino de. II. Título.

CDD-612

A Deus, meus pais Carlos e Mara e meu grande Amor Lucas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao Senhor Deus, dono da minha vida e dos meus sonhos por tamanho amor e misericórdia de me permitir a benção de realizar este trabalho para a honra e glória de Seu nome.

Agradeço ao meu orientador e mestre Professor Doutor Giovane Galdino de Souza pela oportunidade de aprender com ele, por toda paciência em ensinar, por se mostrar sempre solícito e humano e despertar em mim uma grande paixão que é a pesquisa.

Ao grande amor da minha vida Lucas que esteve ao meu lado em toda esta caminhada me encorajando para que eu pudesse sempre acreditar em mim. Por toda sua paciência nos momentos difíceis e por aceitar nossa distancia para que eu pudesse realizar este sonho.

Aos meus pais Carlos e Mara por me dar a vida e por sempre apoiarem meus sonhos e planos com tanto amor, não deixando com que eu desista e sempre sendo inspiração e motivação para que eu siga em frente, sendo meu porto seguro e alicerce. Agradeço também à minha amada irmã, na qual me presenteou com o Ailson que é como um irmão para mim e meus sobrinhos Sarah e Lucca, que dedico todo meu amor.

Aos amigos que a vida me trouxe, que torceram desde o início, deram força a cada obstáculo e comemoraram cada vitória durante a caminhada. Fica meu sincero agradecimento em especial à Dayanne, Rodrigo e Ariane. Aos amigos que a pós-graduação me deu, muitos hoje considerados irmãos, sempre presentes em todos os momentos, fossem eles experimentos, estudos ou até mesmo um café. Obrigada Isabella, Iago, Lívia, Ricardo e Luciana por toda a irmandade compartilhada. Obrigada Rafaela e Sheila por toda a atenção quando cheguei em Alfenas e pela amizade construída. Obrigada Rafaela Figueredo e Bianca por sempre serem tão disponíveis em me ajudar independentemente de qualquer troca, apenas bondade, vocês são pessoas das quais eu me inspiro em ser igual, um exemplo de pesquisadoras a se seguir. Agradeço de todo coração a todos os meus amigos, mesmo que não os liste aqui nome a nome, estes sabem que são e sabem seu papel em minha vida. Agradeço aos funcionários da Unifal que contribuíram para que meu trabalho fosse feito e ainda me presentearam com uma amizade. Deixo, então, meu sincero agradecimento.

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém”.

Romanos 11:36

RESUMO

A dor neuropática é originada a partir de uma lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial, acometendo entre 6,9% a 10% da população mundial e está relacionada a diminuição da qualidade de vida e do sono, além de, os pacientes serem pouco responsivos aos tratamentos atuais. Estudos têm demonstrado que não só os neurônios têm participação na modulação da dor neuropática, mas que as células da glia possuem papel fundamental neste processo pela da liberação de substâncias pró inflamatórias, como as quimiocinas, modulando o processo nociceptivo. Assim, o presente estudo investigou o envolvimento da quimiocina CXCL1 e das células da glia, sendo elas micróglia e astrócitos, na gênese da dor neuropática. Para tal, foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 250g a 300g. Foi utilizado o aparato Von Frey filamentos para avaliação do limiar nociceptivo e para a indução da dor neuropática foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCI). Para avaliar a expressão dos marcadores de micróglia (Iba1), astrócitos (GFAP) e da quimiocina CXCL1 foi utilizado o ensaio de Western Blot. O envolvimento dos receptores CXCR2 foi investigado utilizando o antagonista seletivo SB225002 e a participação de micróglia e astrócitos foi avaliada utilizando os inibidores minociclina e fluorocitrato, respectivamente. Além disso, o CXCL1 recombinante foi administrado i.t. para investigar o envolvimento dessa quimiocina na nocicepção. Os resultados demonstraram que os animais pré-tratados com o SB225002 apresentaram diminuição da nocicepção, indicando o envolvimento destes receptores na dor neuropática. Além disso, a CXCL1 recombinante foi capaz de causar nocicepção a nível espinal e a minociclina e o fluorocitrato reduziram a alodínia mecânica causada pela CXCL1 e pela CCI. Em adição, houve um aumento da expressão da quimiocina CXCL1 em animais submetidos à indução da neuropatia, demonstrando seu papel na dor neuropática. Nos animais submetidos à CCI houve aumento da expressão do marcador de micróglia Iba1, mas não do marcador de astrócito GFAP e o antagonista para CXCR2 foi capaz de diminuir a expressão dos marcadores de micróglia e astrócitos nestes animais. Sendo assim, o presente estudo sugere a presença dos receptores CXCR2 nas células da glia durante a dor neuropática, assim como o envolvimento da quimiocina CXCL1 na gênese dessa dor.

Palavras-chave: Nocicepção. CXCL1. Glia. Dor neuropática

ABSTRACT

Neuropathic pain is caused by injury or dysfunction of the somatosensory nervous system, affects between 6.9% and 10% of the world population and is related to decreased quality of life and sleep, besides patients do not respond to current treatments. Studies have shown that not only neurons play a role in the modulation of neuropathic pain, but glial cells play a key role in this process by releasing pro-inflammatory substances like chemokines, modulating the nociceptive process. Thus, the present study investigated the involvement of chemokine CXCL1 and glia cells, being microglia and astrocytes, in the genesis of neuropathic pain. Male Wistar rats weighing 250g to 300g were used. The Von Frey filaments apparatus was used to evaluate the nociceptive threshold and chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) was used for the induction of neuropathic pain. To evaluate the expression of the microglia markers (Iba1), astrocytes (GFAP) and the chemokine CXCL1 the Western blot assay was used. Involvement of the CXCR2 receptors was investigated using the selective antagonist SB225002 and the participation of microglia and astrocytes was evaluated using the minocycline and fluorocitrate inhibitors, respectively. In addition, recombinant CXCL1 was administered i.t. to investigate the involvement of this chemokine in nociception. The results showed that the animals pretreated with SB225002 had decreased nociception, indicating the involvement of these receptors in neuropathic pain. In addition, recombinant CXCL1 was able to cause nociception at the spinal level and minocycline and fluorocitrate reduced mechanical allodynia caused by CXCL1 and CCI. There was an increase in CXCL1 chemokine expression in animals submitted to neuropathy induction, demonstrating its role in neuropathic pain. In the animals submitted to CCI there was an increase in the expression of the microglial marker Iba1, but not the GFAP astrocyte marker GFAP, and the CXCR2 antagonist was able to decrease the expression of the microglial markers and astrocytes in these animals. Thus, the present study suggests the presence of CXCR2 receptors in glia cells during neuropathic pain, as well as the involvement of CXCL1 chemokine in the genesis of this pain.

Key words: Nociception. CXCL1. Glia. Neuropathic Pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tipos de Fibras Aferentes	19
Figura 2 -	Via ascendente da dor	20
Figura 3 -	Estrutura das quimiocinas	26
Figura 4 -	CXCL1 – Estrutura química	31
Figura 5 -	Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático	35
Figura 6 -	Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático	36
Figura 7 -	Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático	36
Figura 8 –	Teste de Von Frey Filamentos	38
Figura 9 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata após cirurgia de constrição crônica do nervo ciático	41
Figura 10 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para a avaliação da participação dos receptores CXCR2	41
Figura 11 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocina CXCL1	42
Figura 12 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocinas CXCL1 para avaliação do envolvimento da micróglia espinal	43
Figura 13 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocinas CXCL1 para avaliação do envolvimento de astrócitos espinais.....	43
Figura 14 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para investigação do envolvimento da micróglia na dor neuropática.....	44
Figura 15 -	Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para investigação do envolvimento de astrócitos na dor neuropática.....	44
Figura 16 -	Esquema do delineamento para o ensaio molecular para avaliação dos níveis proteicos de CXCL1.	45
Figura 17 -	Esquema do delineamento para o ensaio molecular para avaliação dos níveis proteicos de Iba1 e GFAP.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey em animais submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático e animais falso operados	49
Gráfico 2 -Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey na pata contralateral em animais submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático e animais falso operados	50
Gráfico 3 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação da participação do receptor CXCR2 através do efeito de diferentes doses de seu antagonista na dor neuropática induzida por CCI.....	51
Gráfico 4 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação da participação da quimiocina CXCL11 em duas diferentes doses na nocicepção.....	52
Gráfico 5 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento da micróglia na nocicepção induzida por CXCL1	53
Gráfico 6 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento de astrócitos na nocicepção induzida por CXCL1	55
Gráfico 7 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento da micróglia na neuropatia induzida por CCI..	56
Gráfico 8 -	Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento de astrócitos na neuropatia induzida por CCI..	57
Gráfico 9 -	Investigação da expressão da quimiocinas CXCL1 na neuropatia induzida por CCI.....	58
Gráfico 10 -	Investigação da participação dos receptores CXCR2 na micróglia espinal na neuropatia induzida por CCI.....	60
Gráfico 11 -	Investigação da participação dos receptores CXCR2 em astrócitos espinais na neuropatia induzida por CCI.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C -	Grau Celsius
μL -	Microlitro
μg -	Micrograma
AMPA -	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
CCI –	<i>“Chronic constriction injury”</i>
CGRP –	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CINC-1 -	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1</i>
c-JNK -	c-Jun N-terminal quinase
DMSO -	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
ERK -	Proteínas cinases reguladas por sinal extracelular
FC –	Fluorocitrato
g -	Grama
GFAP -	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GPCRs –	<i>G protein–coupled receptor</i>
GRD –	Gânglio da raiz dorsal
GRO-α -	<i>Growth regulated α protein -α</i>
HCl –	Ácido clorídrico
IL-1β –	Interleucina 1-beta
IL-6 –	Interleucina-6
IASP -	<i>International Association for the Study of Pain</i>
Iba1 -	Marcador microglial
i.p. -	Intraperitoneal

i.t. -	Intratecal
kDa -	Kilodalton
KC -	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
Kg –	Kilograma
L -	Litro
MAPK p38 -	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
Min -	Minutos
Mino –	Minociclina
Mg -	Miligrama
mL -	Mililitro
NFkB –	Fator nuclear kappa B
Ng -	Nanograma
Nmol -	Nanomol
NMDA -	N-metil-D-aspartato
NRK-52e -	Linhagem de células epitelióides renais
NO –	Óxido nítrico
O2 -	Oxigênio
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
PGDF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH -	Potencial hidrogeniônico
PI3K -	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-kinase
PTX -	Toxina pertússis
RNAm –	RNA mensageiro
Rpm –	Rotações por minuto

ROS –	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC -	Sistema nervoso central
SNP –	Sistema nervoso periférico
TNF-α –	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV1 –	Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1
V –	Voltz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
2.2	DOR NEUROPÁTICA	21
2.3	CÉLULAS DA GLIA E A MODULAÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA.....	23
2.4	CITOCINAS E QUIMIOCINAS	25
2.5	QUIMIOCINAS E DOR NEUROPÁTICA	28
2.6	CXCL1 e CXCR2.....	30
3	OBJETIVOS	33
3.1-	OBJETIVOS GERAIS	33
3.2-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	ANIMAIS	34
4.2	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA	34
4.3	DROGAS UTILIZADAS	37
4.4	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	37
4.5	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO.....	38
4.6	ANÁLISE DE WESTERN BLOT	39
4.7	DELINEAMENTO DO ESTUDO	40
4.8	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO (CCI).....	48
5.2	ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR CXCR2 NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI	50
5.3	PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA NOCICEPÇÃO.....	52
5.4	ENVOLVIMENTO DA MICRÓGLIA ESPINAL NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA QUIMIOCINA CXCL1	53
5.5	ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA QUIMIOCINA CXCL1	54
5.6	ENVOLVIMENTO DA MICRÓGLIA ESPINAL NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI	55

5.7 ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI.....	57
5.8 ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI	58
5.9 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 EM ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI.....	59
5.10 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 EM ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI.....	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

A dor, em condições normais, é gerada para induzir uma resposta adaptativa e protetora afim de facilitar a recuperação e evitar mais danos teciduais. Quando a lesão é prolongada, a excitação contínua dos neurônios nociceptivos primários causa dor crônica e diversos estudos demonstraram que a dor crônica, em especial a dor neuropática, pode afetar adversamente a qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes, incluindo o estado emocional (DWORKIN et al., 2010; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Além do dano psicológico, pacientes que sofrem de neuropatias podem sentir dor causada por estímulos que normalmente não são dolorosos, como simples toque da pele ou por mudanças na temperatura, bem como respostas exageradas a estímulos nocivos (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013).

Durante o processo da dor neuropática ocorre uma amplificação das respostas dolorosas oriundas da lesão periférica que chegam até a medula espinhal, onde é realizada a primeira sinapse nociceptiva. Tradicionalmente, esse fenômeno tem sido uma resposta puramente neuronal. Porém evidências pré-clínicas têm demonstrado a contribuição de células não neuronais, como micróglia e astrócitos que em nível medular sofrem mudanças morfológicas, liberando citocinas e quimiocinas que contribuem para a gênese e manutenção da dor neuropática (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013; ZIMMERMANN, 2001).

As quimiocinas são consideradas citocinas de baixo peso molecular e sua principal função está relacionada à migração de células imunes além de possuírem relação com a dor neuropática, pois são expressas por células do sistema nervoso central sob condições de lesão (MOSER; LOETSCHER, 2001; WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005). Nos estados de dor neuropática, a sinalização da quimiocina CX3CL1 e seu receptor CX3CR1 é proposta como um mediador chave da comunicação neuronal-microglial. Isso ocorre pela fosforilação de proteínas cinases e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que são capazes de sensibilizar neurônios, estabelecendo assim um mecanismo de feedback positivo que contribui para um estado de dor crônica, porém esta sinalização também está envolvida em processos homeostáticos e neuroprotetores, despertando cuidado ao utilizá-lo como possível alvo terapêutico (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013).

Em relação a participação da quimiocina CXCL1 na resposta nociceptiva, alguns estudos têm associado o aumento dos níveis plasmáticos dessa quimiocina com a dor pós-operatória em ratos e humanos (LORAM et al., 2007). Já em nível central, um estudo encontrou que a injeção intrecerebroventricular de CXCL1 reduziu o limiar nociceptivo avaliado por um

teste de pressão de patas em ratos, sugerindo que a CXCL1 facilita o impulso nociceptivo mecânico no sistema nervoso central (SNC) (YAMAMOTO et al., 1998).

Inúmeros estudos têm evidenciado o importante papel das células da glia na sensibilização do impulso nociceptivo a nível espinhal e as citocinas estão recebendo crescente interesse como moduladores da plasticidade neuronal e aumento da transmissão nociceptiva sob condições neuropáticas. Assim, o presente trabalho enfatizou investigar o papel da quimiocina CXCL1, o qual tem demonstrado relação na resposta nociceptiva, em relação com as células gliais durante a gênese da dor neuropática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos abaixo apresentarão a revisão de literatura e contextualizações referentes ao estudo.

2.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor, segundo a Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP), é conceituada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais danos. Assim, apresenta aspectos multidimensionais e é classificada por muitos pesquisadores como um fenômeno “biopsicossocial”(LOESER; TREEDE, 2008).

Em condições normais, a dor é considerada um sistema adaptativo e protetor, sendo utilizado pelo corpo como alerta para facilitar a recuperação de danos e fisiologicamente integrada à retirada motora por meio ao arco reflexo, quando associada a dor aguda (MILLIGAN; WATKINS, 2009). No entanto, a dor crônica a longo prazo, leva a estados de anedonia, depressão e, portanto, não pode ser considerada adaptativa (MILLAN, 1999). Além disso, a dor pode ser classificada como nociceptiva e patológica e também pode ser dividida em tipos considerando a duração, podendo ser aguda, com duração de horas a dias; e crônica, com duração de meses a anos e ainda ambos os tipos podem levar a estados de alodinia e hiperalgesia (MILLIGAN; WATKINS, 2009; MILLAN, 1999). De acordo com o protocolo de terminologia básica proposto pela IASP, a alodinia é uma condição em que a dor é produzida por estímulos inócuos pela ativação periférica de receptores táteis. Já a hiperalgesia é paralela às condições de “sensibilização”, ou seja, está relacionado ao aumento da sensibilidade à dor (JULIUS; BASBAUM, 2001; LOESER; TREEDE, 2008). É também importante ressaltar que, de acordo com Loeser et al. (2008), existe diferença entre os termos nocicepção e dor. O componente fisiológico da dor, relacionado à codificação e processamento do estímulo nocivo é denominado nocicepção. Já a dor implica em uma experiência consciente, acompanhada da diminuição da qualidade de vida e sofrimento, debilitando os portadores deste sintoma (BALIKI; APKARIAN, 2015; CHAPMAN; GAVRIN, 1999).

Do ponto de vista fisiológico, os estímulos nocivos são detectados por nociceptores compostos de uma rede de fibras nervosas caracterizadas de acordo com critérios anatômicos e funcionais, sendo elas: fibra C não mielinizadas e fibras A δ levemente mielinizadas conhecidas como nociceptores (JULIUS; BASBAUM, 2001; KUNER, 2010). A fibra C possui pequeno diâmetro e condução lenta do impulso, devido ausência da bainha de mielina, porém é capaz de detectar desde estímulos inócuos até estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Já as fibras A δ apresentam médio calibre e respondem a estímulos nocivos térmicos, químicos e mecânicos mais rapidamente que as fibras C devido à presença de mielina conforme exemplificado na figura 1. Existem também as fibras A β , que são fibras de maior diâmetro e altamente mielinizadas que detectam estímulos inócuos e não contribuem para a transmissão da dor. (JULIUS; BASBAUM, 2001).

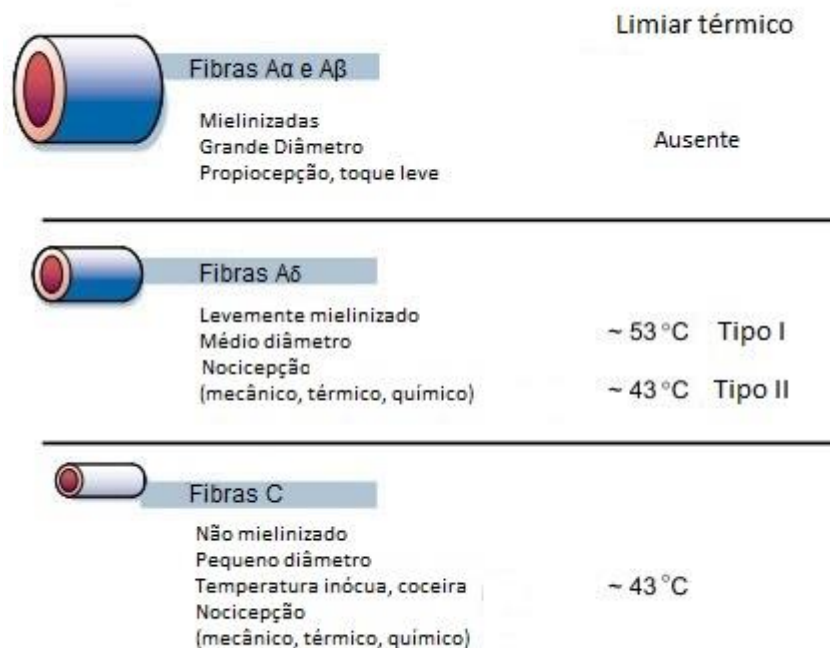


Figura 1 – Tipos de Fibras Aferentes

Nota: Tipos de fibras aferentes primárias. As fibras do tipo A α e A β são fibras de grande diâmetro, altamente mielinizadas e conduzem estímulos inócuos. As fibras do tipo A δ são de médio diâmetro, levemente mielinizadas e contribuem para a dor detectando estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Já as fibras do tipo C não são mielinizadas, possuem pequeno diâmetro e são capazes de detectar estímulos inócuos e nociceptivos.

Fonte: (JULIUS; BASBAUM, 2001)

Após os estímulos nocivos serem reconhecidos pelos nociceptores, eles são convertidos em potenciais elétricos e conduzidos até o corno dorsal da medula espinal. Estes nociceptores possuem canais especializados, que promovem a transdução do estímulo nocivo em potenciais de ação transmitindo-o até seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) que então farão sinapse com neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinal, levando o impulso, por meio de tratos ou vias, até os centros supra espinais de processamento da dor para que o mesmo seja interpretado, conforme na figura 2. Quando ocorrem lesões do nervo ou inflamações prolongadas, o tecido lesado pode também sensibilizar neurônios no corno dorsal da medula. Este fenômeno é conhecido como sensibilização central, que de acordo com Melzack e Wall (1965), decorre da sensibilização de nociceptores periféricos e da estimulação das fibras aferentes que no corno dorsal da medula são amplificados modulando a resposta, mesmo antes de ser interpretada pelo cérebro como sensação dolorosa (MILLIGAN; WATKINS, 2009)

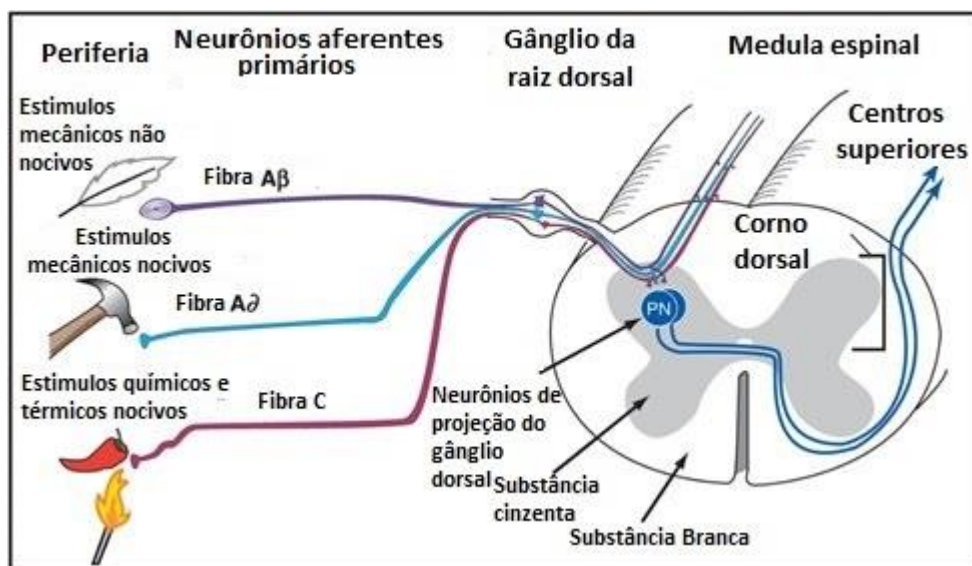


Figura 2- Via ascendente da dor

Nota: A detecção de um estímulo nocivo ocorre nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários e leva à geração de potenciais de ação que se propagam ao longo do axônio até os terminais centrais. Os neurônios aferentes primários têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e enviam terminais para a medula espinal.

Fonte: (Basicmedical Key, 2017)

2.2 DOR NEUROPÁTICA

A IASP define a dor neuropática como uma dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso periférico (SNP) ou do SNC. (PLEGER et al., 2005) e pode resultar em alterações complexas em funções cerebrais cognitivas e emocionais. Geralmente ela acompanha uma variedade de condições, incluindo a lesão de nervos periféricos, lesão do SNC, como por exemplo na esclerose múltipla, lesão da medula espinal, infecções virais como neuralgia pós-herpética e HIV, tumores, e perturbações metabólicas, tais como o diabetes mellitus. Os mecanismos deste tipo de dor não estão bem elucidados, refletindo negativamente na eficácia dos tratamentos (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013). A dor neuropática está associada a problemas de saúde geral e também está relacionada à diminuição da qualidade de vida e sono. Segundo Van Hecke et al. (2014) a prevalência de dor com característica neuropática está entre 6,9% e 10% da população e uma razão para esta alta taxa de prevalência é a ausência de tratamentos efetivos (COHEN; MAO, 2014). Os pacientes relatam depressão e ansiedade quando comparados a portadores de dor de origem não neuropática e tal queda na qualidade de vida ocorre independentemente da severidade ou duração da neuropatia, além de os pacientes serem pouco responsivos a farmacoterapia (SMITH; TORRANCE, 2012).

Ainda que todos os distúrbios que causam a dor neuropática sejam causados a partir de danos no sistema nervoso somatossensorial, existem diferenças entre suas etiologias (BARON et al., 2017). Sendo assim, a dor neuropática pode ser caracterizada como periférica ou central, sendo que, quando periférica provém da disfunção ou lesão do SNP, por exemplo: neuralgia pós herpética e diabetes mellitus. Já a dor neuropática central tem como causa a lesão ou disfunção do SNC, como lesão medular ou acidente vascular cerebral, dentre outras causas (KERSTMAN et al., 2013).

Uma combinação de sinais e sintomas se apresentam na dor neuropática e podem ser classificados como espontâneos (independente de estímulos) nos quais pacientes relatam sensações de queimação e choque, ou evocados (dependente de estímulos) como a alodinia e hiperalgesia, além de sintomas como parestesia, dormência, coceira e formigamento, considerados sensações anormais. (DWORKIN et al., 2003).

A dor neuropática periférica se apresenta de maneira secundária a uma doença inicial ou lesão que afeta o sistema somatossensorial periférico e se desenvolve a partir da alteração metabólica, formação de espécies reativas de oxigênio, alterações na sinalização intracelular e

de canais iônicos que juntamente levam à degeneração axonal e sintomas de dor neuropática (CASHMAN; HÖKE, 2015).

As lesões ou disfunções no sistema somatossensorial fazem com que os sinais de dor sejam transmitidos erroneamente para diversos centros de dor. No caso da dor neuropática, ocorrem mudanças na função do nervo e na área ao redor do nervo. Na periferia, medula espinhal e cérebro, o aumento de excitabilidade e perda de inibição são aparentes. Essas mudanças deslocam as vias sensoriais para um estado de hiperexcitabilidade, contribuindo para que o estado de dor neuropática se torne crônico (ARONOFF, 2016). Este fenômeno tem sido considerado uma resposta puramente neuronal, porém novas evidências indicam a contribuição de células não neuronais que secretam diversos mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas capazes de modular a função nociceptiva. No nervo periférico há a infiltração de células da imunidade inata e adaptativa na fase inicial da dor. Na medula espinhal as células residentes da glia passam por alterações morfológicas e aumentam sua resposta, assim como a síntese e liberação de substâncias que contribuem para a dor.(CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013).

Em resumo, a lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial, durante a dor neuropática, produz uma cascata de eventos celulares no sistema nervoso que inclui a ativação de vários tipos de células em nervos periféricos e GRD, formando uma resposta neuroinflamatória com a liberação de mediadores químicos, incluindo muitas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e, finalmente, aumento da excitabilidade neuronal. Juntos, esses eventos provavelmente contribuirão para a alodinia, hiperalgesia e outros fenômenos que compõem a gênese da dor neuropática (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005).

Em particular, a dor neuropática crônica resultante da lesão do nervo periférico é um problema clínico significativo, que muitas vezes se mostra refratário aos tratamentos atuais, em parte devido ao fato dos mecanismos serem insuficientemente compreendidos e à falta de investigação da resposta neuroinflamatória que frequentemente acompanha a lesão nervosa periférica e as síndromes de dor neuropática resultantes de modo que, a cascata de eventos inflamatórios que acompanha a maior parte da lesão do tecido nervoso é um dos principais contribuintes para o estabelecimento e manutenção da dor neuropática (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013; WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005).

2.3 CÉLULAS DA GLIA E A MODULAÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA

Durante o processo da dor neuropática ocorre uma amplificação das respostas dolorosas oriundas da lesão periférica que chegam até a medula espinhal, onde é realizada a primeira sinapse nociceptiva. Tradicionalmente, esse fenômeno é considerado uma resposta puramente neuronal, no entanto, algumas células do SNC, como as células da glia, foram recentemente reconhecidas como moduladores da dor, além de suas outras funções (MILLIGAN; WATKINS, 2009; ZIMMERMANN, 2001).

As células da glia correspondem a 70% das células do sistema nervoso central, elas não transmitem impulsos nervosos, porém atuam na síntese, liberação e captação de neurotransmissores. Além disso, as células da glia desempenham um papel protetor pelo seu envolvimento na formação da barreira hematoencefálica e no desenvolvimento da bainha de mielina além da contribuição para a nutrição dos neurônios e mecanismos de defesa (MIKA et al., 2013).

Diferentemente dos neurônios, cuja ativação se deve à produção de potenciais de ação, as células da glia têm seu estado de ativação considerado multidimensional devido às diversas funções desempenhadas quando ativadas (WATKINS; MAIER, 2003). No sistema nervoso central as células da glia consistem em três principais grupos, sendo eles: astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, sendo que astrócitos e micróglia têm sido as principais células envolvidas na modulação neuroimune da dor (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013).

Os astrócitos são as células da glia mais abundantes no sistema nervoso central. São capazes de manter uma homeostase por meio da regulação dos níveis extracelulares de proteínas, neurotransmissores e íons em seu ambiente. Têm funções vitais abundantes na fisiologia do sistema nervoso central como a formação e manutenção da barreira hematoencefálica, regulação metabólica e suporte da transmissão sináptica, de modo que sua disfunção está associada principalmente a doenças neurodegenerativas (MIKA et al., 2013; MOLOFSKY; DENEEN, 2015). Sua ativação leva a alterações morfológicas como hipertrofia e aumento da produção de um marcador de astrócitos chamado proteína ácida fibrilar glial (GFAP), além do aumento funcional da produção de substâncias pró-inflamatórias, como citocinas (WATKINS; MAIER, 2003).

A micróglia se apresenta em estado quiescente, ou seja, em “repouso”, com morfologia ramificada, pouca ou nenhuma expressão de receptores e marcadores de superfície celular. São células consideradas originárias de uma linhagem celular monocítica de origem mesodérmica

(mielóide) e entram no SNC durante o desenvolvimento fetal. As células microgлияis são semelhantes a macrófagos no SNC e estão envolvidas no desenvolvimento cerebral a partir de interações com as sinapses cerebrais para o desenvolvimento normal do cérebro através da ativação da cascata do sistema complemento. Possuem um papel fundamental na resposta às lesões diretas no sistema nervoso central como trauma ou isquemia, em doenças autoimunes como esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013; SCHOLZ; WOOLF, 2007).

Quando ativada, a micróglia sofre alterações morfológicas como hipertrofia, proliferação, aumento dos marcadores de superfície celular e receptores, além de alterações nas atividades funcionais, por exemplo a liberação de substâncias pró-inflamatórias, sendo que as alterações funcionais podem ocorrer na ausência das alterações morfológicas, dependendo da intensidade do estímulo (SCHOLZ; WOOLF, 2007; WATKINS; MAIER, 2003).

Os mecanismos pelos quais a ativação glial aumenta a transmissão neuronal da informação nociceptiva ainda não estão completamente compreendidos, porém sabe-se que a glia ativada libera substâncias que atuam na modulação da dor. Dentre as variadas ações destas substâncias podem estar listadas o aumento da excitabilidade, sensibilização ou a potencialização de potenciais de ação e indução da liberação de substâncias que podem atuar em neurônios de segunda ordem gerando hiperalgesia e alodinia. Além disso, as células da glia podem contribuir para o processamento da dor neuropática através da liberação de moléculas de sinalização glial e neuronal, como por exemplo citocinas e quimiocinas que podem levar a efeitos patológicos como neurotoxicidade e inflamação crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009; WATKINS; MAIER, 2003).

A ativação microglial induzida por lesão de nervo é caracterizada pela fosforilação (ativação) de proteínas cinases, como proteínas cinases ativadas por mitógeno p38 (MAPK), proteínas cinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK), entre outras. Três vias de sinalização medeiam o recrutamento da micróglia espinal residente e são ativadas a partir da ligação das quimiocinas CX3CL1 (fractalcina) atuando em seu receptor CX3CR1; CCL2 sinalizando através do receptor CCR2 e os receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*) (SCHOLZ; WOOLF, 2007).

A ativação de astrócitos é facilitada devido ao seu contato próximo aos neurônios, através da neurotransmissão, uma vez que os astrócitos expressam diversos receptores para neurotransmissores, como os receptores ionotrópicos de glutamato AMPA (Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores purinérgicos, receptores de substância P, dentre outros. Na ativação astrocitária, são ativadas

vias de sinalização de sinal extracelular (ERK) e c-Jun N-terminal quinase (c-JNK), dentre outras (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Tanto a ativação de células microgliais quanto na de astrócitos levam ao aumento da síntese de fatores inflamatórios, como interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e óxido nítrico (NO), que são capazes de atuar sobre receptores presentes nos neurônios (MILLIGAN; WATKINS, 2009). O reconhecimento do envolvimento dessas células na modulação da dor pode trazer nova abordagem de tratamento, de extrema necessidade, uma vez que as terapias convencionais não têm efeitos satisfatórios na dor neuropática e produzem efeitos colaterais indesejáveis (SCHOLZ; WOOLF, 2007).

2.4 CITOCINAS E QUIMIOCINAS

As citocinas e quimiocinas são proteínas que coordenam a resposta imune por todo o corpo e sua desregulação está relacionada ao desenvolvimento da neuroinflamação, neurodegeneração e desmielinização tanto no sistema nervoso central e periférico como em condições de dor neuropática. (RAMESH; MACLEAN; PHILIPP, 2013).

As citocinas são proteínas sinalizadoras, com tamanho inferior a 80kDa, que possuem ampla atuação nas funções biológicas, como a imunidade inata e adquirida, hematopoiese, inflamação, reparo e proliferação (CHUNG, 2002). Elas estão envolvidas em interações célula-a-célula atuando predominantemente de forma parácrina, ou seja, em células adjacentes, porém podem atuar de forma autócrina, na própria célula de origem, ou quando secretadas em grandes quantidades frente a estímulos potentes podem alcançar a corrente sanguínea e atuar de maneira endócrina em células distantes (CHUNG, 2002; MURPHY, 2014).

Já as quimiocinas são consideradas citocinas de baixo peso molecular, entre 7 e 15kDa, e sua importante função é na migração de células imunes. As quimiocinas podem ser consideradas pró-inflamatórias, com a liberação induzida pela resposta imune ou homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos. As primeiras quimiocinas biologicamente ativas foram descobertas no final dos anos 80 e início dos anos 90. Elas têm uma alta especificidade na indução do recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos (MOSER; LOETSCHER, 2001; PALOMINO; MARTI, 2015). Além disso, um dos estudos pioneiros na descoberta das quimiocinas utilizou-se uma linhagem de células de glioma humano e observou-se o aumento da atividade quimioatraente

de monócitos, mas não de neutrófilos por dois tipos de peptídeos derivados das células de glioma identificados com composições diferentes de citocinas já descritas até então (TANG; WANG, 2018; YOSHIMURA et al., 1989).

Até o momento, foram identificadas aproximadamente 40 quimiocinas. Elas atuam principalmente em neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos controlando a migração e o posicionamento das células imunológicas por meio de interações com um subconjunto de receptores acoplados à proteína G. As quimiocinas foram divididas em quatro principais subfamílias com base no arranjo dos dois resíduos de cisteína N-terminais (Figura 3). Primeiramente foram descritas as famílias CXC e CC, dependendo se os dois primeiros resíduos de cisteína têm um aminoácido entre eles (CXC) ou são adjacentes (CC). Duas outras classes de quimiocinas foram descritas posteriormente, como a linfotactina (C ou SCYc) e fractalcina (CX3C ou SCYd). A primeira delas carece das cisteínas um e três da estrutura quimiocina típica, enquanto a última apresenta três aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas e é também a única quimiocina ligada à membrana através de uma haste do tipo mucina (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

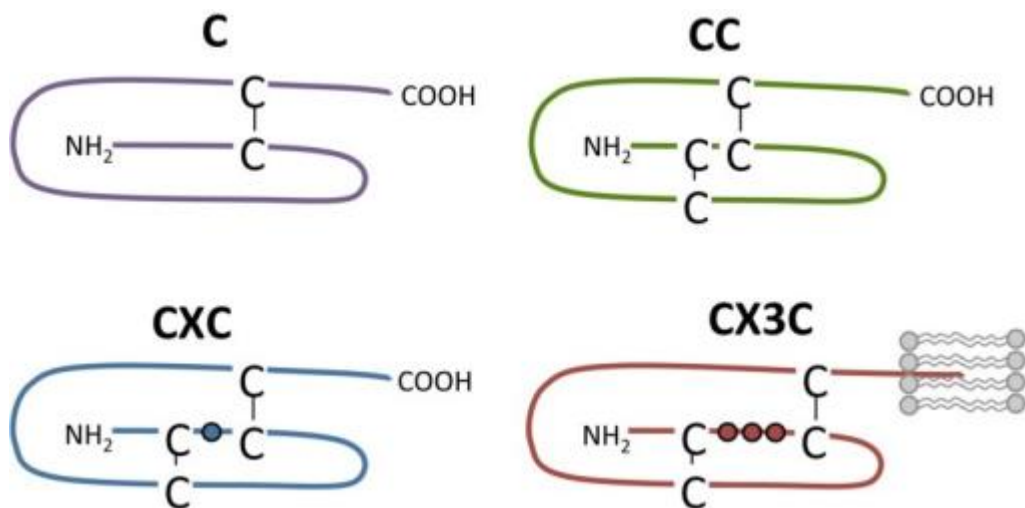


Figura 3- Estrutura das quimiocinas

Nota: As quimiocinas são divididas em quatro famílias de acordo com o número e a organização dos resíduos de cisteína conservados no seu terminal-N. O domínio transmembrana de CX3CL1 é representado por lipídios (em cinza).

Fonte: (MUNNIK et al., 2015)

As quimiocinas são divididas em duas categorias baseadas em sua atividade biológica, sendo elas: quimiocinas homeostáticas e quimiocinas inflamatórias, envolvidas na manutenção

da homeostase e indução da inflamação, respectivamente (RAMESH; MACLEAN; PHILIPP, 2013).

Em condições normais, as quimiocinas homeostáticas atuam na regulação do transporte celular para que tais células sejam direcionadas a tecidos e órgãos específicos afim de manter uma composição leucocitária consistente em preparação para respostas imunes desencadeadas por danos. Pode-se citar como exemplo as quimiocinas homeostáticas do sistema nervoso central, expressas na vasculatura da barreira hematoencefálica, que regulam a entrada de leucócitos no SNC para ação imunológica, como as CXCL12, CCL19, CCL20 e CCL21 (CHEN et al., 2018).

Diferentemente das quimiocinas homeostáticas, as quimiocinas inflamatórias não são expressas em altos níveis na ausência do dano tecidual, ou seja, são expressas por leucócitos circulantes e outros tipos de células após sua ativação, durante uma situação inflamatória. Sua expressão é frequentemente desencadeada por mediadores pró-inflamatórios e produtos microbianos afim de facilitar a resposta imune (CHEN et al., 2018, RAMESH; MACLEAN; PHILIPP, 2013).

As quimiocinas inflamatórias incluem CCL1-5 e CXCL1-11. Em geral, as CXCL1-8 regulam a migração de neutrófilos e as CXCL9-11 regulam a migração de células T ativadas. A maioria das quimiocinas CC inflamatórias induz quimiotaxia de monócitos, macrófagos e células T (CHEN et al., 2018). Quase todos os leucócitos expressam padrões complexos de receptores acoplados à proteína G para quimiocinas, os quais permitem respostas a diversas quimiocinas induzidas sob condições de inflamação (CHEN et al., 2018).

As quimiocinas também são abundantemente expressas em neurônios, células da glia e células progenitoras neurais, que são os principais tipos de células do sistema nervoso. De fato, todas essas células podem elaborar a síntese de quimiocinas, particularmente sob condições de lesão do SNC, na qual potencialmente iniciam-se uma cascata de eventos que leva à neuroinflamação, que pode ser potencializada pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Essas respostas neuroinflamatórias podem ocorrer no SNC e são claramente importantes no estabelecimento da dor neuropática (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005).

Os receptores de quimiocinas são compostos por quatro subfamílias baseadas nos resíduos de cisteína N-terminais, sendo denominados CCR, CXCR, CX3CR e XCR e possuem como característica proeminente a não seletividade, ou seja, algumas quimiocinas podem se ligar em mais de um receptor ou um receptor pode se ligar a mais de uma quimiocina diferente (CHEN et al., 2018). Além disso, os receptores que as quimiocinas agem são divididos em dois

grupos: receptores de quimiocinas acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G-protein-coupled receptors*), compostas por três subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$), que sinalizam pela ativação de proteínas G do tipo G_i sensíveis à toxina pertússis (PTX) e os receptores atípicos de quimiocinas, que agem de uma forma que não depende da proteína G (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; MURPHY, 2014).

Os receptores atípicos de quimiocinas, inicialmente foram chamados de receptores “silenciosos” por não ativarem eventos de sinalização convencionais, mas apesar de não promoverem a sinalização através da proteína G, os receptores atípicos tem capacidade de internalizar, degradar ou transportar ligantes e assim modificar gradientes e criar padrões funcionais de quimiocinas nos tecidos (GRAHAM et al., 2012). Os receptores acoplados à proteína G de quimiocinas são expressos principalmente pelos leucócitos e sua principal função foi originalmente proposta para guiar o tráfego e o *homing* de leucócitos, ativando integrinas, gerando ânions superóxidos e liberando o conteúdo dos grânulos. Essas funções constituem uma das primeiras linhas de defesa frente a microorganismos invasores e lesão tecidual, porém, na última década, as quimiocinas e seus GPCRs também foram implicados em muitos processos fisiopatológicos essenciais, incluindo desenvolvimento, angiogênese, homeostase epitelial, progressão do câncer e dor. Estes receptores de quimiocinas não estão limitados aos leucócitos, mas podem também ser expressos em outros tipos de células como micróglia e astrócitos (CHEN et al., 2018; HE et al., 1997; OLD; MALCANGIO, 2012).

2.5 QUIMIOCINAS E DOR NEUROPÁTICA

Quando há um dano no SNP e no tecido não nervoso circundante, uma resposta inflamatória é induzida, gerando aumento do suprimento sanguíneo local, alterações na permeabilidade capilar e migração dos leucócitos do sangue periférico para o local da lesão, facilitando os mecanismos de defesa e reparo, com consequente sensibilização do nociceptor aferente e dor (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005).

Dentro desse contexto, citocinas, radicais livres, fatores de transcrição, como NF- κ B, e quimiocinas medeiam a resposta inflamatória, que é amplificada pelas células gliais do SNC (micróglia e astrócitos) e no caso do SNP, células satélites e de Schwann sendo que, tanto as células gliais do SNC como as do SNP sofrem alterações morfológicas e aumentam a síntese

de substâncias pró-inflamatórias como quimiocinas e citocinas (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005).

Além da quimiotaxia, as quimiocinas podem estar diretamente envolvidas na mediação da dor. Uma das primeiras sugestões sobre a ação das quimiocinas na nocicepção foi através de um estudo feito por Cunha et al. (1991), em que foi avaliado o efeito hiperalgésico da quimiocina CXCL8, avaliado pelo teste mecânico de pressão na pata de ratos, no qual encontraram uma resposta hiperalgésica dose-dependente (CUNHA et al., 1991).

Um outro estudo feito por Ribeiro et al. (2000), mostrou que a resposta nociceptiva frente ao teste de contorção induzida por ácido acético e zymosan (componente da parede celular da levedura *Saccharomyces cereviae*) em camundongos, foi dependente da ativação de macrófagos residentes e mastócitos, que liberam TNF- α , IL-1 β e CXCL8. Além disso, os autores encontraram que a administração intraperitoneal de um antissoro específico para o CXCL8 bloqueou parcialmente a resposta nociceptiva. Considerando que a injeção intraperitoneal de TNF- α , IL-1 β ou CXCL8 separadamente não induziu o efeito nociceptivo. No entanto, a injeção de uma mistura contendo as três citocinas recombinantes causou uma resposta nociceptiva significativa, sugerindo que o efeito nociceptivo é resultante de um efeito sinérgico das três substâncias e que a quimiocina depende das citocinas para produzir nocicepção (RIBEIRO et al., 2000).

Em adição, ensaios de imunocitoquímica e PCR em tempo real demonstraram que neurônios do GRD estão ativamente envolvidos na sinalização de quimiocinas e que estes neurônios expressam os receptores para quimiocinas do tipo CCR4 e CCR5, bem como, CXCR4 e CX3CR1 (OH et al., 2001). Além disso, um estudo encontrou que a estimulação desses receptores em neurônios sensoriais isolados induziu mobilização de cálcio, diminuição do limiar para geração de potencial de ação e a liberação de Substância P (OH et al., 2001)

A expressão, distribuição e função de quimiocinas e seus receptores na dor neuropática são investigadas em diferentes modelos animais. Embora várias quimiocinas e seus respectivos receptores tenham sido implicados neste tipo de dor, a CX3CL1 juntamente com seu receptor CX3CR1 e a CCL2 com o CCR2 são as mais investigadas. Estudos demonstraram que a interação CX3CL1/CX3CR1 e CCL2/CCR2 produziram comportamentos de alodinia e hiperalgesia térmica em modelos de dor neuropática, os quais foram atenuados por anticorpos neutralizantes ou antagonistas contra tais quimiocinas ou o receptor, respectivamente (BOGEN et al., 2009; MILLIGAN et al., 2005, 2004). Em adição, um outro estudo demonstrou que a CXCL12 via CXCR4 está implicada na dor neuropática associada ao HIV-1 (GAO; JI, 2010).

Visto que, a maioria dos estudos têm investigado o envolvimento das quimiocinas CCL2 e CX3CL1 na gênese da dor neuropática, o presente estudo objetivou investigar e ampliar o conhecimento do envolvimento da quimiocina CXCL1 nesse tipo de dor.

2.6 CXCL1 e CXCR2

CXCL1 é uma das quimiocinas pertencentes à família CXC, ou seja, possui um resíduo de aminoácido entre dois resíduos de cisteína. Em camundongos, essa quimiocina também é conhecida como quimiocina derivada de queratinócitos (do inglês a sigla KC) e em ratos como quimioatrativo de neutrófilos induzido por citocina-1 (CINC-1) (SILVA et al., 2017). Já em humanos, ela é conhecida como oncogene regulado pelo crescimento- α (GRO- α).

Em camundongos a KC foi identificada a partir de sua superexpressão em queratinócitos, monócitos e macrófagos murinos através da estimulação por PGDF (fator de crescimento derivado de plaquetas) (COCHRAN; REFFEL; STILES, 1983). Em ratos a CINC-1 foi descrita como um fator quimiotático para leucócitos polimorfonucleares secretados pela linhagem de células epitelióides renais de ratos NRK-52E em resposta à IL-1 β (WATANABE; NAKAGAWA, 1987). Posteriormente, foram reconhecidas grandes semelhanças estruturais entre GRO- α , CINC-1 e KC (WATANABE et al., 1989), porém atualmente é denominada CXCL1 de acordo com a nova classificação de quimiocinas (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

Em roedores, ela desempenha papéis semelhantes à IL-8 (CXCL8) encontrada em humanos, ou seja, no tecido periférico está envolvida na quimiotaxia e degranulação de neutrófilos na fase inicial da inflamação (ZHANG et al., 2013), desempenhando assim papéis importantes na resposta imune. Primeiramente atuando no direcionamento de neutrófilos periféricos até o local da lesão e em segundo lugar ativando a liberação de proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS) para a morte microbiana no tecido lesado (SAWANT et al., 2016). Estudos indicam que a expressão de CXCL1 é principalmente regulada via NF κ B (ACOSTA et al., 2008) e, é produzida durante a resposta inflamatória, contribuindo também para a modulação da angiogênese e crescimento tumoral, além de sua principal função de quimiotaxia (AMIRI; RICHMOND, 2003). A figura 4 demonstra a estrutura da quimiocina CXCL1.

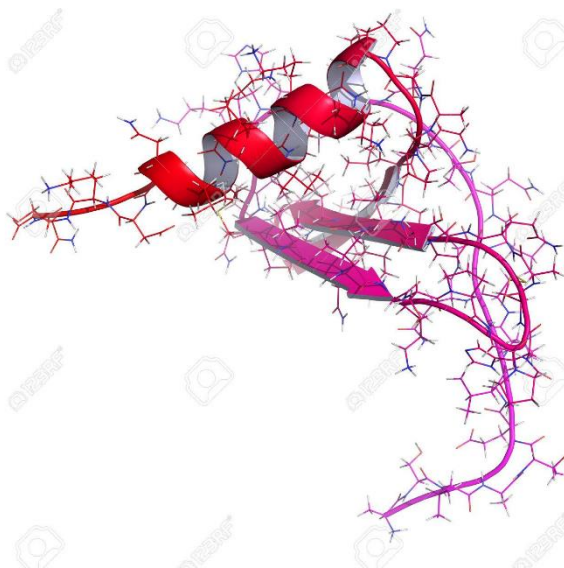


Figura 4 - CXCL1 – Estrutura química
Fonte: (123RF, 2018)

A CXCL1 promove respostas celulares através da ativação dos receptores acoplados à proteína G dos tipos CXCR1 e CXCR2, sendo agonista parcial de CXCR1 e agonista total de CXCR2 (RAJAGOPAL et al., 2013), embora o CXCR2 tenha outros ligantes, como CXCL2, CXCL3, CXCL5 e CXCL7, porém apresentando uma sinalização intracelular diferente (SILVA et al., 2017). A ligação entre CXCL1 e o CXCR2 promove a ativação do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-kinase (PI3K) e proteínas kinases como ERK1/2, as quais aumentam os níveis de íons de cálcio intracelular (RAGHUWANSHI et al., 2012).

Quando há inflamação em um tecido periférico, células locais como macrófagos residentes, medeiam a liberação de CXCL1, que contribui para a hiperalgesia e indiretamente direciona a sensibilização nociceptiva periférica através de seu efeito quimiotático mediando a migração de neutrófilos (CARREIRA et al., 2013; SILVA et al., 2017)

A CXCL1 modula a excitabilidade neuronal dos neurônios do GRD, aumentando as correntes de sódio, de potássio e a função do TRPV-1, além de estimular o influxo de cálcio e a liberação de peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (do inglês CGRP) em neurônios sensoriais (ZHANG et al., 2013). Um estudo evidenciou a facilitação do impulso nociceptivo ao nível central através da injeção intracerebroventricular de CXCL1, a qual reduziu o limiar mecânico em teste de pressão na pata de ratos (YAMAMOTO et al., 1998). Além disso, KIGUICHI et al. (2012), encontraram que a expressão do receptor CXCR2 foi co-localizada com neutrófilos em nervo lesado em um modelo de dor neuropática em ratos. Adicionalmente, outro estudo demonstrou que na inflamação do tecido periférico a liberação de CXCL1 é mediada por células locais, principalmente macrófagos residentes e a hiperalgesia causada pela

CXCL1 se relaciona com sua ação na liberação de aminas simpáticas e prostaglandinas (LORENZETTI et al., 2002).

Em modelos de dor neuropática, estudos têm verificado um aumento da expressão de CXCL1 em GRD, assim como a infiltração de neutrófilos e macrófagos que também liberam CXCL1 após lesão do nervo (HU; MCLACHLAN, 2002), sugerindo que os leucócitos podem ser, pelo menos em parte, responsáveis pela produção de CXCL1 em DRG, após dano do nervo periférico (LI et al., 2007). Além disso, outro estudo demonstrou o aumento de CXCL1 na medula espinal após indução de neuropatia, na qual gerou hiperalgesia que foi revertida com a administração do antagonista do receptor CXCR2, além da diminuição produção da quimiocinas (MANJAVACHI et al., 2014).

A partir de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação, estudos demonstraram que em situações homeostáticas a micróglia não expressa CXCR2, porém na presença de patologias do SNC sua expressão é aumentada, assim como a expressão de sua quimiocinas ligante CXCL1 (RYU et al., 2015; VALLÈS et al., 2006)

Em adição, estudos envolvendo lesão do nervo espinal demonstraram a expressão de mRNA de CXCL1 em astrócitos espinhais (PINEAU et al., 2010; ZHANG et al., 2013) e esse aumento pode estar relacionado com a manutenção da dor neuropática, pois a injeção de anticorpos neutralizantes para CXCL1 atenuaram a hiperalgesia e alodinia induzida pelo modelo de dor neuropática (ZHANG et al., 2013).

Visto que, muitas evidencias têm demonstrado a participação da quimiocina CXCL1 na resposta nociceptiva, o presente estudo irá investigar o envolvimento da CXCL1 e sua relação com as células da glia a nível espinal durante a gênese da dor neuropática.

3 OBJETIVOS

Abaixo estão descritos os objetivos do trabalho.

3.1- Objetivos Gerais

Investigar o envolvimento da quimiocina CXCL1 via ativação das células da glia na gênese da dor neuropática em ratos ao nível espinal.

3.2- Objetivos específicos

- Avaliar a participação da CXCL1 com as células da glia (micróglia e astrócitos) durante a nocicepção
- Avaliar a participação dos receptores CXCR2 com as células da glia (micróglia e astrócitos) durante a dor neuropática
- Avaliar os níveis proteicos de CXCL1, micróglia e astrócitos durante a dor neuropática;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Seguem abaixo os materiais e métodos utilizados no estudo.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) / Minas Gerais/ Brasil, sob o protocolo n°: 12/2017.

Abaixo seguem os materiais e métodos utilizados ao longo do estudo.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 214 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *abinus*), de 6 semanas, com peso entre 250 a 300 g, provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos sob condições padrões de temperatura (22,1 °C), ciclo claro/escuro (12 h/12 h) e umidade de 65 %, com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, sendo 6 animais por caixa. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL (CEUA).

4.2 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Para induzir a dor neuropática foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCI - Chronic Constriction Injury) (BENNETT; XIE, 1988). Este modelo consiste na amarração do nervo ciático em quatro pontos, produzindo constrição crônica sobre o nervo. Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com Cetamina (CEVA®, Brasil) (12 mg/kg) e Xilazina (CEVA®, Brasil) (1 mg/kg), administradas por via intraperitoneal (i.p.). O

nervo ciático foi exposto (figura 5) na região abaixo do glúteo no lado direito e ligado com quatro amarrações com fio de seda separados por 2 mm (figura 6) e recolocado no lugar, então a pele foi suturada, com padrão de três suturas (figura 7), sendo que os animais submetidos à cirurgia de constrição foram denominados como grupo CCI e os animais que passaram pelo mesmo procedimento, porém não tiveram o nervo constricto foram denominados grupo SHAM (falso operados). Ao final da cirurgia, os animais foram recolocados no biotério de manutenção.



Figura 5 - Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático

Nota: Exposição do nervo ciático

Fonte: do autor



Figura 6 - Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático

Nota: Nervo ciático constricto

Fonte: do autor



Figura 7 - Cirurgia de Constrição Crônica do Nervo Ciático

Nota: Sutura da pele

Fonte: do autor

4.3 DROGAS UTILIZADAS

O presente estudo utilizou as seguintes drogas:

- **SB225002** (TOCRIS®, EUA): antagonista para os receptores CXCR2, diluído em DMSO (10%) nas doses 3,5 µg, 7,0 µg e 14,0 µg e um volume de 10 µL por via intratecal.

- **Minociclina** (SIGMA®, EUA): inibidor seletivo de micróglia, diluída em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 50 µg e 100 µg no volume de 10 µL por via intratecal.

- **Fluorocitrato** (INVIVOGEN®, EUA): inibidor de astrócitos, diluído em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 0,5 nmol e 1,0 nmol no volume de 10 µL por via intratecal.

- **CXCL1 recombinante** (TOCRIS®, EUA), diluído em salina estéril (0,9%), nas doses de 1 ng e 10 ng no volume de 10 µL por via intratecal.

Para os grupos controle foram administrados os seguintes veículos: salina estéril (0,9%) e DMSO (10%), ambos em volume de 10 µL.

4.4 VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Todas as drogas foram administradas por via intratecal (i.t.). Para que o teste fosse padronizado e houvesse administração correta das drogas, foi realizado treinamento prévio da administração de 5 µL de lidocaína 2% (DENSPLY PHARMACEUTICAL®, Japão) e a paralisia dos membros posteriores era considerada uma administração correta. Primeiramente os animais foram tricotomizados e anestesiados com Isoflurano 2% (CRISTÁLIA®, Brasil) e O₂ (2 L/min), através de um vaporizador calibrado em seguida os animais foram posicionados adequadamente afim de facilitar o reconhecimento dos espaços intervertebrais. A injeção de 10 µL da droga ou veículo utilizado foi feita no espaço subaracnóide entre a quarta e quinta vértebra lombar após a verificação da retirada da cauda (*Flinch*) quando a agulha (13 x 0,3 mm) era inserida (HYLDEN; WILCOX, 1980).

4.5 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

De acordo com o método de Chaplan e colaboradores (1994), os experimentos foram efetuados dentro do ciclo circadiano dos animais, respeitando o ciclo claro dentre o período de 7:00 horas da manhã e 18:00 horas da tarde. Primeiramente, os animais foram colocados em caixas individuais de vidro sobre uma grade de metal que dá acesso a pata e mantidos por 30 minutos para a aclimação ao ambiente para que então fosse dado início ao experimento. A avaliação do limiar de retirada da pata foi feita por meio do aparato von Frey filamentos (ANESTHESIO®). Os filamentos utilizados foram os seguintes: 0,6 g, 1 g, 2 g, 4 g, 6 g, 8 g, 10 g, 15g, 26 g, 60 g e foram aplicados de forma perpendicular à superfície plantar da pata traseira do animal por alguns segundos. Foi considerada uma resposta positiva a retirada da pata, seguida de lambida da mesma e/ou “*flinch*”. Foram efetuados seis estímulos na pata (figura 8), iniciando por um filamento intermediário (6 g) que seguido de resposta positiva era sucedido do filamento anterior e seguido de resposta negativa era sucedido pelo próximo filamento até que fossem completados os seis estímulos (DIXON, 1980).

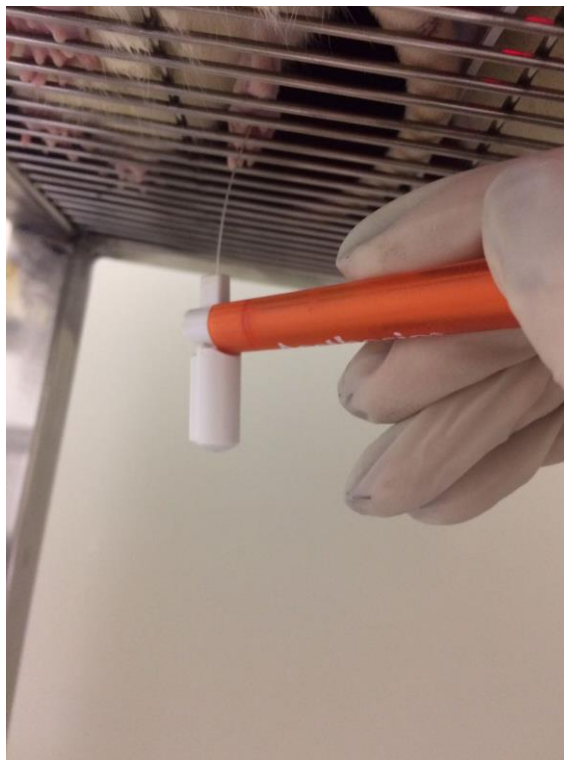


Figura 8 – Teste de Von Frey Filamentos
Nota: Avaliação do limiar nociceptivo por filamentos de Von Frey

Fonte: do autor

4.6 ANÁLISE DE WESTERN BLOT

Esse ensaio biomolecular foi utilizado para avaliar a expressão do nível de proteínas da quimiocina CXCL1 no 13º dia após a neuropatia induzida por CCI. Foi também avaliada a expressão de Iba1, um marcador de células microgliais e GFAP, um marcador de astrócitos. Para tal, foi utilizado tecido medular da região lombar (Segmentos L4-L6) coletados após 13 dias da indução da neuropatia pelo modelo de CCI e 3 horas após tratamento com SB225002. Para a coleta de tecidos, os animais receberam uma *over dose* Cetamina (CEVA®, Brasil) e Xilazina (CEVA®, Brasil) e em seguida decaptados, então a região lombar da medula foi retirada e mantida em -80°C até o dia do experimento.

Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI®, Brasil) em uma solução contendo tampão RIPA de lise e um *cocktail* de inibidores de proteases (SIGMA®, Brasil). Então, foi utilizada a proporção de aproximadamente de 0,04 g de tecido medular (região lombar) para 200 µl de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e 4°C e o sobrenadante foi aliqotado em tubos de polipropileno (1,5 ml, EPPENDORF® Brasil) e armazenados em um biofreezer a -80°C para posterior utilização.

Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 10% β-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e fervidas em banho maria a 95°C por 5 minutos. Para o gel de separação, foi utilizado poli(acrilamida em concentração de 10% para a marcação de GFAP e 15% para a marcação de Iba1 e CXCL1. Foram utilizados 100 µg de proteína de cada amostra no gel de separação para que então fossem submetidas à eletroforese por meio do aparato Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD®, EUA) com corrente de 80 V para a passagem das proteínas no gel de entrada e 120 V no gel de corrida. Após o processo de separação e corrida no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (MILLIPORE®, USA) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD®, EUA). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em solução TBS-Tween (TBST) até que a solução Ponceau fosse eliminada e colocada em solução de bloqueio (5% de leite em pó

desnatado e 0,1% de BSA), por 7 horas, para a marcação de CXCL1 e Iba1 por 2 horas (5% de leite em pó desnatado) para a marcação de GFAP. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por cinco minutos (por cinco vezes) e incubada overnight com o anticorpo primário específico: Anti-CXCL1 (sc-365870 SANTA CRUZ®, USA) na concentração de 1:1000, Anti-GFAP (PA1239 BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY®, EUA) na concentração de 1:250 e Anti Iba1 (016-20001 WAKO®, EUA) na concentração de 1:1000. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T por 5 minutos (por cinco vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário na concentração 1:3000 anti-mouse IgG-HRP (A9044 Sigma-Aldrich®, EUA), para a marcação de CXCL1 e GFAP e anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004 Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração 1:2000 para Iba1. A β -actina (A2228 Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração 1:3000 foi utilizada como controle interno da reação. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (cinco minutos por cinco vezes). Então, as bandas proteicas de interesse, sendo CXCL1 8 kDa, Iba1 17 kDa, GFAP 49 kDa e β -actina 41 kDa e foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL Clarity™ BIO-RAD®, EUA) de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade e analisadas pelo *software*.ImageLab (BIO-RAD®, EUA).

4.7 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Primeiramente, foram utilizados dois grupos compostos por animais submetidos à cirurgia de constrição do nervo e animais falso operados afim de avaliar em qual período o limiar nociceptivo era significativamente reduzido e obter conhecimento do pico de nocicepção. Então, os animais foram submetidos a uma medida basal antes do procedimento cirúrgico e a avaliações nos dias 4, 8, 10, 13, 16 e 19 após a cirurgia, assim como mostrado na figura 9. Além disso, a avaliação da alodinia mecânica foi conduzida tanto no lado ipsilateral como no lado contralateral.

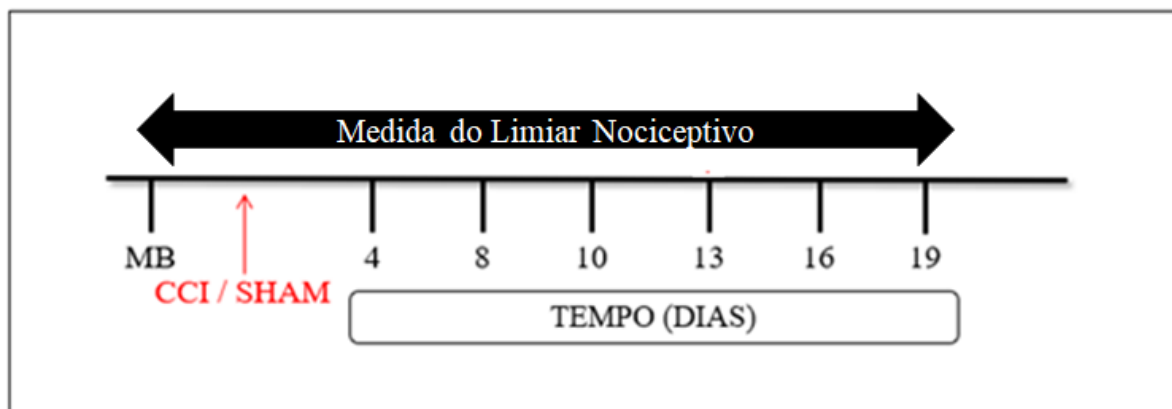


Figura 9 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata após cirurgia de constrição crônica do nervo ciático

Nota: MB: medida basal.

Fonte: do autor

Para a avaliação da participação tanto dos receptores CXCR2 quanto da quimiocina CXCL1 na dor neuropática, foi feita uma curva dose-resposta utilizando o SB225002 (figura 10), e o agonista CXCL1 (figura 11), respectivamente, sendo que o primeiro foi utilizado em três diferentes doses e o segundo em duas diferentes doses. Para receberem o SB225002 primeiramente os animais foram submetidos a cirurgia de constrição do nervo ou cirurgia SHAM e a administração i.t. da droga ou veículo foi feita no 13º após o procedimento de acordo com o experimento que determinou o dia com menor limiar nociceptivo. Foi administrada a dose de 3,5µg, 7,0µg, 14,0µg ou veículo. As avaliações com os filamentos de Von Frey foram conduzidas nos tempos de 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a administração. Já o outro grupo de animais recebeu o agonista em duas diferentes doses, sendo elas 1ng e 10ng ou veículo, foram avaliados pelos filamentos de Von Frey após 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas após a administração.

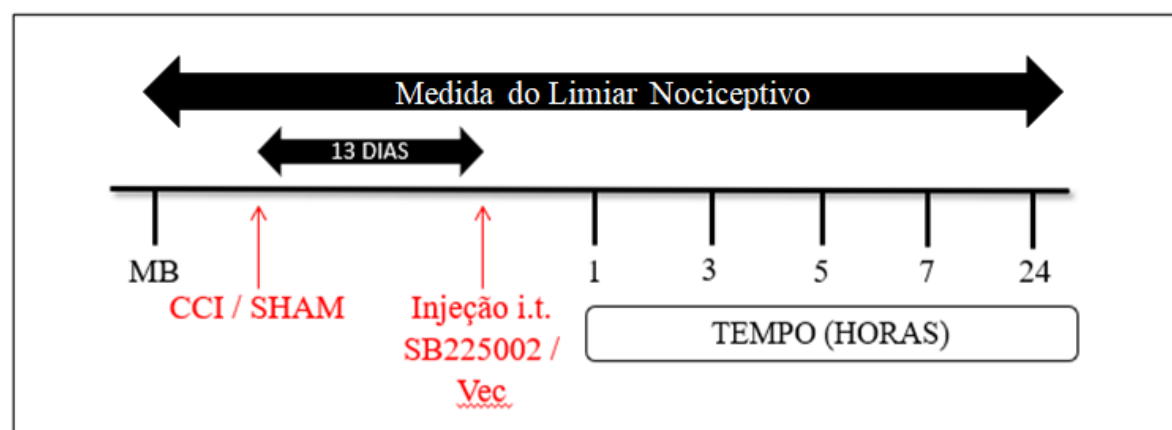


Figura 10 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para a avaliação da participação dos receptores CXCR2

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.
Fonte: do autor

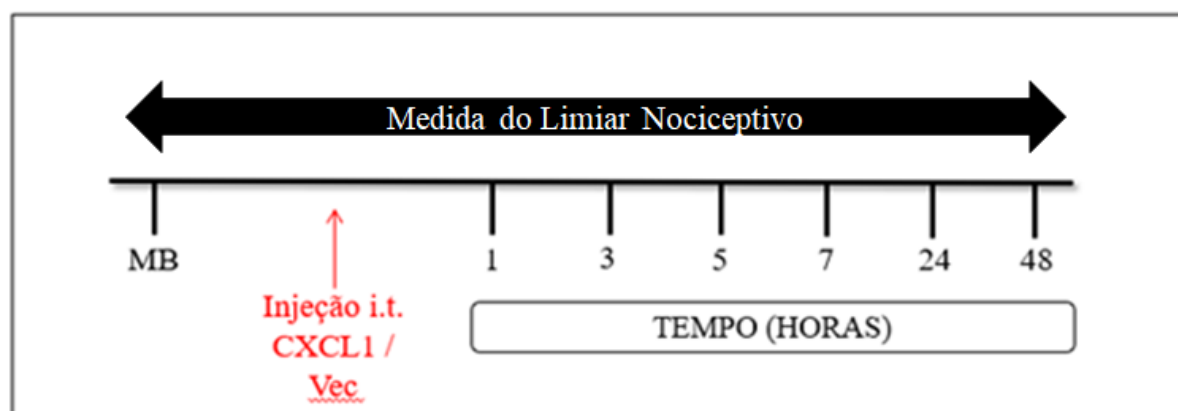


Figura 11 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocina CXCL1

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.

Fonte: do autor

Após o reconhecimento da melhor dose através da curva dose-resposta do agonista de CXCL1, os experimentos foram conduzidos através do uso deste e dos inibidores de micróglia e astrócitos, minociclina (figura 12) e fluorocitrato, respectivamente (figura 13). Primeiramente o limiar de retirada da pata foi avaliado antes da administração das drogas (MB), então foi feita a administração i.t. do agonista de CXCL1 ou veículo e após 20 minutos a administração i.t. de minociclina ou veículo e no outro grupo fluorocitrato ou veículo e posteriormente o limiar nociceptivo foi avaliado pelo von Frey filamentos após 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a administração.

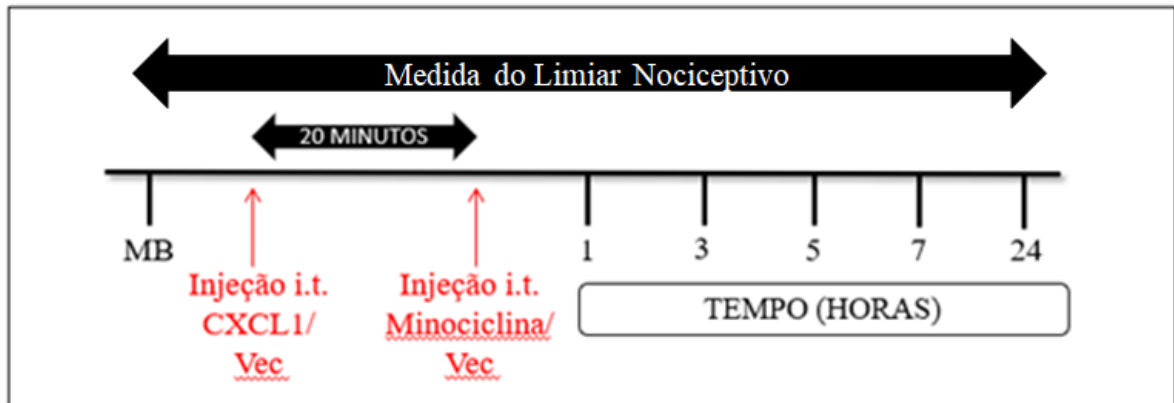


Figura 12 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocinas CXCL1 para avaliação do envolvimento da micrógliia espinal

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.

Fonte: do autor

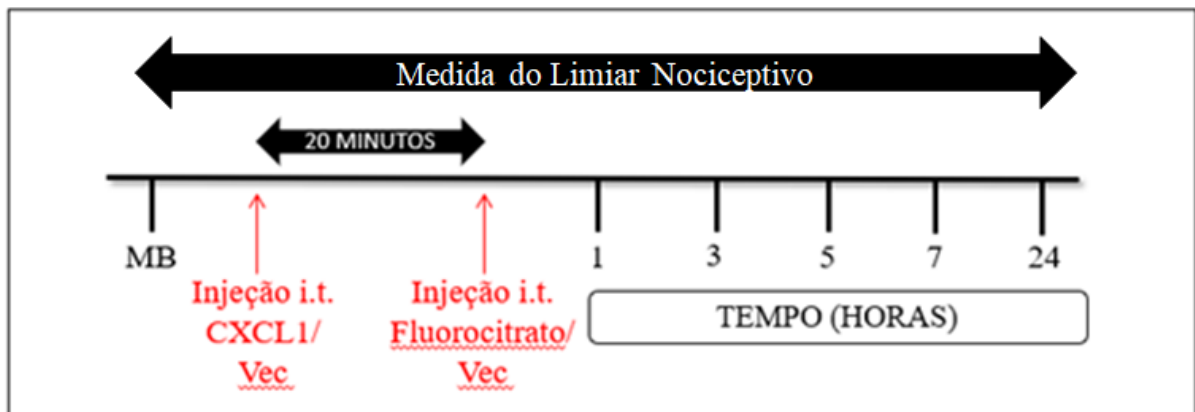


Figura 13 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata na nocicepção induzida pela quimiocinas CXCL1 para avaliação do envolvimento de astrócitos espinais

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.

Fonte: do autor

Outros grupos foram divididos em animais submetidos à cirurgia de CCI ou SHAM, afim de investigar a participação das células da glia na dor neuropática, então, foram avaliados antes do procedimento (MB) e após 13 dias receberam por via i.t. a administração de minociclina/veículo (figura 14), fluorocitrato/veículo (figura 15) e foram avaliados após 1, 3, 5, 7 e 24 horas após a administração.

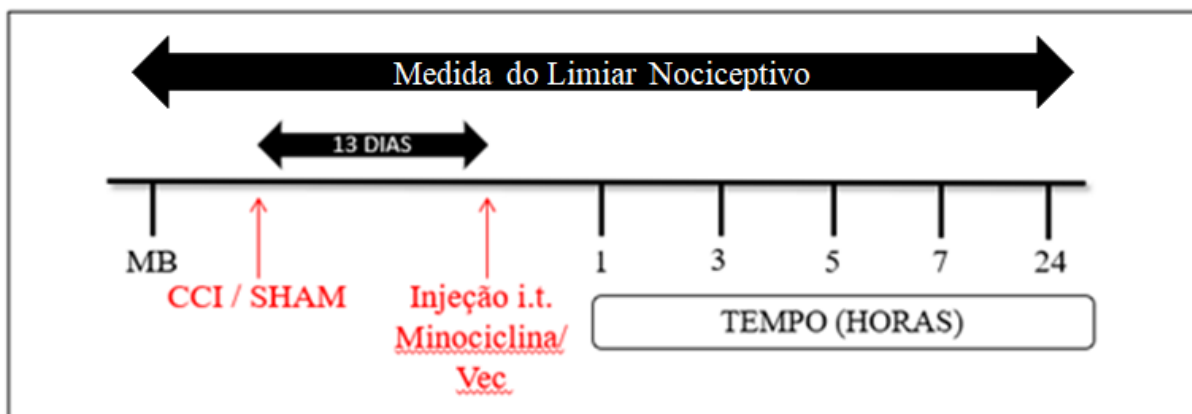


Figura 14 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para investigação do envolvimento da micróglia na dor neuropática

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.

Fonte: do autor

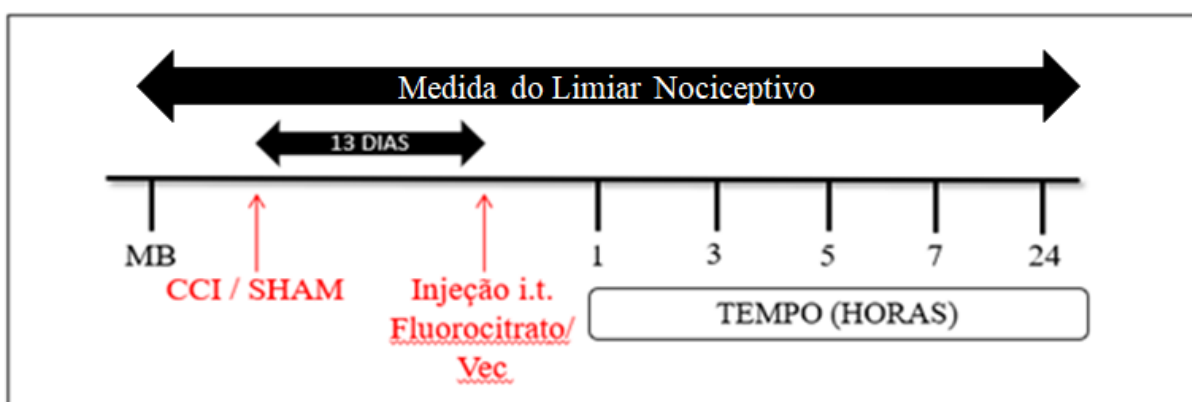


Figura 15 - Esquema da periodicidade de avaliações do limiar de retirada da pata para investigação do envolvimento de astrócitos na dor neuropática

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal.

Fonte: do autor

Para o ensaio molecular de Western Blot, foram avaliados os níveis proteicos de CXCL1, Iba1 e GFAP. Para a marcação de CXCL1 os animais foram divididos em dois grupos, sendo eles: CCI e SHAM. No 13º dia após a cirurgia, os animais tiveram os seguimentos medulares coletados para a realização do ensaio (figura 16). Já para a marcação de Iba1 e GFAP, os animais também foram divididos em grupo CCI e grupo SHAM, porém no 13º dia após a cirurgia os animais receberam uma injeção intratecal de SB225002 na dose de 14,0 µg e os seguimentos medulares foram coletados após 3 horas da administração (figura 17).

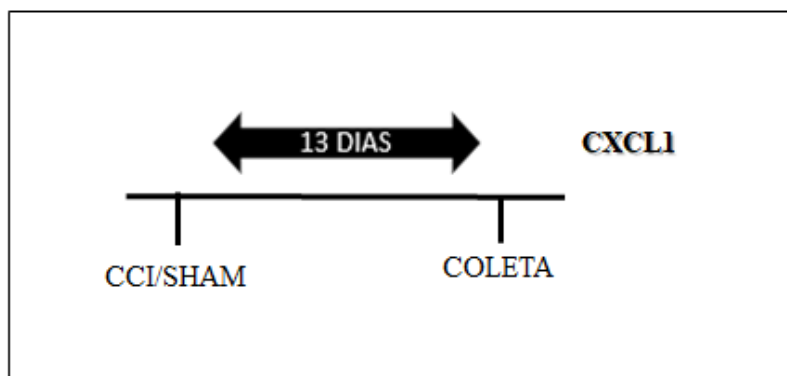


Figura 16 - Esquema do delineamento para o ensaio molecular para avaliação dos níveis proteicos de CXCL1.

Fonte: do autor.

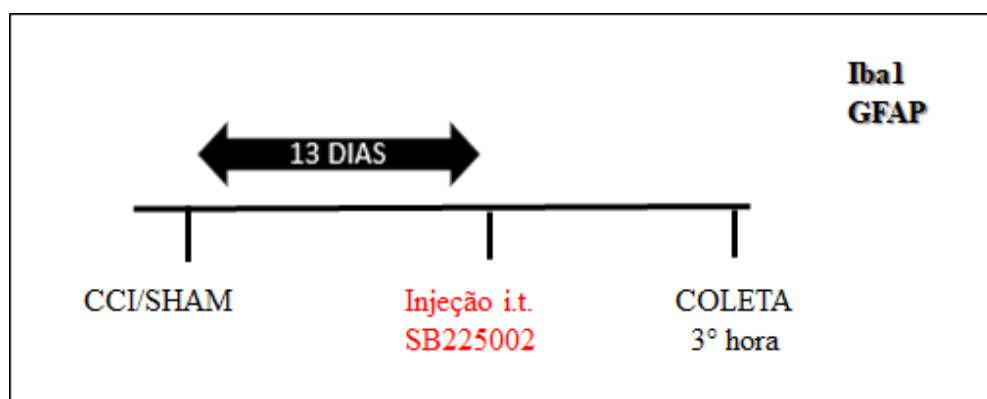


Figura 17 - Esquema do delineamento para o ensaio molecular para avaliação dos níveis proteicos de Iba1 e GFAP.

Fonte: do autor.

4.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos protocolos experimentais, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Animais submetidos a cirurgia de CCI (n=6) e animais SHAM (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e pré-tratados com o SB225002 3,5 μg (n=6); animais SHAM pré-tratados com o SB225002 3,5 μg (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e pré-tratados com o SB225002 7,0 μg (n=6); animais SHAM pré-tratados com o SB225002 7,0 μg (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e pré-tratados com o SB225002 14,0 μg (n=6); SHAM pré-tratados com o SB225002 14,0 μg (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e pré-

tratados pelo veículo do SB225002 (n=6); animais SHAM pré-tratados pelo veículo do SB225002 (n=6);

Animais tratados por CXCL1 1ng (n=6); animais tratados por CXCL1 10ng (n=6); animais tratados pelo veículo de CXCL1 (n=6);

Animais tratados por CXCL1 10ng e minociclina 50µg (n=6); animais tratados por CXCL1 10ng e veículo da minociclina (n=6); animais tratados pelo veículo de CXCL1 e minociclina 50µg (n=6); animais tratados pelo veículo de CXCL1 e veículo da minociclina (n=6);

Animais tratados por CXCL1 10ng e fluorocitrato 1nmol (n=6); animais tratados por CXCL1 10ng e veículo do fluorocitrato (n=6); animais tratados pelo veículo de CXCL1 e fluorocitrato 1nmol (n=6); animais tratados pelo veículo de CXCL1 e veículo do fluorocitrato (n=6);

Animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados por minociclina 50 µg (n=6); animais SHAM tratados por minociclina 50 µg (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados por minociclina 100 µg (n=6); animais SHAM tratados por minociclina 100 µg (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados pelo veículo da minociclina (n=6); animais SHAM tratados pelo veículo da minociclina (n=6).

Animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados pelo veículo da minociclina (n=6); animais SHAM tratados pelo veículo da minociclina (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados por fluorocitrato 0,5nmol (n=6); animais SHAM tratados por fluorocitrato 0,5nmol (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados por fluorocitrato 1nmol (n=6); animais SHAM tratados por fluorocitrato 1nmol (n=6); animais submetidos a cirurgia de CCI e tratados pelo veículo do fluorocitrato (n=6); animais SHAM tratados pelo veículo do fluorocitrato (n=6).

Para o ensaio molecular de Western Blot, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Animais submetidos a cirurgia de CCI (n=4) e animais SHAM (n=4) para a avaliação da expressão da quimiocina CXCL1.

Para a avaliação da expressão de células microgliais pela marcação de Iba1, os animais foram divididos em submetidos a cirurgia de CCI (n=4); animais SHAM (n=4); animais submetidos a cirurgia de CCI e pré-tratados por SB225002 14,0 µg (n=4); animais SHAM pré-tratados por CXCR2 – SB225002 14,0 µg (n=4);

Para a avaliação da expressão de astrócitos pela marcação de GFAP os animais foram divididos em submetidos a cirurgia de CCI (n=4); animais SHAM (n=4); animais submetidos a

cirurgia de CCI pré-tratados por SB225002 14,0 μg (n=4); animais SHAM pré-tratados por SB225002 14,0 μg (n=4).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA). Já, o tratamento estatístico dos dados obtidos pelo ensaio de Western blot, foram analisados análise de variância de uma via (ANOVA). Ambas as análises serão seguidas pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativas os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

Seguem abaixo os resultados encontrados no estudo.

5.1 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO (CCI)

Inicialmente, para que o modelo de indução de neuropatia por CCI fosse validado e o dia com a resposta nociceptiva mais pronunciada fosse conhecido, os animais foram divididos em dois grupos, sendo eles: animais submetidos a cirurgia de constrição crônica do nervo ciático (CCI) e animais falso operados (SHAM). O gráfico 1 representa as avaliações do limiar nociceptivo mecânico pelo teste de filamentos de von Frey (g), aplicado na pata ipsilateral. Primeiramente, antes da cirurgia de constrição do nervo ciático foi realizada a medida basal do limiar nociceptivo mecânico (MB) e novas medidas foram realizadas no 4º, 8º, 10º, 13º, 16º e 19º dia após a cirurgia, sendo que foi observado uma significativa ($p < 0,01$) alodinia mecânica do grupo submetido a CCI em relação ao grupo SHAM, a partir do 8º dia, com um pico dessa resposta no 13º dia e se manteve até o 19º dia ($p < 0,001$, $f_{1,10} = 4,001$). Sendo assim, o 13º foi padronizado como pico da nocicepção para experimentos posteriores.

Foi também realizada a avaliação do limiar nociceptivo mecânico na pata contralateral, sob as mesmas condições da pata ipsilateral, porém não foi encontrada alteração significativa em nenhuma das avaliações, conforme demonstrado no gráfico 2 ($f_{1,10} = 0,352$).

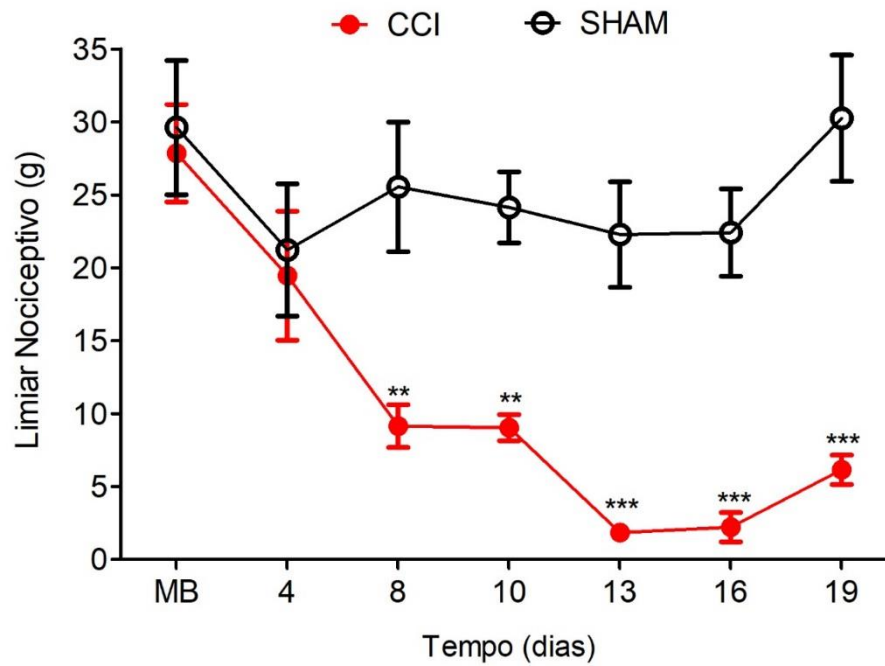


Gráfico 1 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey em animais submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático e animais falso operados

Nota: Efeito da constrição do nervo ciático no limiar nociceptivo de ratos. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes do procedimento cirúrgico (MB, medida basal), no 4º, 8º, 10º, 13º, 16º e 19º dias após o procedimento cirúrgico. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *Two way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, indicam significância estatística em relação ao grupo SHAM, $n=6$ por grupo. CCI (animais que foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático), SHAM (animais falsos operados).

Fonte: do autor

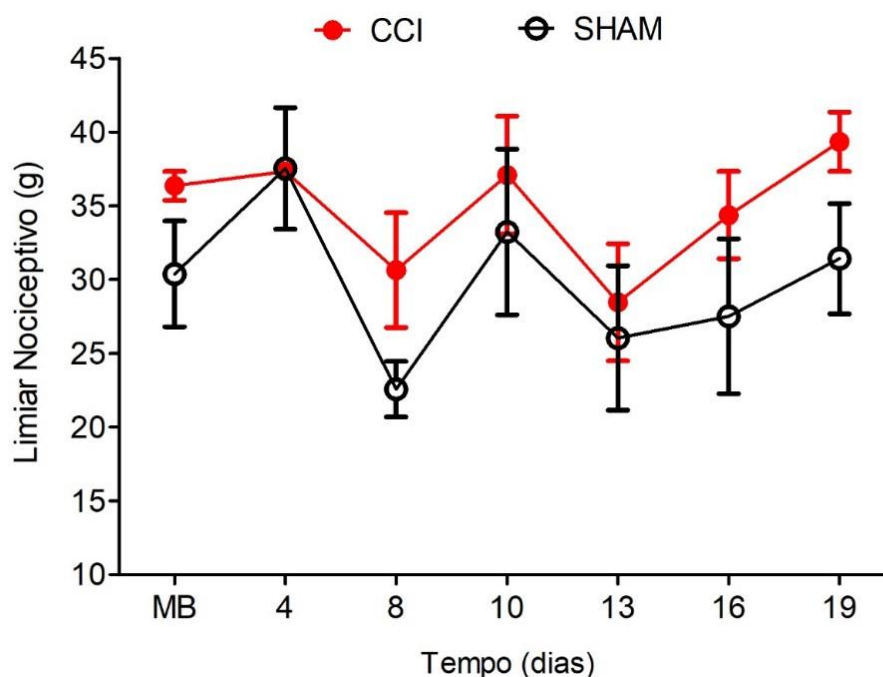


Gráfico 2 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey na pata contralateral em animais submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático e animais falso operados

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes do procedimento cirúrgico (MB), no 4º, 8º, 10º, 13º, 16º e 19º dias após o procedimento cirúrgico. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *Two way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.2 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR CXCR2 NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

Após verificar que o modelo proposto de CCI produziu alodinia mecânica, com um pico desse efeito no 13º dia, o próximo passo do presente estudo foi verificar o envolvimento dos receptores CXCR2 nesse efeito. Desse modo, antes da constrição do nervo foi feita uma avaliação basal. Após a constrição, o SB225002, antagonista para esses receptores, foi administrado i.t. no 13º dia da constrição do nervo, nas doses de 3,5; 7,0 e 14 μ g. Logo em seguida foram feitas novas avaliações após 1, 3, 5, 7 e 24 horas. O gráfico 3 demonstra que na dose de 3,5 μ g do antagonista, não ocorreram alterações significativas da alodinia mecânica. Porém, quando administrado na dose de 7,0 μ g, o SB225002 promoveu uma redução parcial ($p<0,01$) da alodinia mecânica apenas após a 5ª hora. Já, quando administrado na dose de 14,0 μ g, o SB225002, promoveu uma redução total ($p<0,001$ $f_{7,40}=5,84$) da alodinia mecânica após a 1ª, 3ª, 5ª e 7ª hora de sua administração, sugerindo assim o envolvimento desse receptor na

alodinia mecânica induzida por CCI. A administração do antagonista nos animais SHAM, assim como a administração do veículo não causaram alterações no limiar nociceptivo mecânico.

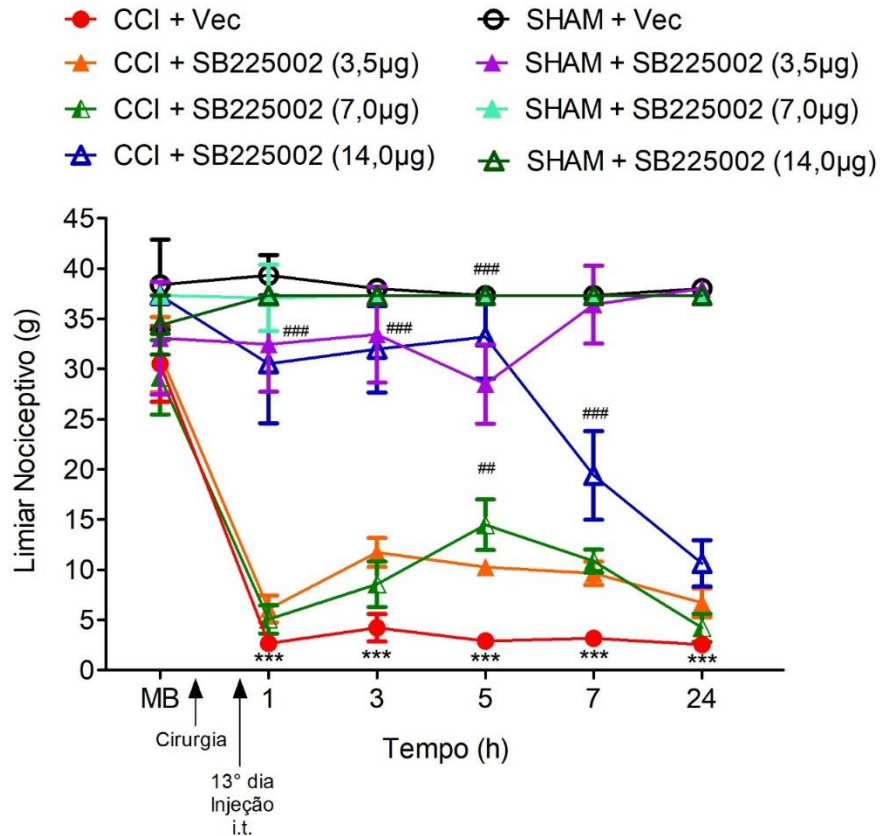


Gráfico 3 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação da participação do receptor CXCR2 através do efeito de diferentes doses de seu antagonista na dor neuropática induzida por CCI

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (MB). No 13º dia após o procedimento os animais receberam injeção de SB225002(3,5, 7,0 e 14,0µg i.t.) e o seu veículo. Logo em seguida, foi feita uma nova avaliação do limiar nociceptivo na 1ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo CCI+Vec (grupo submetido ao procedimento cirúrgico que recebeu veículo do SB225002) e *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo SHAM+Vec (animais falsos operados que receberam veículo do antagonista para receptores CXCR2), $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.3 PARTICIPAÇÃO DA QUIMIOCINA CXCL1 NA NOCICEPÇÃO

Para investigar a possível participação direta da quimiocina CXCL1 na nocicepção a nível espinal, foi realizada uma curva dose-resposta com a administração i.t de CXCL1 em duas diferentes doses em animais não submetidos a neuropatia. No gráfico 4, podemos observar que a CXCL1 na dose de 1ng reduziu significativamente ($p < 0,01$) o limiar nociceptivo após 5, 7 e 24 horas de sua injeção ($p < 0,001$). Já na dose de 10ng de CXCL1 essa redução ($p < 0,001$ $f_{2,15} = 4,08$) foi mais precoce, iniciando a partir da 3ª hora e se mantendo até 7ª hora. Esses resultados sugerem que a CXCL1 contribui com a resposta nociceptiva, através de uma sensibilização a nível espinal. A administração do veículo não causou alteração no limiar nociceptivo.

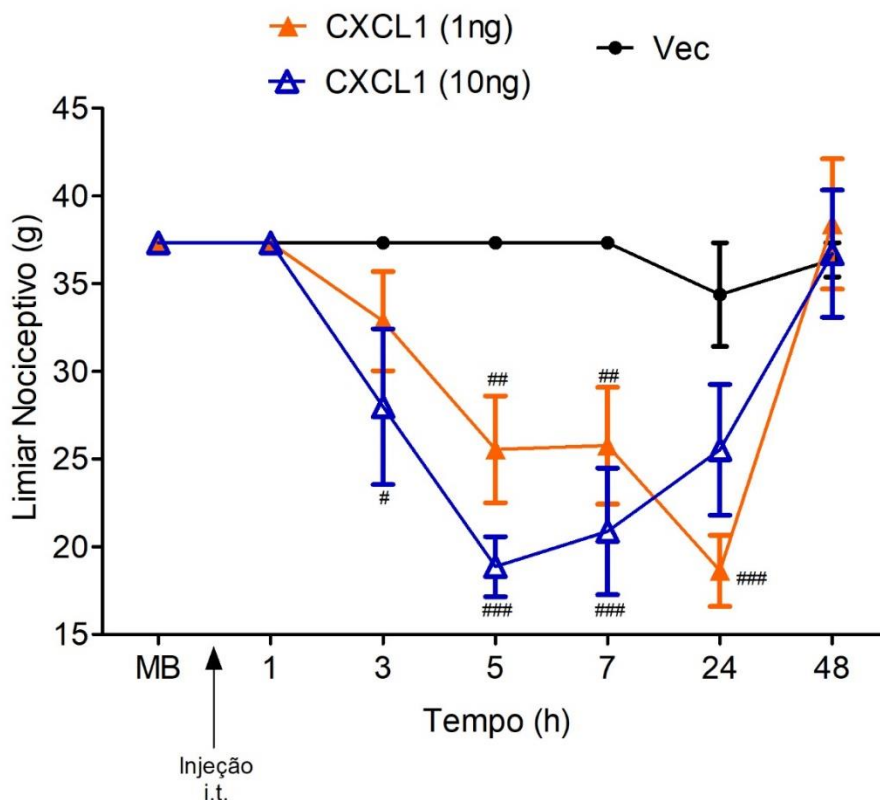


Gráfico 4 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação da participação da quimiocina CXCL1 em duas diferentes doses na nocicepção
 Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da injeção de CXCL1 ou veículo (MB) em duas diferentes doses (1ng, 10ng). Logo em seguida foi feita uma nova avaliação do limiar nociceptivo na 1ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Vec (grupo que recebeu veículo de CXCL1), $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor.

5.4 ENVOLVIMENTO DA MICRÓGLIA ESPINAL NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA QUIMIOCINA CXCL1

Após verificar que a CXCL1 administrada a nível espinal induz nocicepção, o próximo passo do estudo foi investigar se esse efeito poderia estar envolvido com a ativação de células da glia, no caso a micróglia. Estudos já têm demonstrado o envolvimento dessas células em diferentes modelos de dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2007). Desse modo, para avaliar o possível envolvimento da micróglia espinal na nocicepção induzida pela CXCL1, foi administrado o inibidor da micróglia, a Minociclina i.t., na dose de 50µg, 20 min após injeção i.t. da CXCL1 (10ng) conforme demonstrado no gráfico 5. Assim, a Minociclina reverteu a hiperalgesia mecânica induzida pela CXCL1, após a ($p < 0,05$) 3^a ($p < 0,001$ $f_{3,20} = 2,83$) 5^a, 7^a e 24^a hora, sugerindo assim que a micróglia participa da nocicepção induzida pela CXCL1 a nível espinal. A administração somente de Minociclina e/ou veículo não alterou o limiar nociceptivo.

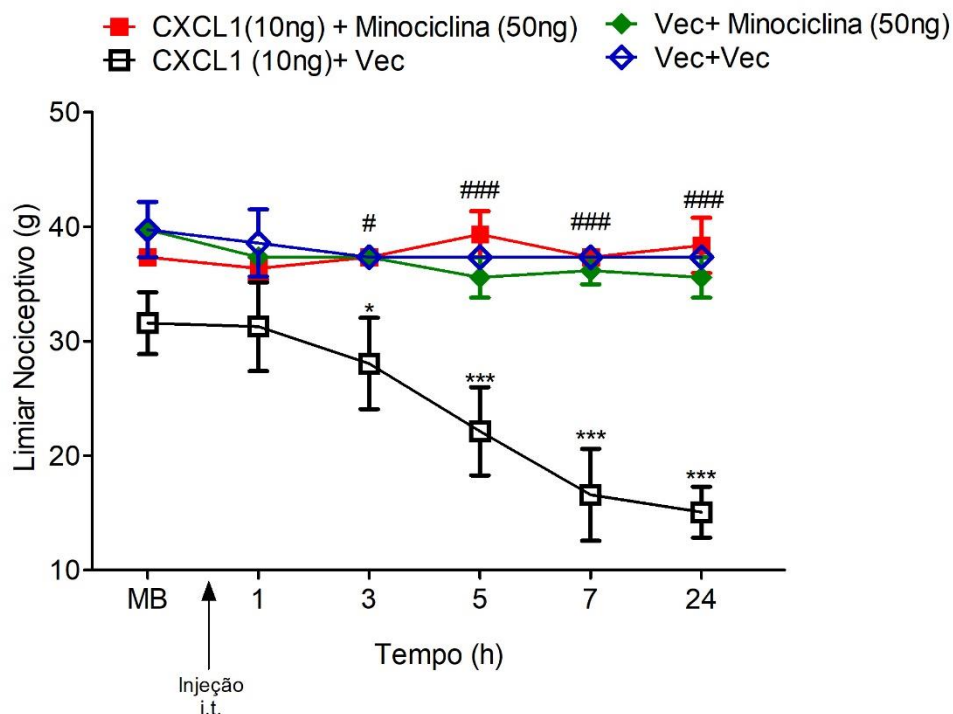


Gráfico 5 – Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento da micróglia na nocicepção induzida por CXCL1

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da injeção de Minociclina (50µg) e CXCL1 (10ng) (MB). Então foi feita uma nova avaliação do limiar nociceptivo na 1^a, 3^a, 5^a, 7^a e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *Two-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de

Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo CXCL1+Vec (grupo que recebeu CXCL1+Veículo de Minociclina) e * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Vec+Vec (grupo que recebeu Veículo de CXCL1+Veículo de Minociclina) $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.5 ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA QUIMIOCINA CXCL1

Logo após verificar que a micróglia espinhal está envolvida na hiperalgesia induzida pela CXCL1, nós investigamos a participação de astrócitos nesse efeito. Para avaliar o possível envolvimento de astrócitos na nocicepção induzida pela CXCL1 foi administrado por via i.t. o Fluorocitrato 1nmol, um inibidor de astrócitos, 20 minutos após a injeção i.t. de CXCL1 (10ng). Assim, o gráfico 6 demonstra que a hiperalgesia induzida pela CXCL1 também foi revertida significativamente ($p < 0,01$) pelo fluorocitrato, após 1, ($p < 0,001$) 3, 5, 7 e ($p < 0,01$ $f_{3,20} = 2,53$) 24 horas, sugerindo também o envolvimento de astrócitos espinhais nesse efeito. Os animais que receberam o veículo da CXCL1 e/ou veículo do Fluorocitrato não apresentaram alteração do limiar nociceptivo.

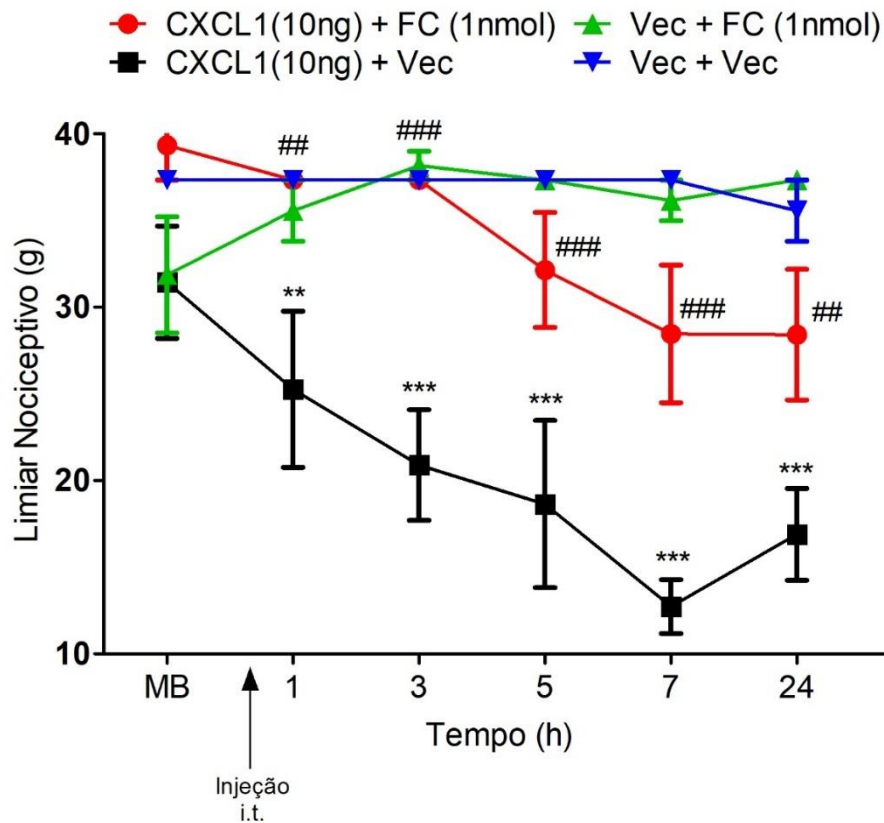


Gráfico 6 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento de astrócitos na nocicepção induzida por CXCL1

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da injeção de Fluorocitrato (1nmol) e CXCL1 (10ng) (MB). Então foi feita uma nova avaliação do limiar nociceptivo na 1ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *Two-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo CXCL1+Vec (grupo que recebeu CXCL1+Veículo do Fluorocitrato) e ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo Vec+Vec (grupo que recebeu Veículo de CXCL1+Veículo do Fluorocitrato). $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.6 ENVOLVIMENTO DA MICRÓGLIA ESPINAL NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

Os resultados encontrados no presente demonstraram que houve participação dos receptores CXCR2 no modelo de dor neuropática, que a quimiocina CXCL1 quando administrada por via intratecal induz a nocicepção e que a inibição da micróglia e astrócitos reverteu a nocicepção induzida pela CXCL1. O estudo então investigou se a micróglia espinal também está envolvida na neuropatia induzida pela CCI. Para avaliar esse possível envolvimento da micróglia na dor neuropática foi primeiramente realizada uma avaliação antes

da constrição do nervo (MB) por meio dos filamentos de von Frey. No 13^o após a cirurgia os animais receberam Minociclina 50 µg e 100 µg por via i.t e então foram realizadas novas avaliações após 1, 3, 5, 7 e 24 horas da administração. O gráfico 7 demonstra que a Minociclina 50µg reduziu parcialmente a alodinia mecânica induzida pela CCI, após a ($p<0,01$) 3^a e a ($p<0,001$) 5^a hora da administração, enquanto a Minociclina da dose de 100 µg promoveu redução significativa da alodinia mecânica da 1^a a 7^a hora ($p<0,001$ $f_{3,20}= 2,83$). Não houveram alterações significantes no limiar nociceptivo dos animais que receberam veículo da minociclina.

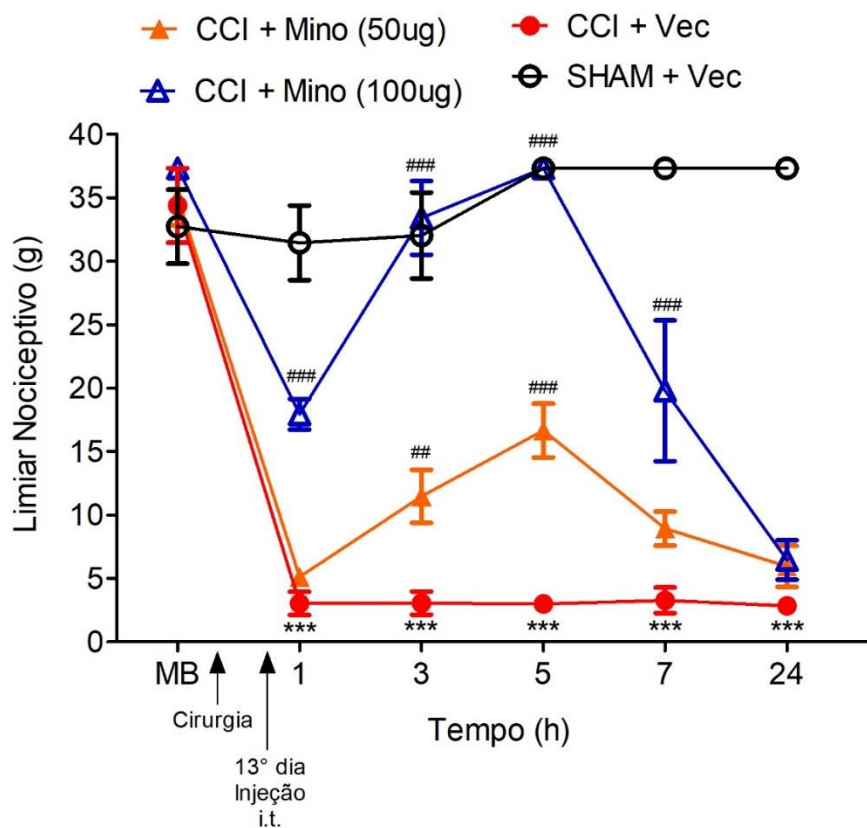


Gráfico 7 - - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento da micróglia na neuropatia induzida por CCI

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (MB). No 13^o dia após o procedimento os animais receberam injeção de Minociclina (50µg e 100µg, i.t.) e o seu veículo. Logo em seguida, foi feita uma nova avaliação do limiar nociceptivo na 1^a, 3^a, 5^a, 7^a e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *Two-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *** $p<0,001$, indica significância estatística do grupo CCI+Vec em relação ao grupo SHAM+Vec. ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ indicam significância estatística de CCI+Mino (grupo submetido à contração do nervo e que recebeu Minociclina) em relação ao grupo CCI+Vec. $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.7 ENVOLVIMENTO DE ASTRÓCITOS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

Complementando os resultados anteriores, foi avaliado o possível envolvimento de astrócitos na dor neuropática e para isso foi utilizado um inibidor dessas células, o Fluorocitrato ou seu veículo em animais submetidos à CCI. Primeiramente antes da cirurgia foi feita uma avaliação da basal. No 13º após a cirurgia de constrição, os animais receberam Fluorocitrato por via i.t e então foram realizadas avaliações após 1, 3, 5, 7 e 24 horas. O gráfico 8 demonstra que os animais que receberam o fluorocitrato na dose de 0,5nmol tiveram uma redução parcial da alodínia mecânica ($p < 0,05$) após 5 horas de sua administração, enquanto os animais que receberam a dose de 1nmol apresentaram redução significativa da alodínia após a 3ª, 5ª e 7ª hora da injeção ($p < 0,001$ $f_{3,20} = 17,97$). Conforme demonstrado no gráfico, a administração do veículo não causou alteração no limiar nociceptivo.

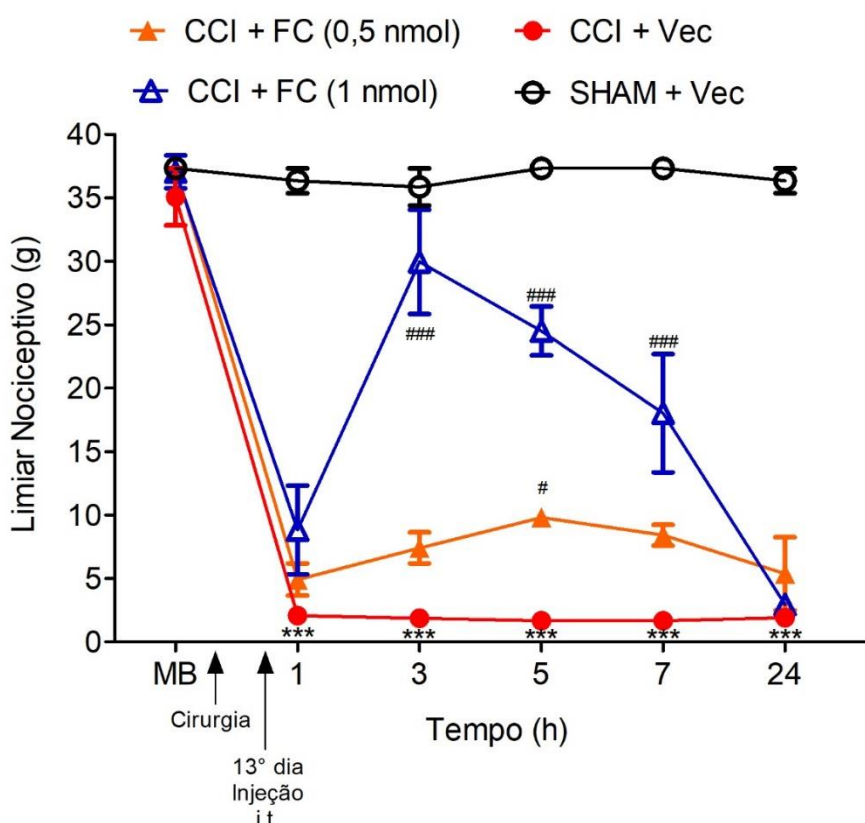


Gráfico 8 - Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de filamentos de Von Frey para investigação do envolvimento de astrócitos na neuropatia induzida por CCI

Nota: O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo teste de Von frey filamentos, antes da cirurgia de constrição do nervo ciático (MB). No 13º dia após o procedimento, os animais receberam injeção de Fluorocitrato (0,5nmol e 1nmol) e veículo do fluorocitrato. Logo em seguida, foram realizadas novas avaliações na 1ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). Two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *** indica significância estatística $p < 0,001$

entre CCI+Vec e SHAM+Vec. ## $p < 0,01$ e ### indicam significância estatística $p < 0,001$ de CCI+FC (grupo submetido à contração do nervo e que recebeu Fluorocitrato) em relação ao grupo CCI+Vec. $n=6$ por grupo.

Fonte: do autor

5.8 ENVOLVIMENTO DA QUIMIOCINA CXCL1 NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

De acordo com os resultados demonstrados nas avaliações comportamentais, que encontraram o CXCL1 na nocicepção a nível espinhal, o presente estudo avaliou por meio do ensaio de Western Blot a expressão dessa quimiocina na medula espinhal de animais submetidos a CCI. Sendo assim, a expressão de CXCL1 foi avaliada após o 13º dia tanto em animais SHAM quanto em animais submetidos a neuropatia. De acordo com o gráfico 9, pode-se observar que os animais com neuropatia apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão da quimiocina em relação aos animais SHAM, indicando que a CXCL1 participa da dor neuropática.

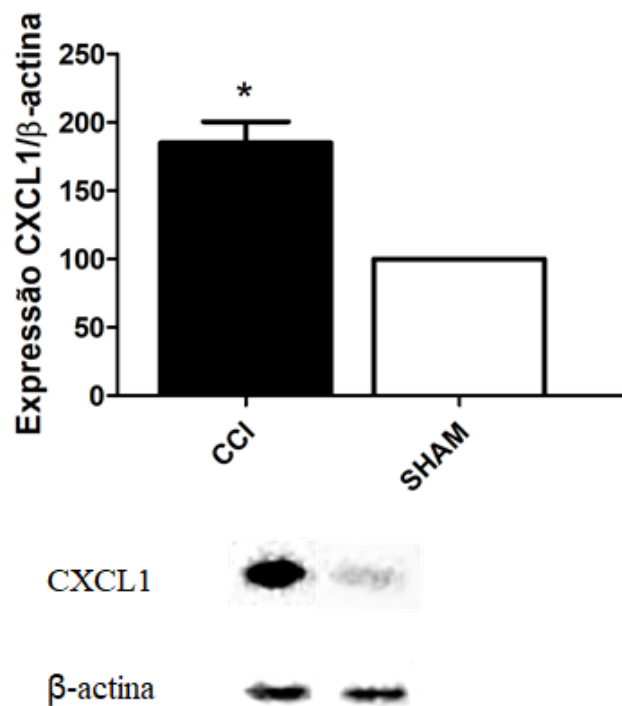


Gráfico 9 - Investigação da expressão da quimiocinas CXCL1 na neuropatia induzida por CCI

Nota: Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático ou à cirurgia SHAM. No 13º dia após o procedimento tiveram o tecido lombar medular coletado. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g) Teste t student, * $p < 0,05$ indica significância estatística em relação ao grupo SHAM, $n=4$ por grupo.

Fonte: do autor

5.9 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 EM ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

Como demonstrado anteriormente, por meio de experimentos comportamentais, os receptores CXCR2, bem como, as células microgliais estão envolvidos na neuropatia induzida por CCI. Desse modo, para fortalecer esses achados, foi feita a avaliação da expressão de Iba1, um marcador de micróglia, durante a dor neuropática em animais tratados e não tratados com o antagonista dos receptores CXCR2, através do ensaio de Western Blot. Para tal, foi utilizado tecidos da região lombar (segmentos L4-L6) de animais submetidos a CCI ou SHAM, que receberam ou não a injeção i.t. do antagonista SB225002 (14 μ g) na 3ª hora do 13º dia após a indução da neuropatia. Assim, o gráfico 10 demonstra que os animais submetidos à CCI apresentaram aumento da expressão ($p < 0,01$) de Iba1 em relação aos animais e SHAM e o tratamento com antagonista de CXCR2 diminuiu essa expressão de Iba1 ($p < 0,01$) em relação ao grupo CCI não tratado, sugerindo assim a relação entre estes receptores e a micróglia na dor neuropática.

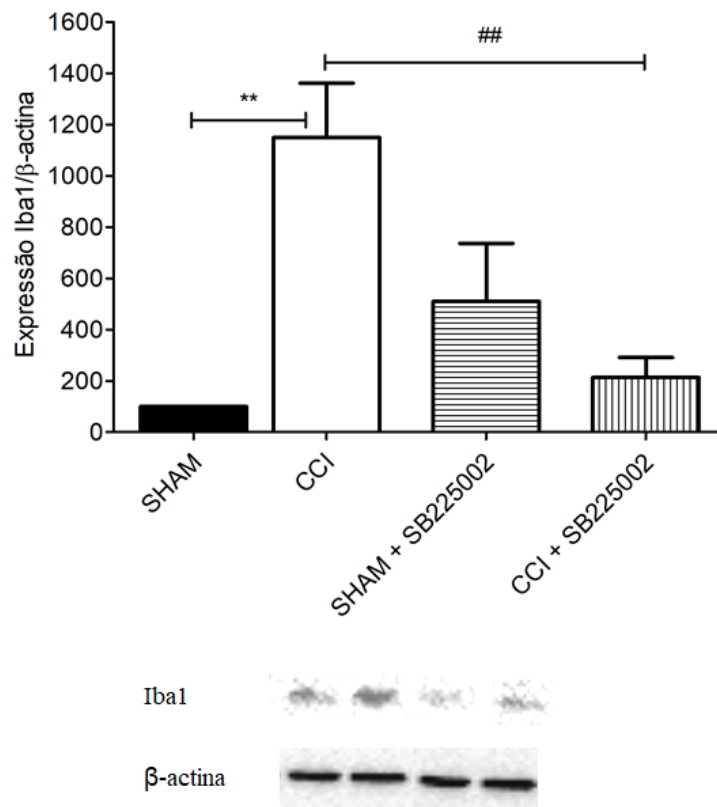


Gráfico 10 - Investigação da participação dos receptores CXCR2 na microglia espinal na neuropatia induzida por CCI.

Nota: Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático ou à cirurgia SHAM. No 13º dia após o procedimento foram tratados com SB225002 (1µg) e o tecido lombar medular coletado 3 horas após a injeção. Os dados representam a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *One way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, ** $p < 0,01$, indica significância estatística em relação ao grupo SHAM e ## $p < 0,01$ indica significância estatística em relação ao grupo CCI, $n=4$ por grupo.

Fonte: do autor

5.10 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 EM ASTRÓCITOS ESPINAIS NA NEUROPATIA INDUZIDA POR CCI

Após verificar uma associação da microglia, bem como os receptores CXCR2 no modelo de dor neuropática proposto nesse estudo, nós investigamos também um possível envolvimento desses receptores e astrócitos no modelo de CCI. Sendo assim, foi feita a avaliação da expressão de GFAP, um marcador de astrócitos, durante a dor neuropática em animais tratados pelo antagonista dos receptores CXCR2, usando o mesmo protocolo descrito pelo experimento que avaliou a expressão do Iba1. Podemos verificar que a expressão de GFAP

foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) no grupo CCI pré-tratado com o SB225002 (14 μ g) em relação ao grupo CCI. Entretanto, não houveram diferenças na expressão do marcador de astrócitos de animais com neuropatia em relação a animais SHAM. Assim, esses resultados sugerem que a expressão de astrócitos não está alterada durante a neuropatia induzida pela CCI, porém o receptor CXCR2 é responsável por manter uma expressão basal dessas células durante esse tipo de dor.

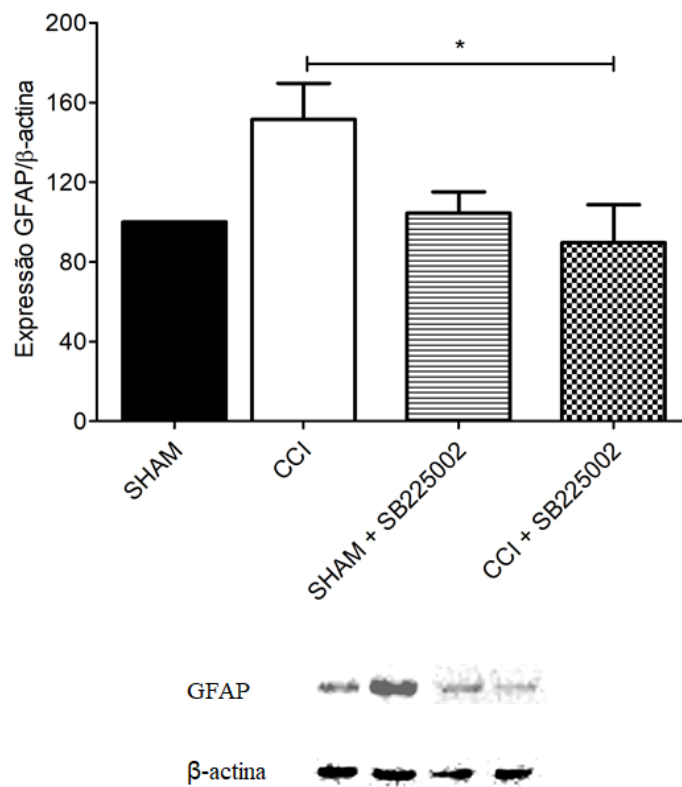


Gráfico 11 - Investigação da participação dos receptores CXCR2 em astrócitos espinais na neuropatia induzida por CCI

Nota: Os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático ou à cirurgia SHAM. No 13º dia após o procedimento foram tratados com SB225002 (1 μ g) e o tecido lombar medular coletado 3 horas após a injeção. Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo (g). *One way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. * ($p < 0,01$) indica significância estatística em relação ao grupo CCI, $n=4$ por grupo.

Fonte: do autor

6 DISCUSSÃO

O modelo de indução de neuropatia por meio da constrição crônica do nervo ciático (CCI) em ratos induz comportamentos de alodinia e hiperalgesia de maneira semelhante a humanos. Deste modo, este foi o modelo utilizado no presente estudo (BENNETT; XIE, 1988). Inicialmente foi avaliada a alodinia mecânica gerada pela cirurgia de CCI por meio do teste de filamentos de Von Frey proposto por CHAPLAN et al. (1994), afim de validar o modelo utilizado e verificar o dia de pico da nocicepção para que fosse utilizado como padrão nos experimentos posteriores. Houve diminuição do limiar nociceptivo com diferença estatística em relação ao grupo SHAM, indicando o aparecimento de alodinia mecânica a partir do 8º dia da realização do procedimento cirúrgico, demonstrando que a dor neuropática havia se instalado. No 13º dia após a cirurgia houve maior redução no limiar nociceptivo, o qual se manteve até o 19º dia, corroborando com o modelo proposto por BENNETT & XIE (1988). Assim, o 13º dia utilizado como referência nos experimentos posteriores.

Estes dados corroboram com estudos de ABBASZADEH et al. (2018), que demonstraram que o modelo de neuropatia induzido por CCI indicou comportamento de alodinia a partir do 7º dia, alcançando seu pico no 14º e se mantendo até o 21º dia após o procedimento cirúrgico. Por outro lado, XU et al. (2016) tenham encontrado diferença estatística no limiar nociceptivo a partir do 3º dia, se mantendo até o 14º das avaliações. O presente estudo também avaliou o limiar nociceptivo na pata contralateral e não foram observadas alterações em relação ao grupo SHAM corroborando com os dados de MORIN et al. (2007) que também não observaram alterações no limiar nociceptivo na pata contralateral em modelo de CCI.

Após lesão do nervo periférico sabe-se que há ativação de células da glia (micróglia e astrócitos) e estas células contribuem para a dor neuropática e para o comportamento de alodinia por meio da liberação de substâncias pró-inflamatórias, como citocinas e quimiocinas que atuam tanto para a modulação como para a manutenção da neuropatia (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WATKINS; MAIER, 2003). A neuroinflamação modula a dor neuropática por meio da interação bidirecional entre neurônios e células da glia em que primeiramente os neurônios expressam as quimiocinas e as células da glia expressam seus receptores e posteriormente as células da glia expressam as quimiocinas e os neurônios seus respectivos receptores (JI; XU; GAO, 2014). Estudos encontrados na literatura demonstraram a

participação de quimiocinas em condições de dor neuropática com o consequente aumento da expressão de seus receptores nas células da glia (CLARK; OLD; MALCANGIO, 2013). Desse modo o presente estudo inicialmente avaliou o envolvimento dos receptores CXCR2 em animais submetidos a neuropatia induzida por CCI. Para isso, o antagonista para CXCR2, SB225002, foi administrado por via i.t em três diferentes doses e o limiar nociceptivo foi avaliado. Em relação à resposta, a dose de 14µg promoveu antinocicepção, indicando a participação destes receptores na dor neuropática. Corroborando com os dados encontrados, ZHANG et al. (2013) observaram aumento da expressão dos receptores no corno dorsal da medula em animais com neuropatia, além do aumento do limiar nociceptivo após indução de dor neuropática pelo modelo de ligação parcial do nervo espinal (PSNL) na 1^o e 3^o hora, após a injeção i.t. do antagonista SB225002 indicando participação dos receptores CXCR2 na dor neuropática. Além disso, o envolvimento desses receptores na gênese da dor neuropática é reforçado pelo estudo de ZHOU et al. (2016), que encontraram um aumento da expressão de CXCR2 em GRD de ratos no 7^o dia após a indução da neuropatia pelo modelo de CCI utilizando o ensaio de Western Blot. Em relação aos dados disponíveis na literatura, só foram encontrados estudos que demonstraram a presença dos receptores CXCR2 em GRD e neurônios da medula espinal, ativando as células da glia para a modulação da dor neuropática (ZHOU et al., 2016, 2018).

Os resultados encontrados sugerem o envolvimento dos receptores CXCR2 na neuropatia e, segundo a literatura, a CXCL1 é um agonista total desse receptor (RAJAGOPAL et al., 2013). A quimiocina CXCL1 está relacionada a condições de dor crônica e principalmente dor neuropática (CAO et al., 2014; MANJAVACHI et al., 2014). Desse modo, o presente estudo investigou seu papel na nocicepção espinal e verificou que a injeção i.t. da CXCL1 recombinante induziu nocicepção por até 7 horas. Estes dados são reforçados por estudos de ZHANG et al. (2013), que administraram CXCL1 via i.t. e observaram redução da latência de retirada da pata no teste de hiperalgesia térmica na 1^o e 3^o hora após a injeção, sendo que as divergências dos tempos em que foram encontradas diferenças significativas podem ser devido ao método de avaliação, pois o estudo de ZHANG et al. (2013) avaliou hiperalgesia térmica e o modelo do presente estudo avaliou alodinia mecânica. Por outro lado, o estudo de ZYCHOWSKA et al. (2015) corrobora com os dados encontrados pois, através da avaliação de alodinia mecânica pelo teste de filamentos de Von Frey, foi encontrada redução do limiar nociceptivo com a administração de CXCL1 via i.t na mesma dose utilizada (10ng) no presente estudo. Assim, os dados encontrados na literatura convergem com os dados do presente estudo indicando o papel da CXCL1 na nocicepção.

Inúmeros estudos demonstram a relação entre as quimiocinas e as células da glia na modulação da dor. MILLIGAN et al. (2005) demonstraram o papel da quimiocina CX3CL1 e seu receptor CX3CR1, através da injeção do agonista da quimiocina que foi capaz de gerar alodinia e hiperalgisia térmica, porém teve a nocicepção revertida com a administração de anticorpos para seu único receptor CX3CR1 em todos os tempos avaliados, também demonstraram que a alodinia causada pelo agonista foi completamente revertida com a administração da minociclina, sugerindo a presença do receptor na micróglia. Posteriormente o mesmo grupo de pesquisa demonstrou esta participação na modulação da dor neuropática, na qual os animais foram submetidos à cirurgia CCI e receberam antagonista para os receptores CX3CR1, apresentando atraso no início da alodinia (MILLIGAN et al., 2004). A quimiocina CCL2 também está relacionada às células da glia na dor neuropática. O estudo de THACKER et al. (2009) demonstrou que a injeção intraespinal de CCL2 induz comportamentos de alodínia até 24 horas após sua administração e promove ativação da micróglia. Além disso, a administração de anticorpos para CCL2 em animais com dor neuropática foi capaz de diminuir a alodínia e a ativação microglial (THACKER et al., 2009). MANJAVACHI et al. (2014) demonstraram o papel da CXCL1 como indutora de comportamento de dor neuropática, a partir da injeção intraneural desta quimiocina no nervo ciático, que provocou hiperalgisia mecânica de longa duração (10 dias) em camundongos. Em modelo de dor neuropática por ligadura parcial do nervo ciático, foi observado o aumento de RNAm e da quimiocina CXCL1 tanto no nervo ciático como na medula espinal, evidenciando seu papel na neuropatia (MANJAVACHI et al., 2014). Um recente estudo demonstrou o aumento da expressão de CXCL1 em astrócitos espinais de maneira tempo-dependente em camundongos com dor neuropática induzida por quimioterápico (ZHOU et al., 2018) Além da CXCL1, outras citocinas dessa classe também são descritas envolvidas na dor. Embora algumas quimiocinas tenham seus papéis na neuropatia elucidados, o papel da CXCL1 espinal na gênese da dor neuropática é praticamente desconhecido (ZHANG et al., 2013).

Uma vez que o presente estudo encontrou resultados que sugerem a participação dos receptores CXCR2 na neuropatia induzida por CCI, bem como, o envolvimento da quimiocina CXCL1 na nocicepção, foi então investigado se há relação entre as células da glia (micróglia e astrócitos) e a CXCL1, pois sabe-se que em estados de dor neuropática, além dos neurônios, astrócitos e microglia são células efectoras na iniciação e manutenção deste tipo de dor (MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005). Desse modo, os animais receberam uma injeção do agonista para CXCL1 (10ng) e após 20 minutos uma injeção de Minociclina (50µg), um inibidor da ativação células migrogliais; ou o fluorocitrato (1nmol), um inibidor de

astrócitos, ambos por via i.t. Logo em seguida, foi demonstrado que tanto a minociclina quanto o fluorocitrato foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela CXCL1, indicando haver uma relação entre micróglia e astrócitos com a quimiocina CXCL1 na nocicepção.

Um estudo realizado por HUI et al. (2013), demonstrou o aumento da expressão de RNAm para CXCL1 em células microgliais de animais com dor inflamatória induzida por CFA (adjuvante completo de Freund), reforçando a relação entre a CXCL1 e a micróglia durante a nocicepção. ZHANG et al., (2013) utilizando o modelo de dor neuropática de ligadura do nervo espinal, encontraram que tanto a proteína CXCL1 quanto o seu RNAm são predominantemente expressos em astrócitos espinais. Além disso, esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou, por meio de ensaios de imunofluorescência, uma co-localização de CXCL1 com astrócitos espinais em camundongos submetidos ao modelo de ligadura do nervo espinal. Tais resultados corroboram com os achados dos experimentos comportamentais do presente estudo que verificou uma reversão do comportamento nociceptivo induzido pela CXCL1, após a injeção fluorocitrato. Sugerindo também que os astrócitos participam da nocicepção induzida pela CXCL1, a nível espinal.

Em relação à dor neuropática, a participação das células da glia está bem descrita e diversos estudos tem demonstrado que tanto a micróglia quanto os astrócitos participam desse efeito, porém não foram encontrados estudos que investigaram o envolvimento da CXCL1 e micróglia nesse efeito, uma vez que os achados na literatura demonstram o papel da CXCL1 atuando por meio de astrócitos na dor neuropática (ABBASZADEH et al., 2018; HAINS, 2006; RAGHAVENDRA, 2003; SUN et al., 2015; ZHANG; JIANG; GAO, 2017). Assim, para posteriormente demonstrar uma relação da CXCL1 com micróglia e astrócitos espinais durante a dor neuropática, nós inicialmente investigamos o envolvimento dessas células no modelo utilizado no presente estudo de CCI.

As duas diferentes doses de minociclina (50µg e 100µg) administradas i.t. no 13º após a cirurgia CCI, reduziram a alodinia mecânica após a 3ª e 5ª hora. Tal achando corrobora com a literatura e sugere a participação da micróglia espinhal na dor neuropática. Além disso, ROJEWSKA et al. (2014) observaram que injeções repetidas de minociclina foram capazes de reverter a nocicepção induzida por CCI, bem como, diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. O estudo de YAMAMOTO et al. (2015) também demonstrou o papel da micróglia no processo de dor neuropática em que após a lesão do nervo tibial de ratos houve diminuição significativa do limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey filamentos em relação ao grupo SHAM e aumento da expressão do marcador de micróglia ativada OX-42 no corno dorsal da medula, sendo que a administração de minociclina foi capaz atenuar a alodinia

e diminuir a expressão de micróglia. Além disso, foi demonstrado que a transecção do nervo espinhal de ratos causou aumento dos marcadores de micróglia e alodinia mecânica em relação ao grupo SHAM (TANGA; RAGHAVENDRA; DELEO, 2004). Estes estudos reforçam os dados encontrados no presente estudo sobre o papel da micróglia na dor neuropática.

Assim como foi observada a participação da micróglia na dor neuropática, estudo tem investigado também o envolvimento dos astrócitos nesse tipo de dor. Um estudo de Chen e colaboradores (2014) demonstrou um aumento do número de astrócitos no corno dorsal da medula em análises realizadas após 10 e 21 dias da cirurgia CCI. Além disso, MILLIGAN et al. (2003), também verificaram que o fluorocitrato na dose de 1nmol, reverteu a alodínia mecânica induzida pela neuropatia. Assim, o nosso estudo vai de encontro a esse achado pois também demonstrou que o fluorocitrato reverteu significativamente a alodínia mecânica na 3^o, 5^o e 7^o hora após sua injeção, sugerindo que os astrócitos estão envolvidos na dor neuropática encontrada no modelo que nós utilizamos.

Desse modo, como o objetivo de complementar os resultados encontrados nos experimentos comportamentais, nós realizamos alguns ensaios biomoleculares por meio da técnica de Western Blot. Inicialmente, verificamos que há um aumento da CXCL1 na medula espinhal de animais submetidos a CCI. LI et al. (2007) também demonstraram um aumento da expressão dessa citocina em animais submetidos a CCI, porém esse aumento foi verificado em GRD. Já, ZHANG et al. (2013), utilizando a técnica imunofluorescência, demonstraram que esse aumento ocorre em astrócitos espinais de animais submetidos ao modelo de PSNL. Desse modo, tais resultados reforçam a hipótese que a CXCL1 está aumentada na medula espinhal durante a dor neuropática, além de estar envolvida nesse sintoma.

A ativação glial tem sido considerada um mecanismo fundamental na gênese da dor crônica, e se manifesta por alterações morfológicas e aumento na expressão de marcadores micriliais (Iba1) e astrocíticos (GFAP) (JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013). Assim, o presente estudo utilizou esses marcadores para avaliar a expressão da micróglia e de astrócitos em animais pré-tratados com o antagonista para o receptor CXCR2, objetivando avaliar uma possível participação desses receptores na expressão dessas células durante a dor neuropática. É importante ressaltar que, em condições patológicas esse receptor já foi descrito expresso pela micróglia cerebral (RYU et al., 2015; VALLÈS et al., 2006). De acordo com os nossos resultados, a expressão de Iba1, aumentou em animais submetidos a CCI (13^o dia) quando comparados aos animais SHAM. Além disso, essa expressão de Iba1 foi reduzida nos animais pré-tratados com o antagonista para o receptor CXCR2, sugerindo que esse receptor pode estar diretamente envolvido na ativação de micróglia espinhal durante a dor neuropática. Tal

resultado não havia sido demonstrado na literatura e a presença desses receptores na micróglia foram demonstradas em modelos de doenças como Alzheimer ou modelos de trauma cerebral (VEENSTRA; RANSOHOFF, 2012). Um exemplo é o estudo realizado por VALLÈS et al. (2006) o qual demonstrou que em condições de trauma cerebral, houve um aumento da expressão de CXCR2 na micróglia em tecido cerebral. Poucos estudos têm evidenciado essa relação, porém de acordo com os resultados, sugerimos que durante a dor neuropática há um aumento da quimiocina CXCL1, com consequente aumento da expressão do receptor CXCR2 em micróglia espinhal, o qual após se ligar a essa quimiocina ativa a micróglia, que já está bem definida a sua contribuição na sensibilização dolorosa a nível espinhal.

Já os resultados obtidos em relação a expressão de astrócitos, não foi verificado um aumento da expressão de GFAP no grupo CCI em relação ao grupo SHAM. Entretanto, o antagonista para o receptor CXCR2 foi capaz de diminuir a expressão de GFAP somente grupo CCI. Embora não houve aumento da expressão de astrócitos pela CCI, os receptores CXCR2 participam da expressão basal encontrada nos animais submetidos a esse modelo. Esses dados sugerem que mesmo não estando aumentada a expressão de astrócitos durante a CCI, há um envolvimento dos receptores CXCR2 nessas células. ZHANG et al. (2013) demonstraram a presença do receptor CXCR2 em neurônios do corno dorsal da medula e a quimiocina CXCL1 em astrócitos espinais, atuando assim na modulação da dor neuropática via CXCL1/CXCR2. Recentemente, ZHOU et al. (2018) demonstraram em modelo de neuropatia induzida por quimioterapia em ratos, o aumento da expressão de RNAm de CXCR2 no corno dorsal da medula e da expressão do receptor o qual foi colocalizado com neurônios da medula espinal. Embora não existam estudos que apontem a presença dos receptores CXCR2 em micróglia e astrócitos espinais, os achados do presente estudo sugerem a possibilidade desta relação, que pode ser justificada pela interação bidirecional entre neurônios e células da glia (JI; XU; GAO, 2014).

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a quimiocina CXCL1 está envolvida na nocicepção, bem como, altamente expressa em nível espinal durante a dor neuropática. Além disso, o modelo de CCI proposto no presente estudo confirmou o envolvimento da micróglia e astrócitos espinais no desenvolvimento de alodínia mecânica, bem como, a participação dos receptores CXCR2 na ativação das células microgлияis. Assim, de acordo com os resultados encontrados, sugerimos que os receptores CXCR2 sejam expressos na micróglia espinal, de modo que modulam essas células em resposta à ligação da CXCL1 durante a gênese da dor neuropática.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, A. et al. Minocycline through attenuation of oxidative stress and inflammatory response reduces the neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 138–144, 2018.

ACOSTA, J. C. et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1006–1018, 2008.

AMIRI, K. I.; RICHMOND, A. Fine Tuning the Transcriptional Regulation of the CXCL1 Chemokine. v. 31, n. 9, p. 1713–1723, 2003.

ARONOFF, G. M. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 31–42, 2016.

BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Perspective. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 474–491, 2015.

BARON, R. et al. Peripheral neuropathic pain: A mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. **Pain**, v. 158, n. 2, p. 261–272, 2017.

BENNETT, G. J.; XIE, Y.-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87–107, abr. 1988.

BOGEN, O. et al. Dependence of monocyte chemoattractant protein 1 induced hyperalgesia on the isolectin B4-binding protein versican. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 780–786, 2009.

CAO, D. L. et al. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 328–336, 2014.

CARREIRA, E. U. et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 5, p. 654–663, 2013.

CASHMAN, C. R.; HÖKE, A. Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. **Neuroscience Letters**, v. 596, p. 33–50, 2015.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering : the contributions of persistent pain. **Pain**. v. 353, p. 2233–2237, 1999.

CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain**, v. 137, n. 8, p. 2193–2209, 2014.

CHEN, K. et al. Chemokines in homeostasis and diseases. **Cellular and Molecular Immunology**, n. October 2017, p. 1–11, 2018.

CHUNG, K. F. Cytokines. **Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management**, p. 327–341, 2002.

CLARK, A. K.; OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: Current perspectives. **Journal of Pain Research**, v. 6, p. 803–814, 2013.

COCHRAN, B. H.; REFFEL, A. C.; STILES, C. D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 939–47, 1983.

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

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain. **Neuroscience**, n. 32, p. 1–32, 2009.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 765–767, 1991.

DIXON, W. J. Experimental Observations. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20, p. 441–462, 1980.

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

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: An overview and literature update. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 3 SUPPL., 2010.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 56–68, 2010.

GRAHAM, G. J. et al. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. **Immunology Letters**, v. 145, n. 1–2, p. 30–38, 2012.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 659–702, 2014.

HAINS, B. C. Activated Microglia Contribute to the Maintenance of Chronic Pain after Spinal Cord Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 16, p. 4308–4317, 2006.

HE, J. et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. **Nature**, 1997.

HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 23–38, 2002.

HUI, J. et al. Repetitive Hyperbaric Oxygen Treatment Attenuates Complete Freund's Adjuvant-Induced Pain and Reduces Glia-Mediated Neuroinflammation in the Spinal Cord. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 7, p. 747–758, 2013.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **European Journal of Pharmacology**, v. 67, n. 2–3, p. 313–316, 1980.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154, p. S10–S28, 2013.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 13 set. 2001.

KERSTMAN, E. et al. **Neuropathic pain**. 1. ed. Houston, Texas. Elsevier B.V., 2013. v. 110

KIGUCHI, N. et al. Epigenetic Augmentation of the Macrophage Inflammatory Protein 2/C-X-C Chemokine Receptor Type 2 Axis through Histone H3 Acetylation in Injured Peripheral Nerves Elicits Neuropathic Pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 577–587, 2012.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 14 nov. 2010.

LI, H. et al. Systemic antiinflammatory corticosteroid reduces mechanical pain behavior, sympathetic sprouting, and elevation of proinflammatory cytokines in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesiology**, v. 107, n. 3, p. 469–477, 2007.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

LORAM, L. C. et al. The time course of inflammatory cytokine secretion in a rat model of postoperative pain does not coincide with the onset of mechanical hyperalgesia. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 6, p. 613–620, 2007.

LORENZETTI, B. B. et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **European Cytokine Network**, v. 13, n. 4, p. 456–461, 2002.

MANJAVACHI, M. N. et al. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 17–27, 2014.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521–532, 2005.

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

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MILLIGAN, E. et al. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 2775–2782, 2005.

MILLIGAN, E. D. et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 1026–1040, 2003.

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

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

MOLOFSKY, A. V.; DENEEN, B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. **Glia**, v. 63, n. 8, p. 1320–1329, 2015.

MORIN, N. et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1–2, p. 164–171, 2007.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature Immunology**, v. 2, n. 2, p. 123–128, 2001.

MUNNIK, S. M. DE et al. Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. v. 6, n. March, p. 1–27, 2015.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OH, S. B. et al. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5027–5035, 2001.

OLD, E. A.; MALCANGIO, M. Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 67–73, 2012.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PINEAU, I. et al. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor / MyD88-dependent fashion. **Brain Behavior and Immunity**, v. 24, n. 4, p. 540–553, 2010.

PLEGER, B. et al. Sensorimotor returning in complex regional pain syndrome parallels pain reduction. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 3, p. 425–429, mar. 2005.

RAGHAVENDRA, V. Inhibition of Microglial Activation Attenuates the Development but Not Existing Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624–630, 2003.

RAGHUWANSHI, S. K. et al. The Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 Couple to Distinct G Protein-Coupled Receptor Kinases To Mediate and Regulate Leukocyte Functions. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2824–2832, 2012.

RAJAGOPAL, S. et al. Biased agonism as a mechanism for differential signaling by chemokine receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35039–35048, 2013.

RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–118, 2000.

ROJEWSKA, E. et al. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 301–310, 2014.

RYU, J. K. et al. Pharmacological antagonism of interleukin-8 receptor CXCR2 inhibits inflammatory reactivity and is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2015.

SAWANT, K. V. et al. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. **Scientific Reports**, v. 6, p. 4–11, 2016.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361–1368, 2007.

SILVA, R. L. et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. **Neurobiology of Disease**, v. 105, p. 109–116, 2017.

SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Current pain and headache reports**, v. 16, n. 3, p. 191–8, 29 jun. 2012.

SUN, J. S. et al. Minocycline attenuates pain by inhibiting spinal microglia activation in diabetic rats. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 2, p. 2677–2682, 2015.

TANG, P.; WANG, J. M. Chemokines: the past, the present and the future. **Cellular and Molecular Immunology**, p. 1–4, 2018.

TANGA, F. Y.; RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2–3, p. 397–407, 2004.

THACKER, M. A. et al. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 3, p. 263–272, 2009.

VALLÈS, A. et al. Differential regulation of the CXCR2 chemokine network in rat brain trauma: Implications for neuroimmune interactions and neuronal survival. **Neurobiology of Disease**, v. 22, n. 2, p. 312–322, 2006.

VEENSTRA, M.; RANSOHOFF, R. M. Chemokine receptor CXCR2: Physiology regulator and neuroinflammation controller? **Journal of Neuroimmunology**, v. 246, n. 1–2, p. 1–9, 2012.

WATANABE, K. et al. The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 33, p. 19559–19563, 1989.

WATANABE, K.; NAKAGAWA, H. Production of chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes by epithelioid cells from rat renal glomeruli in culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 122, n. 1, p. 1247–1252, 1987.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. GLIA: A novel drug discovery target for clinical pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 12, p. 973–985, 2003.

WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: Integrators of pain and inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 834–844, 2005.

XU, W. et al. Spinal CXCL5 contributes to nerve injury-induced neuropathic pain via modulating GSK-3 β phosphorylation and activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 634, p. 52–59, 2016.

YAMAMOTO, J. et al. A hyperalgesic effect of intracerebroventricular cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in the rat paw pressure test. **European Journal of Pharmacology**, v. 363, n. 2–3, p. 131–133, 1998.

YAMAMOTO, Y. et al. Activated Microglia Contribute to Convergent Nociceptive Inputs to Spinal Dorsal Horn Neurons and the Development of Neuropathic Pain. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 5, p. 1000–1012, 2015.

YOSHIMURA, B. Y. T. et al. PURIFICATION AND AMINO ACID ANALYSIS OF TWO HUMAN GLIOMA-DERIVED MONOCYTE CHEMOATTRACTANTS. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 169, n. April, 1989.

ZHANG, Z. J. et al. Chemokine contribution to neuropathic pain: Respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. **Pain**, v. 154, n. 10, p. 2185–2197, 2013.

ZHANG, Z. J.; JIANG, B. C.; GAO, Y. J. Chemokines in neuron–glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 18, p. 3275–3291, 2017.

ZHOU, J. et al. Paeoniflorin and Albiflorin Attenuate Neuropathic Pain via MAPK Pathway in Chronic Constriction Injury Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. Cci, 2016a.

ZHOU, L. et al. Levo-corydalmine alleviates vincristine-induced neuropathic pain in mice by inhibiting an NF-kappa B-dependent CXCL1/CXCR2 signaling pathway. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 34–47, 2018.

ZHOU, Y. et al. Overexpression of GRK6 attenuates neuropathic pain via suppression of CXCR2 in rat dorsal root ganglion. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1–13, 2016b.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1–3, p. 23–37, 2001.

ZLOTNIK, A; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121–127, 2000.

ZYCHOWSKA, M. et al. The role of some chemokines from the CXC subfamily in a mouse model of diabetic neuropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, n. Lix, 2015.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do envolvimento da quimiocina CINC-1 associada à células da glia na gênese da dor neuropática", registrada com o nº 12/2017, sob a responsabilidade de Giovane Galdino de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 09/05/2017 a 10/03/2019	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	120	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 09 de Maio de 2017.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL