UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RAFAEL POLONI

**PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1 NA HIPERNOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA
EM CAMUNDONGOS**

RIBEIRÃO PRETO

2014

RAFAEL POLONI

**PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1 NA HIPERNOCICEPÇÃO NEUROPÁTICA
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto - Universidade
de São Paulo como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique
Ferreira

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencionais ou eletrônicos, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Poloni, Rafael

Papel do fator de transcrição AP-1 na hipernocicepção neuropática em camundongos, 2014.

199 fls.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Palavras-chave: AP-1, Hipernocicepção neuropática, Células gliais, MAPK, Mediadores pró-inflamatórios, MMP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAFAEL POLONI

Papel do fator de transcrição AP-1 na hipernocicepção neuropática em camundongos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira
FMRP – USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra
FMRP – USP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. William Alves do Prado
FMRP – USP.

Assinatura: _____

Profa. Dra. Yara Cury
Instituto Butantan.

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
UNIFAL.

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedicatória

Ao melhor pai do mundo, Angelo Poloni Neto, por muitas vezes, abdicar de realizações pessoais para me dar “asas” para voar. A fonte de toda minha determinação, coragem, audácia e força. Sem você, meu herói, eu não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela perfeita organização de cada peça do quebra-cabeça da minha vida, por não ter me deixado fraquejar e pelo suporte para que eu chegasse até o fim.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, além da honra de sua orientação, pela atenção, por ter acreditado em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pela disponibilização de seu laboratório e pela excelente e imprescindível colaboração científica para este trabalho.

Aos professores componentes desta banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

Ao meu melhor amigo, irmão, Prof. Dr. Stefany Bruno de Assis Cau, que esteve comigo em todos os momentos, meu exemplo de superação, dignidade, inteligência e esforço. Ainda, por toda colaboração científica, essencial para este trabalho.

A minhas amigas e colaboradoras, Miriam Fonseca e Flávia Santa-Cecília, pela excelente dedicação a este trabalho, pelo carinho, amizade e momentos inesquecíveis que vivemos juntos.

Ao Rangel Leal e Alexandre Lopes, pela ajuda e discussões científicas.

A Ieda dos Santos, pela amizade verdadeira, pelo carinho e pelo excelente cuidado dado a mim e aos animais de experimentação utilizados neste trabalho.

À amiga Larissa Garcia Pinto, pelo apoio e contribuição para minha formação científica desde o início do mestrado.

Aos demais amigos e colegas de laboratório, pelo carinho durante todos esses anos de convivência. Em especial à Andressa Zaparolli e André Saraiva, pela amizade.

Ao excelente corpo técnico envolvido neste trabalho, Sérgio Rosa, Kátia dos Santos, Diva Amábile, Giuliana Bertozi, Cristiane Milanezi, Eleni Gomes e Sandra Conde, pelo carinho e apoio técnico.

À minha amiga Danielle Guimarães, além da colaboração científica, pela amizade sincera, alegria contagiante, amor e apoio.

Às amigas Elen Rizzi e Vanessa Belo, pela amizade e contribuição científica.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP Sônia, Fátima e Ramon, pela eficiência, dedicação, amizade e competência.

Aos bioteristas Orlando, Eliana e Marcos, pelo cuidado com os animais de experimentação, tão importantes para este trabalho.

Ao CNPq e a FAPESP, pelo auxílio financeiro indispensável para a realização deste trabalho.

À minha grande amiga Marisol Ranucci Cardozo, pela amizade essencial, pela colaboração basilar no inglês durante toda a minha pós-graduação.

À minha mãe, Angela Marchiori Poloni, pelo carinho, dedicação, alegria e amor que nunca me deixou faltar. Por ser a mãe mais maravilhosa do mundo, meu orgulho, minha rainha.

Às minhas melhores amigas, minhas irmãs, Andressa e Micheli Poloni, pelo apoio incondicional, pela confiança e amor, que me tornam mais forte e mais determinado para alcançar meus objetivos.

Ao meu sobrinho Ricardo Poloni, por ser o melhor presente que já ganhei na vida.

Aos demais membros da minha família Poloni e Marchiori, pelo apoio e carinho de sempre. Em especial, ao primo-irmão Renato Poloni, pelo apoio essencial.

À Fernanda Castanheira, pela amizade eterna, por ter me aturado todos esses anos, por sempre ser meu ponto de equilíbrio, força, carinho e amor em Ribeirão Preto.

À Andressa Duarte, pela amizade que abrilhanta todos meus dias, por ser tão amorosa e cuidadosa comigo. Ainda, por me emprestar a sua maravilhosa mãe.

Às minhas amigas do coração Fabiane Sônego, Cristina Setim, Eleonora Uchôa e Vanessa Borges, por ter me dado o prazer da convivência diária e amizade, pelo carinho e por todos os momentos maravilhosos.

À minha irmã de coração, Rafaela Pravato, pelo amor de irmã, paciência, apoio e carinho de sempre. Faltam-me palavras para agradecer tudo que você é para mim.

Ao meu irmão Gabriel Tavares, por me aturar todos esses anos, pelo amor de irmão e carinho imensurável. Ainda, à Elizabeth e ao Geraldo, por todo carinho.

À Paula Abi Rached e Júlia Bocchi, por ser muito mais que amigas, mais que irmãs, pelo apoio, carinho, amor. Vocês são a vida.

A todos os amigos que Ribeirão Preto me presenteou, em especial Fernanda Andrade, Breno Resende, Alexandre Lemos, Bruno Fonzar, José Wilson, Mariana Sant'Ana, Genilson Santos, Marcelo Soares, Ricardo Noda, Marcelo Paulino, Ingrid Metzger, Valéria Gomes, Lorena Machado, Karla Fernandes, Joice Muniz, Valéria Sandrim, Fernando Collet, Regina Albuquerque, Analuisa, Samira Cardeal, Salvador Cardeal, Natacha Soares, Onésimo Vargas, Genaro Pelegrino, Márcio Brunetto, Aldrey Resende, Joarg Resende, Argentina Resende, Daniela Vento, Gabriel Ferraz, Felipe Vilela, Larissa Ferrari, Amanda Faria, pela amizade e carinho, por nunca me deixarem saber da existência da solidão. Obrigado por tudo. A todos vocês, meus queridos amigos, jamais direi adeus. Então, até logo.

Aos amigos distantes, porém nunca ausentes nesta caminhada, Paula Poloni Degasperi, Isabela Mozer Valiati, Patrícia Effgen, Paula Poloni Ferreira, Denise Ramos, Sinara Trivisani, Maria Júlia Almeida, Adriana Amorim, Marcele Moreth, Rodrigo Santos, Lara Laiber, Dayane Sperotto, Thaís Ferreira, Vinícius Gomes, Daniele Barcelos, Patrícia Bastos, Caroline Ramalho, Roseanne Marques, Lara Carrasco, Miriam Porto, Mariane Porto, Fernanda Matos, Taciana Beiriz, pelo apoio e amizade imprescindíveis.

À toda família Thomaz, em especial à M^a Olina e M^a Aparecida, que me “adotaram” e me deram amor de mãe todos esses anos. Obrigado por todo amor e carinho.

Ao Prof. Me. André Alselmi, pelo carinho e toda a assistência prestada ao português deste trabalho.

Infelizmente, não é possível citar todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, mas agradeço imensamente a todos que participaram direta ou indiretamente. Muito obrigado.

*“Não vale a pena sangrar por sangrar,
Crescer de véspera, fugir diante das palmas,
Lembrar de rolar um pranto. Enfim... Não
durma antes de sonhar.”*

(A culpa – Varandistas)

*“E aqueles que foram vistos dançando foram
julgados insanos por aqueles que não
podiam escutar a música.”*

(Friedrich Nietzsche)

Resumo

RESUMO

POLONI, R. **Papel do fator de transcrição AP-1 na hipernocicepção neuropática em camundongos.** Tese de Doutorado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A dor neuropática pode ser causada por lesões e/ou disfunções no sistema somatossensorial. Nestes tipos de dores, alterações plásticas ao longo de todo o sistema sensorial nociceptivo estão associadas à cronificação do processo doloroso. A plasticidade observada pode ser resultante da indução e/ou repressão de genes, os quais geralmente são modulados por fatores de transcrição. Um dos principais fatores de transcrição até então conhecido é a proteína ativadora-1 (AP-1), que pode ser estruturalmente formado principalmente por proteínas das famílias Jun e Fos. Entretanto, na dor neuropática, a participação e o papel do AP-1 não estão bem elucidados. Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que a ativação do AP-1 contribua para a indução e/ou manutenção da dor neuropática, através da ativação de células gliais e de proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK) e por indução da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, bem como de metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) na medula espinal. Esses fatores contribuem para sensibilização central causada pela SNI, facilitando a transmissão dolorosa. Assim, a inibição do AP-1 seria uma potencial estratégia terapêutica no tratamento da dor neuropática. Foi utilizado o modelo experimental de dor neuropática de lesão parcial do nervo ciático (SNI, *Spinal Nerve Injury*) em camundongos, os quais receberam injeção intratecal (i.t.) do inibidor de AP-1, SR11302, ou seu veículo (DMSO, tween[®] 20 e salina). O tratamento com o inibidor de AP-1 reduziu a hipernocicepção mecânica causada pela SNI, e o perfil de redução sugeriu que esse fator de transcrição esteja relacionado com a manutenção da dor neuropática. No sétimo dia após a SNI, observou-se na medula espinal dos camundongos, ativação da microglia, dos astrócitos e das MAPK, além de aumento na expressão de TNF- α , interleucina (IL)-6, IL-1 β , IL-17A, quimiocina derivada de queratinócito (KC), proteína quimiotóxica de monócitos (MCP-1), óxido nítrico (NO),

NO sintase induzível e das metaloproteinases da matriz extracelular (MMP)-2 e -9. Todos esses eventos estão associados à sensibilização central, portanto, contribuem para a facilitação da transmissão nociceptiva. O tratamento com o inibidor de AP-1 SR11302 impediu, pelo menos parcialmente, a ativação das células gliais e das MAPK e bloqueou o aumento na expressão de todos esses mediadores pró-inflamatórios e das MMPs na medula espinal. Assim, o fator de transcrição AP-1 e, conseqüentemente, suas vias a jusante (*downstream*) são potenciais alvos farmacológicos no tratamento da dor neuropática.

Palavras-chave: AP-1, Hipernocicepção neuropática, células gliais, MAPK, Mediadores pró-inflamatórios, MMP.

Abstract

ABSTRACT

POLONI, R. **Role of the AP-1 transcription factor in neuropathic hypernociception in mice.** Thesis (PhD) – Department of Pharmacology of the Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Neuropathic pain results from nerve damage or dysfunction, which is associated to the painful process' chronification. This process may include participation of the inducible genes, which may be modulated by transcription factors, including the activator protein-1 (AP-1), which can structurally be formed by proteins from Jun and Fos families. However, the participation and the role of AP-1 neuropathic pain remain unclear. Our hypothesis is that activation of AP-1 would contribute for the induction and/or maintenance of neuropathic pain, by inducing the glial cells activation and mitogen-activated protein kinases, and by inducing the production/release of pro-inflammatory mediators and extracellular matrix metalloproteinase (MMP) in mice spinal cord. All these factors are contributing to SNI-evoked central sensitization, facilitating pain transmission. Thus, inhibition of AP-1 would be a potential drug target in the treatment of neuropathic pain. The animals received inhalatory anesthesia (2% isoflurane) and were submitted to an experimental model of neuropathic pain Sparing Nerve Injury (SNI). The animals were treated intrathecally (i.t.) with AP-1 inhibitor SR11302 or vehicle (DMSO, tween[®]20 and saline). Treatment with AP-1 inhibitor reduced the SNI-induced mechanical hypernociception, suggesting that this transcription factor is related to the maintenance of neuropathic pain. On the seventh day after SNI, there was in the spinal cord of mice the microglia, astrocytes and MAPK activation, increased of expression of TNF- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-17A, keratinocyte-derived chemokine (KC), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), nitric oxide (NO) and inducible NO synthase, and increased the expression of extracellular matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9, all of these are related with central sensitization, thus facilitating nociceptive transmission. However, treatment with the SR11302 AP-1 inhibitor prevented, at least partially, activation of MAPK and glial cells, as well as prevent the increase in expression of all these pro-inflammatory

mediators and MMPs in the spinal cord. Thus, inhibition of AP-1 and hence its way downstream is a potential pharmacological target in the treatment of neuropathic pain.

Keywords: AP-1, Neuropathic hypernociception, glial cells, MAPK, Pro-inflammatory mediators, MMP.

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões de ligação de c-Jun e c-Fos e os elementos responsivos aos dímeros	45
Tabela 2 – Protocolos de tratamento com SR11302	72
Tabela 3 - Anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência ...	79
Tabela 4 - Sequências dos pares de <i>primers</i>	81
Tabela 5 - Anticorpos primários e secundários utilizados no <i>western blotting</i>	83

Lista de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Representação do fator de transcrição AP-1	47
Ilustração 2 - Ativação transcricional e pós-translacional do AP-1	49
Ilustração 3 - Fórmula química do inibidor de AP-1 SR11302	71
Ilustração 4 - Esquema do modelo experimental de dor neuropática <i>Spinal Nerve Injury</i> – SNI	75
Ilustração 5 – Esquema da hipernocicepção neuropática dependente do AP-1	140

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do pré-tratamento com o inibidor de AP-1 na hipernocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI	89
Figura 2 - Efeito do pós-tratamento com múltiplas injeções, iniciadas no 4º dia após SNI, do inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI	90
Figura 3 - Efeito do pós-tratamento com múltiplas injeções, iniciadas no 7º dia após SNI, do inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI	91
Figura 4 - Efeito de injeção única de inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI	92
Figura 5 - Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun e da microglia	94
Figura 6 - Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun e dos astrócitos	95
Figura 7 - Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun nuclear	96
Figura 8 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm de Iba1 na medula espinal de animais submetidos à SNI	98
Figura 9 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão do GFAP na medula espinal de animais submetidos à SNI	99
Figura 10 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de JNK na medula espinal de animais submetidos à SNI	101
Figura 11 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de ERK na medula espinal de animais submetidos à SNI	103
Figura 12 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da p38 na medula espinal de animais submetidos à SNI	104
Figura 13 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm e proteica do TNF- α na medula espinal de animais submetidos à SNI	106
Figura 14 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da IL-6 na medula espinal de animais submetidos à SNI	107
Figura 15 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm e proteína da IL-1 β na medula espinal de animais submetidos à SNI	108
Figura 16 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da IL-17A na medula espinal de animais submetidos à SNI	109

Figura 17 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm do MCP-1 na medula espinal de animais submetidos à SNI	111
Figura 18 - Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão do RNAm e da proteína de KC na medula espinal de animais submetidos à SNI	112
Figura 19 - Efeito do inibidor de AP-1 na estimativa da concentração de óxido nítrico na medula espinal em animais submetidos à SNI.....	114
Figura 20 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão da óxido nítrico sintase induzível na medula espinal de animais submetidos à SNI	115
Figura 21 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm da MMP-9 na medula espinal de animais submetidos à SNI	117
Figura 22 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão proteica da MMP-9 na medula espinal de animais submetidos à SNI	118
Figura 23 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm da MMP-2 na medula espinal de animais submetidos à SNI	119
Figura 24 - Efeito do inibidor de AP-1 na expressão proteica da MMP-2 na medula espinal de animais submetidos à SNI	120

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

°	Grau
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Micro
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AP-1	Proteína ativadora 1
ATF	Fator ativador de transcrição
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina
C	Celsius
CA	Califórnia
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCL2	<i>ver MCP-1</i>
CCR2	Receptor de quimiocina do tipo 2
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CRE	Elemento responsivo ao AMPc
CREB	Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc
d	Dias
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	Ácido desoxirribonucléico complementar
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Proteinocinase regulada por sinal extracelular
ERKf	Proteinocinase regulada por sinal extracelular fosforilada
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, gene-controle endógeno

GFAP	Proteína glial fibrilar ácida, marcador de ativação de astrócitos
GRD	Gânglio da raiz dorsal da medula espinal
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
IASP	Associação Internacional de Estudo da Dor
Iba1	Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1, marcador de ativação da microglia
IEG	Gene de expressão imediata (<i>immediate-early gene</i>)
IL	Interleucina
i.t.	Via de administração intratecal
JNK	Proteinocinase N-terminal-c-Jun
JNKf	Proteinocinase N-terminal-c-Jun fosforilada
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
k	Quilo
L	Litro
m	Mili
M	Molar
MAF	Músculo aponeurótico fibrosarcoma
MAPK	Proteinocinases ativadas por mitógenos
MARE	Elemento responsivo ao Maf
MCP-1	Proteína quimiotatante de monócitos-1
min	Minutos
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
m.s ⁻¹	Metros por segundo
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NMDA	Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato

NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
p	Pico
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino contendo tween 20 [®]
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Proteinocinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p/v	Peso sobre volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RARE	Elemento responsivo ao ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
Rsk	Cinase s6 ribossomal
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real
RU	Reino Unido
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNI	Lesão limitada do nervo (<i>Spared Nerve Injury</i>)
SNL	Ligação do nervo espinal
TBS-t	Tris (hidróximetil)aminometano com tween 0,05%
TIMP	Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase
TNF- α	Tumor de necrose tumoral α
TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
TRE	Elemento responsivo ao TPA

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	34
1.1 Dor	34
1.2 Dor crônica	37
1.2.1 Dor neuropática	37
1.2.1.1 Papel das células gliais na dor neuropática	39
1.2.1.2 Participação das proteinocinases ativadas por mitógenos na dor neuropática	41
1.2.1.3 Participação de fatores de transcrição na dor neuropática	43
1.2.1.3.1 Proteína ativadora 1 (AP-1)	43
1.2.1.4 Mediadores pró-inflamatórios na dor neuropática	50
1.2.1.5 Participação de metaloproteinases da matriz extracelular (gelatinases) na dor neuropática	54
2 JUSTIFICATIVA	58
3 HIPÓTESE	60
4 OBJETIVOS	62
4.1 Objetivo geral	62
4.2 Objetivos específicos	62
5 MATERIAL E MÉTODOS	64
5.1 Soluções	64
5.2 Droga e diluentes	71
5.3 Via de administração da droga	72
5.4 Animais	73
5.5 Modelo experimental de dor neuropática	73
5.6 Avaliação nociceptiva mecânica	75
5.7 Coleta da medula espinal e dosagem de proteína total	76

5.8 Imunofluorescência	77
5.9 Avaliação da expressão gênica.....	79
5.9.1 Processamento das amostras e extração do RNA mensageiro.....	79
5.9.2 Síntese de DNA complementar e Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real	80
5.10 <i>Western blotting</i>	81
5.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	83
5.12 Dosagem indireta de óxido nítrico (Reagente de Griess).....	84
5.13 Zimografia em gel	85
5.14 Análise estatística	86
6 RESULTADOS	88
6.1 A hipernocicepção mecânica induzida por SNI é dependente do AP-1	88
6.2 Inibição da ativação do c-jun nuclear na medula espinal pela SR11302	93
6.3 Ativação de células gliais na medula espinal provocada pela SNI é dependente do AP-1	96
6.4 Ativação de proteinocinases ativadas por mitógenos provocada pela SNI é dependente do AP-1	100
6.5 Aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1	105
6.6 Aumento na expressão de quimiocinas na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1	110
6.7 Aumento na concentração de óxido nítrico e na expressão da óxido nítrico sintase induzível na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1	113
6.8 Aumento da atividade gelatinolítica das gelatinases provocado pela SNI é dependente do AP-1	116
7 DISCUSSÃO	122
8 CONCLUSÃO.....	139
REFERÊNCIAS.....	141
ANEXOS	166

ANEXO A - Certificado do comitê de ética para experimentação animal.....	166
ANEXO B - Manuscrito	Erro! Indicador não definido.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

O primeiro relato sobre dor que se conhece foi feito por Cornelius Celsius (30 a.C.-38 d.C.), que se referia à dor como um dos sinais cardinais clássicos da inflamação aguda (Wall PD & Melzack R, 1999). Fisiologicamente, a dor integra o controle homeostático, alertando o corpo de perigo iminente ao organismo, o que a torna um sinal clínico importante para detecção e avaliação de diversas patologias, além de ser uma característica evolutiva essencial à vida (Basbaum *et al.*, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) atribui à dor uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial. A dor pode ser caracterizada clinicamente em quatro categorias relacionadas a substratos anatômicos, fisiológicos e psicológicos: nocicepção, percepção da dor, sofrimento e comportamento da dor (Loeser, 1980).

A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção, através de nociceptores, normalmente seletiva de estímulos que podem comprometer a integridade física do organismo; já a percepção da dor depende de experiências emocionais, motivacionais e psicológicas. Portanto, o termo dor é mais apropriado para experiências humanas. Em animais, a dor é avaliada indiretamente pela observação comportamental evidenciada. Em função disso, a diminuição do limiar nociceptivo será referida neste trabalho como hipernocicepção, quando estiver relacionada a animais de experimentação e como hiperalgesia, quando em humanos (Ferreira *et al.*, 2009).

Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas. Entretanto, o termo nociceptor é geralmente utilizado, inclusive neste trabalho, para caracterizar o neurônio nociceptivo primário inteiro. Os nociceptores são considerados neurônios pseudounipolares, haja vista que seu ramo axonal distal se dirige à periferia e o ramo axonal proximal ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral (Loeser & Melzack, 1999). Em condições fisiológicas, os nociceptores possuem alto limiar de ativação, ou seja, estímulos de baixa

intensidade, por exemplo, toques leves com as mãos, não desencadeiam ativação dessas fibras. Os estímulos nociceptivos, sejam eles físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (prostaglandina, serotonina, bradicinina, capsaicina e/ou prótons, por exemplo), são detectados pelos nociceptores localizados nos diferentes tecidos, principalmente na pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores que inervam a cabeça e o pescoço compõem os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares, principalmente, no gânglio trigeminal. Já os corpos celulares de fibras que inervam o tronco e membros se encontram nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal (GRD) (Julius & Basbaum, 2001; Kandel ER *et al.*, 2000; Millan, 1999).

A transmissão da informação nociceptiva ocorre através das fibras aferentes primárias, classificadas de acordo com seu diâmetro, estrutura, velocidade de condução e pela intensidade e qualidade da dor. As fibras C, de espessura fina (0,4 a 1,2 milímetros de diâmetro), não mielinizadas, de condução lenta ($0,5$ a 2 m.s^{-1}), são, provavelmente, responsáveis pela dor de longa duração e difusa. As fibras A delta ($A\delta$), de espessura média (2 a 6 mm de diâmetro), pouco mielinizadas, de condução intermediária (5 a 30 m.s^{-1}), são, provavelmente responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante. As fibras $A\delta$ respondem, de modo geral, a estímulos nocivos mecânicos e térmicos; as fibras C a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, por isso, chamadas de polimodais (Loeser & Melzack, 1999).

Além dessas, as fibras A beta ($A\beta$), de maior diâmetro, ricas em mielina, detectam principalmente estímulos inócuos, no entanto, durante certos processos patológicos, podem transmitir informações inócuas como se fossem nociceptivas, e isso parece ocorrer em síndromes neuropáticas (Basbaum *et al.*, 2009). Há, ainda, uma subpopulação de fibras C com alto limiar de ativação, chamadas de nociceptores silenciosos, os quais não são responsivos a estímulos térmicos ou mecânicos em condições normais. Todavia, durante um processo patológico, por exemplo, em lesões nervosas, essas fibras podem ficar mais suscetíveis à ativação, tornando-se responsivas a estímulos normalmente inócuos (Schaible & Schmidt, 1988).

A informação nociceptiva transcorre pelos nociceptores dos membros e tronco até o sistema nervoso central, no qual adentra pelo corno dorsal da medula espinal, onde há sinapses com neurônios de segunda ordem. A comunicação entre esses neurônios nociceptivos depende da liberação de diversos neurotransmissores, por

exemplo, o glutamato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Liu *et al.*, 1997;Schneider & Perl, 1994). O corno dorsal da medula espinal é didaticamente dividido em 10 lâminas (I-X), sendo a lamina I a mais superficial a partir da região dorsal (REXED, 1954). As lâminas mais superficiais são notoriamente nociceptivas, ao passo que as mais profundas respondem a uma grande variedade de estímulos, de diversas intensidades e naturezas (Ferreira *et al.*, 2009).

A propagação da informação nociceptiva dos neurônios de primeira para os de segunda ordem sofre modulações estimulatórias e/ou inibitórias. Após essas modulações, a informação nociceptiva ascende pelos tratos nervosos espinotalâmico ou espinoreticulotalâmico em direção ao tálamo, tronco cerebral (núcleo parabraquial) e amígdala. No tálamo, essa informação é redirecionada para o córtex somatossensorial, o qual fornece informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. As projeções do núcleo parabraquial e amígdala convergem para o córtex insular e cingular, atribuindo o componente afetivo-emocional à experiência dolorosa (Basbaum *et al.*, 2009;Noback CR *et al.*, 1996).

Muitas vezes, a dor é decorrente de um quadro inflamatório e este é caracterizado pela presença de diversos sinais, além da dor, o edema e a migração de leucócitos para o local da lesão. A partir da década de 80, estudos demonstraram uma correlação positiva entre recrutamento de leucócitos e hipernocicepção (Jones *et al.*, 1991). A importância dos neutrófilos na hipernocicepção mecânica desencadeada por agentes inflamatórios, tais como carragenina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β e quimiocina derivada de queratinócito (KC) ficou claramente demonstrada pelo bloqueio da hipernocicepção pelo tratamento prévio com fucoidina, droga inibidora da adesão leucocitária (Cunha *et al.*, 2008). Porém, na hipernocicepção mecânica provocada pela prostaglandina (PG) E₂ e dopamina, a migração de neutrófilos parece não influenciar (Cunha *et al.*, 1992;Ferreira *et al.*, 1993).

Em muitos casos, a dor inflamatória não é resolvida pelo próprio organismo, nem mesmo com terapias medicamentosas, podendo se tornar um quadro crônico. A dor crônica, não apenas de origem inflamatória, tem sido um dos maiores desafios na terapêutica analgésica.

1.2 Dor crônica

A dor crônica, atualmente, é um dos principais vilões econômicos na saúde pública, já que acomete quase um terço da população mundial. A dor crônica é assim denominada quando extrapola a função de reflexo e/ou defesa do organismo (condições fisiológicas), tornando uma doença *per se*, associada à redução da qualidade de vida e pode ser acompanhada de ansiedade, depressão ou insônia (Dworkin *et al.*, 2010; Kalso *et al.*, 2004).

De acordo com a IASP, a dor crônica é aquela que persiste além do tempo normal de cicatrização, o que pode acontecer em um tempo inferior a um mês, mas também pode superar seis meses (International Association for the Study of Pain, 2013). As síndromes dolorosas crônicas resultantes de lesões primárias ou disfunções de estruturas do sistema nervoso periférico ou central, as quais podem acometer raízes e nervos periféricos, nervos cranianos, medula espinal ou cérebro, são classificadas como dor neuropática (Merskey, 1994).

1.2.1 Dor neuropática

A dor neuropática pode surgir sem causa aparente, entretanto, pode ser uma patologia secundária a alguma outra, por exemplo, câncer, diarreia, herpes zoster, esclerose múltipla, hipóxia, infarto, síndrome da imunodeficiência humana (Mika *et al.*, 2013).

A caracterização da dor neuropática é complexa e heterogênea, pois os sintomas podem oscilar no tipo, na intensidade, no tempo etc. Mas, as principais características da dor neuropática são hiperalgesia (sensação dolorosa aumentada a estímulo doloroso), dor espontânea e alodinia (dor provocada por estímulos não nocivos). Outros sintomas também podem ocorrer, como hipersensibilidade, inflamação neurogênica, extraterritorialidade (dor em locais até então não afetados), entre outros (Wall & Gutnick, 1974a). Essas manifestações estão associadas a alterações no sistema somatossensorial, com provável sensibilização dos neurônios

aferentes primários periféricos e neurônios centrais (Baron & Binder, 2004), fenômenos denominados sensibilização periférica e central, respectivamente.

A sensibilização central e periférica pode ser identificada especialmente pela redução do limiar nociceptivo, ou seja, aumento na responsividade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal a estímulos diversos. Isso porquê ocorrem alterações plásticas nos neurônios e células envolvidas na transmissão nervosa e manutenção dos neurônios, como células da glia (Woolf, 2011). As alterações plásticas na dor neuropática costumam ocorrer em nível do corno dorsal da medula espinal, neurônios de projeção nas lâminas I e V e neurônios das vias descendentes de controle da dor (White *et al.*, 2009). O aumento na síntese e liberação de aminoácidos excitatórios e redução na de aminoácidos inibitórios, aumento na expressão de canais de sódio tetrodoxina-resistentes, fechamento de canais de potássio dependentes de trifosfato de adenosina (ATP), ativação de células gliais, são alguns exemplos dessas alterações plásticas que ocorrem na dor neuropática, contribuindo para a facilitação do estímulo doloroso (Sotgiu & Biella, 2000; Casals-Diaz *et al.*, 2009). Com isso, os neurônios sensibilizados permitem que impulsos nervosos normalmente não nocivos provoquem dor (alodinia) e a resposta a estímulos que já provocavam dor é intensificada (hiperalgesia) (Ji *et al.*, 2003).

Apesar de haver muitos grupos de pesquisa que tentam compreender melhor a fisiopatologia da dor neuropática, esse mal ainda é pouco esclarecido. Em reflexo disso, o tratamento farmacológico para essa patologia é bem limitado, afinal, atualmente, as opções mais eficazes são as mesmas que anos atrás: analgésicos opioides, anticonvulsivantes, antidepressivos, antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), corticoides e imunomoduladores (Mika *et al.*, 2013). Entretanto, essas opções terapêuticas não são eficazes para a maioria dos usuários e, nos que são responsivos a alguma dessas opções, em algum momento, geralmente, a terapia medicamentosa se torna falha ou perde sua eficácia. Por isso, são necessários estudos rebuscados acerca do entendimento da dor neuropática para que novos fármacos sejam produzidos.

Apesar de o entendimento da fisiopatologia da dor neuropática ser pequeno, nas duas últimas décadas, a ativação de células não neuronais, como as células da glia, começou a ser correlacionada com a sensibilização central e com a fisiopatologia da dor neuropática (Stuesse *et al.*, 2001; Hald *et al.*, 2009; Austin & Moalem-Taylor, 2010).

1.2.1.1 Papel das células gliais na dor neuropática

No sistema nervoso central, as células gliais são as mais abundantes, muito mais que os neurônios, inclusive. Elas são divididas em macroglia (astrócitos, oligodendrócitos e células radiais – células de Bergmann e células de Müller) e microglia, com características específicas. Essas células contribuem para a homeostase do sistema nervoso central, porque apesar de não serem células transmissoras de impulsos nervosos, participam na síntese, liberação e recaptação de diferentes neurotransmissores (Mika *et al.*, 2013;Gosselin *et al.*, 2010). Elas também preservam a integridade da barreira hematoencefálica e da bainha de mielina, nutrem os neurônios e participam de mecanismos de defesa (Watkins *et al.*, 2005;Watkins *et al.*, 2007).

A microglia é caracterizada por células relacionadas aos macrófagos residentes no sistema nervoso central, que desencadeiam respostas imunes inatas. A microglia é identificada nos estados de repouso e ativação. No seu estado ativado, a microglia libera fatores pró-inflamatórios e aumenta a expressão de marcadores específicos, como a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), o antígeno de diferenciação (CD11b), entre outros (Gosselin *et al.*, 2010;Mika *et al.*, 2013). A microglia se encontra intensamente ativada em condições hipernociceptivas crônicas experimentais (Beggs & Salter, 2007;Chang *et al.*, 2010;Ji & Suter, 2007;Tsuda *et al.*, 2005). A ativação da microglia é, geralmente, seguida por migração de células para o local da lesão, fagocitose e produção e liberação de inúmeras substâncias pró-inflamatórias. A microglia é a principal fonte de mediadores inflamatórios no sistema nervoso central (Ji & Suter, 2007), entre eles, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), quimiocinas (fractalquina, proteína inflamatória derivada de macrófago (MIP) 1 α e 1 β), compostos citotóxicos (óxido nítrico sintase induzível (NOSi), radicais livres de oxigênio e nitrogênio) e ativação dos astrócitos, mediadores que colaboram para a ocorrência da sensibilização central (Tsuda *et al.*, 2005;Gao, 2010;DeLeo & Yezierski, 2001;Hathway *et al.*, 2009;Ji & Suter, 2007;Milligan & Watkins, 2009). Assim, a microglia, bem como seus ativadores e as vias ativadas por ela constituem um importante alvo farmacológico na terapia medicamentosa para o tratamento da dor neuropática.

Os astrócitos são as células mais abundantes da macroglia e estão envolvidos no controle de uma série de eventos, por exemplo, da manutenção da homeostase iônica extracelular, da liberação e recaptação de neurotransmissores, da integridade da barreira hematoencefálica, do metabolismo, entre outros (Gosselin *et al.*, 2010). Assim como a microglia, os astrócitos, fisiologicamente, encontram-se em estado de repouso, expressando níveis basais de seus marcadores, por exemplo, proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina e proteína S-100 (Kimelberg, 2004). Após estimulação nociva, os astrócitos entram em estado de ativação, aumentando a expressão desses marcadores, além da redução na recaptação de glutamato. Ainda, há aumento na liberação de diversos neurotransmissores, como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), óxido nítrico (NO), quimiocinas (KC; proteína quimioatraente de monócitos-1, MCP-1), prostaglandinas, aminoácidos excitatórios, ATP, dentre outros (Gosselin *et al.*, 2010; Mika *et al.*, 2013). Todos esses mediadores provocam sensibilização central, facilitando a condução nervosa nociceptiva. Assim como a microglia, os astrócitos e suas vias ativadoras e ativadas são promissores alvos farmacológicos para o tratamento da dor neuropática (Gao & Ji, 2010b). Mas apenas a partir do início da década de 90 que a ativação astrocitária na medula espinal começou a ser associada à hipernocicepção neuropática (Stuesse *et al.*, 2001; Coyle, 1998; Honore *et al.*, 2000; Vega-Avelaira *et al.*, 2007).

Em modelos experimentais de dor neuropática, é evidente a participação de células gliais e consequente facilitação da condução nervosa da dor. Inclusive, há mudanças morfológicas profundas dessas células, além de proliferação celular, tanto da microglia quanto dos astrócitos após lesão nervosa (Ji & Suter, 2007). De fato, foi demonstrado que inibidores da ativação/atividade das células gliais, como flurocitrato, minociclina, alfa-aminoadipato e propentofilina atenuou os sinais da dor neuropática (Watkins *et al.*, 2001; Raghavendra *et al.*, 2003a).

Além da síntese/liberação de citocinas pró-inflamatórias desencadeada pela ativação de células gliais em modelos experimentais de dor neuropática (Kawasaki *et al.*, 2008a; Sweitzer *et al.*, 2001; Milligan *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2006; Tsuda *et al.*, 2005), há também ativação de proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Gao *et al.*, 2009; Terayama *et al.*, 2011). Além disso, as MAPKs são ativadas por diferentes mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas etc.), assim como podem induzir a produção/liberação desses mediadores (Eferl &

Wagner, 2003). Por isso, as MAPKs são extremamente importantes na fisiopatologia da dor neuropática.

1.2.1.2 Participação das proteinocinases ativadas por mitógenos na dor neuropática

As MAPKs são consideradas mediadores intracelulares gliais e são classificadas em três principais famílias de cinases, com vias distintas: cinase N-terminal c-Jun (JNK), cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) e p38. A participação de todas essas está atrelada a processos dolorosos experimentais, inclusive na indução e manutenção da dor neuropática (Zhuang *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2003), através de regulação transcricional e não transcricional (Ji & Suter, 2007). Posteriormente à indução de dor neuropática experimental, há aumento na ativação de ERK, JNK e p38 em diferentes populações de neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula espinal e em células gliais (Obata *et al.*, 2004).

Entre as MAPKs conhecidas, a JNK é a menos estudada em relação a processos dolorosos, porém não menos importante. A JNK, também chamada de proteinocinase ativada pelo estresse (SAPK), possui três isoformas conhecidas: JNK1, JNK2 e JNK3 (Davis, 2000). Das três isoformas, a JNK1 e JNK2 são altamente expressas na medula espinal e são relacionadas com processos dolorosos. Na forma ativa (fosforilada), a predominância na medula espinal é da JNK1 (p46) (Ji *et al.*, 2009). Apesar de ter sido demonstrado que a JNK1 e JNK2 têm participação distinta na dor neuropática (Manassero *et al.*, 2012), a maioria dos estudos de processos dolorosos não distingue uma da outra (Lee *et al.*, 2013). Nos astrócitos, a via da JNK pode ser ativada por diferentes estímulos, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , e, assim, leva a produção e liberação de IL-6, IL-1 β , PGE₂, NO e MCP-1 (Hansen & Malcangio, 2013).

A ativação de JNK astrocitária contribui para a hipersensibilização neuronal (sensibilização central) em diferentes tipos de lesão nervosa, via regulação transcricional do fator de transcrição c-Jun, principal componente do fator de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1) e de MCP-1 (Ji *et al.*, 2006). Em modelo

experimental de lesão do nervo ciático, a MCP-1 provoca sensibilização central rápida, dentro de minutos, após lesão, via ativação da ERK e aumento da transmissão sináptica excitatória nos neurônios do corno dorsal da medula espinal (Gao *et al.*, 2009).

A família das ERK está envolvida em muitos processos celulares e também em processos dolorosos, inclusive da dor neuropática, onde se encontra ativada nos neurônios, microglia e nos astrócitos (Zhuang *et al.*, 2005). A participação da ERK na sensibilização central ocorre devida, pelo menos em parte, à ativação da cinase s6 ribossomal (Rsk) e subsequente fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta do monofosfato cíclico de adenosina - AMPc (CREB), desencadeando ativação transcricional de diversos genes, por exemplo, c-Fos, dinorfina, encefalina e neuropeptídeo Y (Ji *et al.*, 1999).

A p38 está associada a processos dolorosos, por exemplo, artrite reumatoide e dor inflamatória (Guma *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2009). Em modelo experimental de dor neuropática, os níveis de p38 fosforilada na microglia estão elevados, acompanhado pelo aumento em sua atividade, comprovado pelo aumento da expressão do fator ativador 2 de transcrição (ATF2), seu principal substrato (Ji & Suter, 2007) e que é também um dos principais componentes do fator de transcrição AP-1. Em consequência de lesão experimental de nervo, a ativação da p38 localizada na microglia acarreta ativação de diversos fatores de transcrição, os quais levam à expressão de diferentes mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO e outros, os quais colaboram na facilitação da transmissão da dor (Ji & Suter, 2007).

A relação entre células gliais e as MAPK é muito mais complexa do que se imagina. A ativação das células gliais e das MAPK desencadeia uma série de eventos, coordenados por fatores de transcrição. Fator de transcrição é a denominação dada a proteínas que se ligam a sequências específicas de DNA e, assim, controlam a transcrição da informação genética do DNA para o RNA mensageiro (RNAm) (Latchman, 1997; Karin, 1990). Além disso, a inibição de fatores de transcrição é bastante interessante como ferramenta farmacológica, pois a inibição afeta os genes controlados por esse fator, por exemplo, a inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), pois inibe também os diferentes mediadores pró-inflamatórios controlados por ele, sendo assim, um promissor alvo farmacológico no tratamento do câncer e de doenças inflamatórias (Perkins, 2012).

1.2.1.3 Participação de fatores de transcrição na dor neuropática

A ativação de fatores de transcrição e consequente aumento na expressão dos seus genes-alvo está relacionada com a cronificação do processo doloroso. Os fatores de transcrição exercem controle sobre a transcrição genética sozinhos ou em conjunto com outra proteína, formando um complexo, promovendo (ativador) ou bloqueando (repressor) o recrutamento da RNA polimerase, enzima responsável pela transcrição da informação genética do DNA de genes específicos para o RNA (Lee & Young, 2000; Nikolov & Burley, 1997; Roeder, 1996).

Em um processo doloroso, a literatura sugere que NF- κ B e o AP-1 sejam os mais importantes (Barnes & Karin, 1997; Xu *et al.*, 2001).

1.2.1.3.1 Proteína ativadora 1 (AP-1)

A proteína ativadora-1 (AP-1) foi primeiramente identificada como um fator de transcrição que se liga a um elemento essencial *cis* da região promotora metalotioneína IIa humana (hMTIIa) (Lee *et al.*, 1987a), sendo indispensável para a atividade ótima dessa região (Haslinger & Karin, 1985; Karin *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987a). O AP-1 é conhecido como o fator de transcrição que medeia a indução de genes provocada pelo acetato de tetradecanoilforbol (TPA), um éster de forbol promotor de tumor e, por isso, o TPA é rotineiramente utilizado como controle positivo desse fator de transcrição. Essa indução acontece na região consenso que contém o elemento responsivo ao TPA (TRE) (Angel *et al.*, 1987).

O AP-1 participa na regulação da homeostase tecidual, proliferação, crescimento, diferenciação, transformação, apoptose e migração celular (Eferl & Wagner, 2003). A participação desse fator de transcrição tem sido reportada também em doenças humanas, como doenças de pele e ossos, psoríase, fibrose e, principalmente, câncer (Liu *et al.*, 2002; Zenz *et al.*, 2008a; Zenz *et al.*, 2005; Eferl *et al.*, 2008). Por isso, a inibição do AP-1 parece ser uma alternativa futura na terapêutica de diversas patologias (Kim & Iwao, 2003; Zenz *et al.*, 2008b; Schonthaler

et al., 2011a). Todavia, os inibidores de AP-1 disponíveis para estudos científicos são bastante restritos. Essas drogas, geralmente, não são seletivas, visto que a maioria é análogo sintético do ácido retinoico, e muitos deles ativam os elementos responsivos ao ácido retinoico (RARE), aumentando a possibilidade de ocorrência de efeitos indesejáveis (Fanjul *et al.*, 1994).

O AP-1 é encontrado em muitos tipos celulares e pode ser estruturalmente formado, até onde se sabe, por proteínas das famílias Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, Fra1, Fra2, FosB), fator ativador de transcrição (ATF) ou do fibrosarcoma musculoponeurótico (MAF) (Vesely *et al.*, 2009; Eferl & Wagner, 2003), dispostas como homo ou heterodímeros, ligadas por uma estrutura chamada de zíper de leucina (Glover & Harrison, 1995).

A formação dimérica do AP-1 (Tabela 1) determina os genes que serão regulados por esse fator de transcrição, logo, algumas composições do AP-1 possuem maior poder de transativação (habilidade de induzir transcrição de genes-alvo) que outras. Por exemplo, quando o AP-1 é composto por proteínas com elevado poder de transativação, como c-Jun, c-Fos ou FosB, a transcrição genética é muito mais eficiente (Jochum *et al.*, 2001). Ao contrário, o AP-1 tende a perder potência de transativação quando é formado por proteínas com baixo poder de transativação, por exemplo, Fra1 ou Fra2 (Bergers *et al.*, 1995; Foletta *et al.*, 1994). As proteínas c-Fos e Fra1 formam heterodímeros muito estáveis com quaisquer proteínas Jun e possuem especificidade e atividade de ligação ao DNA semelhantes (Suzuki *et al.*, 1991). Os diferentes dímeros que podem compor o AP-1 se ligam com maior ou menor afinidade a distintas sequências-consenso (Tabela 1). Por exemplo, os dímeros Jun-Jun e Jun-Fos se ligam preferencialmente a genes que contêm o TRE (Sharp, 1994; Hess *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1987b), enquanto o dímero Jun-ATF ou homodímeros ATF se ligam preferencialmente ao elemento responsivo ao monofosfato cíclico de adenosina - AMPc (CRE) (Tabela 1) (Eferl & Wagner, 2003).

Tabela 1: Padrões de ligação de c-Jun e c-Fos e os elementos responsivos aos dímeros.

c-Jun		c-Fos	
c-Jun	TRE > CRE	c-Jun	TRE > CRE
JunB	TRE > CRE	JunB	TRE > CRE
JunD	TRE > CRE	JunD	TRE > CRE
FosB	TRE > CRE	ATFa	Não há ligação
Fra1	TRE > CRE	ATF2	TRE > CRE
Fra2	TRE > CRE	ATF4	CRE
ATFa	TRE = CRE	c-MAF	MARE I/II
ATF2	TRE > CRE	MAFA	MARE I/II
ATF3	TRE > CRE	MAFB	MARE I/II
ATF4	CRE	MAFF/G/K	MARE I/II
B-ATF	TRE > CRE		
c-MAF	MARE I/II		
MAFA	MARE I/II		
MAFF/G/K	MARE I/II		

TRE, elemento responsivo ao TPA; CRE, elemento responsivo ao AMPc; MARE, elementos de reconhecimento do MAF. Adaptado de Eferl e Wagner, 2003 (Eferl & Wagner, 2003).

A função das proteínas que compõem o AP-1 para o desenvolvimento normal foi avaliada com a utilização de animais geneticamente modificados. Os animais deficientes em c-Jun são inviáveis, com problemas cardíacos, hepáticos e neurais na fase embrionária. Já os animais deficientes em c-Fos não morrem, mas padecem de osteopetrose, doença caracterizada por ossos muito rígidos, densos. Os deficientes em Fra1 também são inviáveis em fase embrionária, pois os tecidos extraembrionários e a placenta são defeituosos. Já os deficientes em Fra2 morrem ao nascer, com problemas cardíacos, ossos e intestino (Eferl & Wagner, 2003).

No câncer, o c-Jun, principal componente do AP-1, mostrou-se oncogênico, ao passo que JunB e JunD antioncogênicos. Mas, é muito ímprobo garantir uma regularidade quanto a isso, pois o AP-1 pode ser anti ou pró-oncogênico, dependendo de fatores como o tipo e estágio do tumor, componentes genéticos do tumor, composição dimérica do AP-1, dentre outros (Eferl & Wagner, 2003).

A composição mais comum do AP-1 em células de mamíferos é o heterodímero formado pelas proteínas c-Jun e c-Fos (Ilustração 1). Entretanto, diferentes dímeros do AP-1 podem ser expressos, de acordo com o estágio e tipo celular durante o desenvolvimento (Eferl & Wagner, 2003; Schonthaler *et al.*, 2011b).

O c-Jun, normalmente, é pouco expresso, mas sua expressão se torna elevada em resposta a estímulos variados, como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e irradiação ultravioleta (Karin, 1995).

A formação do dímero do AP-1 composto por c-Jun depende de prévia fosforilação nos seus resíduos Ser63 e Ser73, desencadeada pela JNK, aumentando seu potencial de transativação (Herbein *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que c-Jun é essencial não apenas na embriogênese (Hilberg *et al.*, 1993), mas também na regeneração axonal (Raivich *et al.*, 2004), regeneração hepática (Behrens *et al.*, 2002) e desenvolvimento de células T (Riera-Sans & Behrens, 2007). Com isso, c-Jun/AP-1 tem emergido como um promissor alvo terapêutico para o tratamento de diversas patologias (Weiss & Bohmann, 2004), como inflamação aguda, artrite reumatóide (Dass & Choong, 2008) e remodelamento vascular (Kim & Iwao, 2003).

A síntese da proteína c-Fos pode ser aumentada por via dependente da ERK (Ilustração 1) (Taiwo *et al.*, 1989) ou da proteína cinase (PK) C (Liu *et al.*, 2002). Alguns estímulos nociceptivos periféricos, como fatores de crescimento, citocinas, neurotransmissores, estresse e hormônios polipeptídeos aumentam a expressão do c-Fos na medula espinal (Abbadie & Besson, 1992; Abbadie *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1987; Yashpal *et al.*, 1998). Aliás, a expressão do c-Fos nos neurônios ocorre não somente após estimulação nociva aguda e inflamação, mas também em doenças crônicas que envolvem dor, por exemplo, artrite reumatoide (Abbadie & Besson, 1992). A proteína Fos é induzida rapidamente, até mesmo após meros estímulos despolarizantes, por isso a expressão de c-Fos é também utilizada no mapeamento de atividade neuronal (Gao & Ji, 2009; Intondi *et al.*, 2008; Beedles *et al.*, 1999).

Ilustração 1: Representação da principal composição do fator de transcrição AP-1. O dímero mais comumente encontrado do AP-1 é composto por c-Jun e c-Fos e contém o domínio de ligação do DNA (DNA-BD), a região do zíper de leucina (LZ), o módulo de ativação ou transativação da transcrição (TA) e os domínios de ligação para as proteinocinases ativadas por mitógenos ERK (ERK-BD), no caso de c-Fos, e JNK (JNK-BD), em c-Jun. Modificado de Raivich e Behrens, 2006 (Raivich & Behrens, 2006).

A regulação da atividade do AP-1 é complexa e ocorre em diferentes níveis, além da composição do dímero do AP-1, como dito anteriormente, na transcrição, pós-translação, na estabilidade proteica ou por interação com outros fatores de transcrição auxiliares (Schonthaler *et al.*, 2011b).

O AP-1 é sintetizado e/ou ativado em decorrência de inúmeros estímulos (Ilustração 2), dentre eles fatores de crescimento, irradiação ultravioleta, quimiocinas, citocinas, neurotransmissores, ativadores de células T, hormônios e estresse oxidativo (Wagner & Nebreda, 2009; Karin, 1996).

A maioria dos genes que codificam os componentes do AP-1 são genes de expressão imediata (IEG), cuja transcrição ocorre rapidamente após estimulação celular (por exemplo, de fatores de crescimento), sem que haja necessidade de nova síntese proteica para manter um estoque, como acontece com os fatores de transcrição constitutivos. Esses genes são expressos de maneira transitória, gerando RNAm com tempo de meia-vida reduzido (Karin, 1995).

Normalmente, os IEGs possuem expressão basal reduzida, até que haja estímulo. O CRE medeia a indução de c-Fos em resposta a neurotransmissores e hormônios polipeptídeos, os quais utilizam o AMPc ou íons cálcio como segundo

mensageiro, ativados pela PKA ou pela proteinocinase dependente de calmodulina, respectivamente (Sheng *et al.*, 1991). Em outro aspecto, o c-Fos é induzido pelo elemento responsivo ao soro (SRE) quando há estímulo de fatores de crescimento, citocinas e outros estímulos que ativam MAPK (Treisman, 1992). As MAPK são ativadas por cinases das MAPK (MAPKK) e estas, por sua vez, são ativadas por diferentes fatores externos, como éster de forbol, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, estresse (Ilustração 2). A expressão de c-Fos pode ser induzida também por fatores complexos ternários (TCF) e ambos os fatores são ativados mediante fosforilação induzida por ERK (Ilustração 2). Os fatores de transcrição c-Fos e o fator potenciador específico de miócito 2C (MEF2C) induzem a expressão de c-Jun (Ilustração 2). A ativação transcricional da família Jun não ocorre rotineiramente apenas pela atividade da JNK, mas também pela autorregulação da família Jun (Smeal *et al.*, 1989). Quando expostos a estímulos diversos, como citocinas, as isoformas JNK são ativadas, acarretando rápida fosforilação, especialmente, de c-Jun e ATF2 (Karin, 1995).

No processo de indução genética, a grande maioria dos tipos celulares possui a proteína c-Jun anteriormente a quaisquer estímulos (Karin, 1995). Pelo menos em parte, o aumento da atividade do AP-1 em resposta a estímulos que ativam JNK, por exemplo, TNF- α e irradiação ultravioleta, é devido ao aumento na síntese de c-Jun e, possivelmente, também de c-Fos (Karin, 1995).

O aumento da ativação do AP-1, através da hiperfosforilação de c-Jun e c-Fos, pelas MAPKs (Karin *et al.*, 1997a;Wagner, 2001) aumenta a estabilidade dessas proteínas, que se translocam para o núcleo celular, onde irão combinar com proteínas Jun pré-existentes, formando dímeros muito estáveis de AP-1 (Smeal *et al.*, 1989). Depois de formado, o AP-1 também pode sofrer fosforilação por ação de cinases específicas, como a glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β), a ribossomal S6 cinase 2 (RSK2) e a caseína cinase II (CKII), aumentando ainda mais o potencial de transativação e atividade de ligação ao DNA do AP-1 (Ilustração 2) (Eferl & Wagner, 2003).

Ilustração 2: Ativação transcricional e pós-translacional do AP-1. A atividade do AP-1 é estimulada por muitos fatores externos (fatores de crescimento, estresse, citocinas, éster de forbol, radiação UV) e pela família de proteinocinasas ativadas por mitógenos (MAPK) ERK, p38 e JNK. Essas, por sua vez, são previamente fosforiladas por cinases de MAPK (MAPKK), a família das MKK. A seta pontilhada indica que a fosforilação de p38 pela MKK4 é controversa. As MAPK ativam diversos fatores de transcrição, dentre eles os fatores de transcrição ternários (TCF), o fator potenciador específico de miócito 2C (MEF2C), o fator ativador 2 de transcrição (ATF2) e Jun, os quais induzem a transcrição de genes Fos e Jun. Consequentemente aumentam o número de complexos AP-1 e dos genes ativados por AP-1. A fosforilação pós-translacional do AP-1 por diversas cinases regula a atividade do AP-1: aumenta o potencial de transativação e a estabilidade e capacidade dos componentes do AP-1 se ligarem ao DNA. CKII, caseína cinase II; GSK-3β, glicogênio cinase sintase 3β; RSK2, ribossomal S6 cinase 2; SRE, elemento responsivo ao soro. Adaptado de Eferl e Wagner, 2003 (Eferl & Wagner, 2003).

O AP-1, bem como o NF- κ B, é essencial para a manutenção do estado fisiológico e patológico do sistema imune. Em doenças inflamatórias crônicas, esses fatores de transcrição determinam os genes de citocinas que serão ativados, modulando a progressão da doença (Herbein *et al.*, 2006). Na dor neuropática, pouco se sabe ainda do envolvimento e função do fator de transcrição AP-1. Como se trata de uma patologia que atinge cerca de um terço da população e não há tratamentos realmente eficazes, é muito importante que a patofisiologia desse mal seja mais bem compreendida. Por conseguinte, mais opções terapêuticas poderão ser disponibilizadas.

Com essa preocupação, o presente trabalho estudou a participação do AP-1 na dor neuropática, com o auxílio da ferramenta farmacológica SR11302, droga inibidora do AP-1 (vide Material e métodos). Sendo o AP-1 um fator de transcrição, ele promove a expressão de diversos genes e, quando inibido (SR11302), as vias a jusante (*downstream*) do AP-1 são inibidas também, constituindo um complexo alvo farmacológico no tratamento da dor neuropática. Na dor neuropática experimental, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-17A, quimiocinas (KC e MCP-1), óxido nítrico e sua enzima produtora NOSi e metaloproteinases da matriz extracelular 2 e 9 são bastante importantes, pois contribuem para sua indução e manutenção (sensibilização central). Por isso, neste trabalho, foi avaliado se na dor neuropática experimental há participação do AP-1 e se este induz a expressão desses mediadores pró-inflamatórios.

1.2.1.4 Mediadores pró-inflamatórios na dor neuropática

Como dito anteriormente, os genes que são ativados a jusante (*downstream*) do AP-1 dependem principalmente da composição dimérica desse fator. O AP-1 é associado a uma infinidade de vias de sinalização extra e, principalmente, intracelulares (Foletta *et al.*, 1998). Por isso, há muito ainda para se descobrir sobre os genes induzidos após ativação do AP-1. Esse fator de transcrição foi correferido com processos e mediadores inflamatórios, ativação de células T, importantes na imunidade. A co-estimulação dessas células induz, via dependente de AP-1, a

produção de IL-2, TNF- α (Tsai *et al.*, 1996), interferon gamma (IFN- γ), fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), IL-3 e IL-8 (em camundongos, KC) (Foletta *et al.*, 1998). O AP-1 também participa na diferenciação de monócitos induzidos por TPA, TNF- α ou IL-6 (Mitchell *et al.*, 1986; Brach *et al.*, 1990).

As proteínas que compõem o AP-1 podem interagir não somente entre elas, mas também com outros fatores de transcrição, como o fator nuclear de células ativadas (NFAT) e CREB, ambos relacionados com a transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios (Foletta *et al.*, 1998).

As citocinas pró-inflamatórias estão presentes em todos os processos inflamatórios, em algum momento, provocando, normalmente, hipersensibilização e hipernocicepção (Kawasaki *et al.*, 2008b). O TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias atualmente conhecidas. É uma citocina pleiotrópica (atua sobre muitos tipos celulares) e tem sua expressão elevada em diversas síndromes, por exemplo, síndrome de Guillain-Barré, artrite reumatoide e diferentes tipos de dor neuropática (Ohtori *et al.*, 2004). O TNF- α é liberado por todas as células imunes, inclusive as células gliais, como descrito anteriormente. Ela é considerada o principal mediador da dor crônica central e, por isso, o bloqueio das ações da mesma já é utilizado na terapêutica para algumas patologias, por exemplo, artrite reumatoide, enterite e psoríase (Mika *et al.*, 2013).

Após lesão de nervo em ratos, citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , IL-1 β e IL-6, são induzidas nos GRD da medula espinal, gerando hipersensibilização dos corpos celulares e axônios dos nociceptores, contribuindo para a sensibilização central (Sommer & Kress, 2004; Schafer *et al.*, 2003). Essa sensibilização provocada pelo TNF- α e IL-1 β foi atribuída à ativação dos canais de sódio resistentes à tetrodoxina 1.8 (Nav 1.8), reduzindo o limiar de ativação destes neurônios (Coggeshall *et al.*, 2004; Jin & Gereau, 2006), tornando a transmissão de estímulos nociceptivos mais fácil.

A IL-6 é secretada frequentemente por macrófagos, embora também seja liberada por células gliais (Milligan *et al.*, 2003). Os níveis dessa citocina se encontram aumentados em animais experimentais com lesão de nervo, nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal, principalmente na microglia (Dominguez *et al.*, 2008) e neurônios (Yamauchi *et al.*, 2006). Na dor neuropática, a IL-6 induz aumento na expressão do receptor de fractalquina (CX3CR1) na medula espinal, via

ativação da MAPK p38, resultando na liberação de TNF- α , IL-6, IL-1 β e outras, provocando ativação da microglia e sensibilização central (Mika *et al.*, 2013).

Além dessas, outras citocinas pró-inflamatórias têm ganhado espaço na comunidade científica, por exemplo, a IL-17A, um subtipo da IL-17, secretada por células Th17, T CD8, *natural killer*, monócitos e neutrófilos ativados (Segond von *et al.*, 2013) e também por astrócitos. A IL-17A induz ativação da microglia e dos astrócitos, induzindo produção de diversos mediadores, como IL-6, IL-8 e PGE₂ (Meng *et al.*, 2013). A administração intraplantar ou intraneural da IL-17 desencadeia hipersensibilidade mecânica e térmica em camundongos (Kim & Moalem-Taylor, 2011). A IL-17 parece ser importante também na hipernocicepção causada pela artrite reumatóide experimental, através da indução da liberação de TNF- α , IL-1 β , quimiocina derivada de queratinócito (KC), PGE₂ e aumento na atividade da metaloproteinase de matriz extracelular (MMP)-9 na articulação do joelho de camundongos (Pinto *et al.*, 2010). Apenas recentemente, Cheng e colaboradores reportaram que a IL-17A acarreta a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, por via dependente das MAPKs ERK e p38, bem como do AP-1 (Chen *et al.*, 2013).

O AP-1 também está envolvido na transcrição de quimiocinas, que são citocinas altamente especializadas, principalmente, na quimiotaxia de células inflamatórias para o local lesionado e na resposta imune. Entre as quimiocinas conhecidamente induzidas pela ativação do AP-1 está a MIP-1 β (CCL4) (Proffitt *et al.*, 1995). A ativação do AP-1 e do NF- κ B após estimulação de células endoteliais induz a expressão do gene da MCP-1, uma potente quimiocina (Martin *et al.*, 1997), capaz de desencadear sensibilização central.

A MCP-1 é expressa em muitas células, dentre elas monócitos, fibroblastos, células do músculo vascular liso e células endoteliais vasculares quando estimuladas, por exemplo, pela citocinas TNF- α ou IL-1 β (Clark *et al.*, 2013). O aumento na expressão de MCP-1 foi encontrado em algumas doenças, como na artrite reumatóide (Martin *et al.*, 1997). O aumento da expressão de MCP-1 e de seu receptor de quimiocina tipo 2 (CCR2), encontrado em modelo experimental de dor neuropática, está relacionado à facilitação da dor crônica por dois mecanismos. Primeiramente por ação direta da MCP-1 nos neurônios causando hiperatividade dessas células (White *et al.*, 2007; White *et al.*, 2005) e, por indução da ativação da microglia, através do CCR2, que provoca liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios (Zhang *et al.*, 2007; Thacker *et al.*, 2009; Tsuda *et al.*, 2005). A MCP-1 é

também expressa nos astrócitos cerebrais após lesões desmielinizantes, lesão mecânica, isquemia cerebral, estimulação com TNF- α e após lesão experimental do nervo ciático, ambos os últimos casos dependentes da ativação da JNK (Gao *et al.*, 2009).

Apesar da importância da MCP-1, uma das quimiocinas mais estudadas é a IL-8, assim chamada em humanos, homóloga ao quimioatraente-1 de neutrófilos indutor de citocina (CINC-1) em ratos e à quimiocina derivada de queratinócito (KC) em camundongos. A KC exerce seus efeitos devidos ao seu alto poder quimiotático de neutrófilos, através dos receptores CXCR1 e CXCR2 (Manjavachi *et al.*, 2013). Dados do nosso laboratório demonstram que, de modo dose e tempo-dependente, a KC acarreta hipernocicepção mecânica em camundongos (Cunha *et al.*, 2005). Em um modelo experimental de dor neuropática, houve aumento na expressão de KC na medula espinal e o tratamento com o anticorpo anti-KC reduziu a hipernocicepção mecânica e térmica provocadas por esse modelo. Essa hipernocicepção mecânica depende da migração de neutrófilos e também da liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostanoídes (Manjavachi *et al.*, 2013).

Indubitavelmente, os mediadores pró-inflamatórios não se restringem apenas a citocinas e quimiocinas. Há também outras moléculas pró-inflamatórias, enzimas etc. Uma dessas enzimas é a óxido nítrico sintase induzível (NOSi), expressa nos macrófagos, neutrófilos, microglia, fibroblastos, dentre outras células. Essa isoforma da NOS tem sua expressão aumentada em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (Guha & Mackman, 2001), por via dependente de AP-1, haja vista que o gene promotor da NOSi contém o sítio de ligação do AP-1 (Pautz *et al.*, 2010). A indução de NOSi através de AP-1 também ocorre por vias dependentes das MAPK p38 e ERK (Marks-Konczalik *et al.*, 1998). Na dor neuropática diabética, há correlação positiva entre a expressão aumentada de NOSi nos macrófagos e os altos níveis plasmáticos de TNF- α , bem como dos níveis de TNF- α com a gravidade da diabetes (Purwata, 2011). Em diversas condições patológicas ou estímulos físicos ou biológicos, o aumento na expressão e atividade da NOSi é acompanhado de altos níveis do seu principal produto, o óxido nítrico (Reale *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO) é derivado da L-arginina não somente da NOSi, mas também das isoformas neuronal (NOSn) e endotelial (NOSe) da óxido nítrico sintase (Cury *et al.*, 2011). Mesmo que o óxido nítrico tenha papel dual no sistema nociceptivo, está bem documentado que sua liberação está envolvida na

manutenção e transmissão do fenômeno doloroso (Meller & Gebhart, 1993;Dolan *et al.*, 2000). Corroborando com a afirmativa anterior, a hipernocicepção térmica causada pelo modelo experimental de dor neuropática por ligação do nervo ciático, bem como a hipernocicepção e alodinia detectados em ratos submetidos ao modelo de transecção do nervo ciático dependem da produção de óxido nítrico (Meller *et al.*, 1992;Chacur *et al.*, 2010). Após lesão do nervo, ocorre intensa ativação de fibras C, onde há liberação de diversos neurotransmissores, como o glutamato, que contribuem para a sensibilização central. O glutamato pode ativar os receptores NMDA, liberando NO, que se difunde rapidamente pelas terminações nervosas e astrócitos, agindo como um neurotransmissor e aumentando a liberação de CGRP e substância P, contribuindo para a sensibilização central (Cury *et al.*, 2011).

Além disso, o óxido nítrico regula a expressão de uma variedade de genes relacionados à matriz extracelular, incluindo os que codificam o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP) -1 e a metaloproteinase da matriz extracelular (MMP) -9 (Hsu *et al.*, 2007;Ridnour *et al.*, 2007).

1.2.1.5 Participação de metaloproteinases da matriz extracelular (gelatinases) na dor neuropática

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) estão inseridas em uma grande família que engloba mais de 25 endopeptidases, as quais requerem um metal, geralmente zinco, para exercerem sua atividade enzimática (Dev *et al.*, 2010). A localização dessas MMPs é extracelular, predominantemente pericelular e algumas ligadas à membrana, e seus principais substratos são proteínas da matriz extracelular (Kaczmarek *et al.*, 2002). As MMPs se diferem entre si principalmente quanto ao tipo celular em que se situam, regulação da transcrição e especificidade de substrato (Murphy & Nagase, 2008). Em situações fisiológicas, essas enzimas desenvolvem um importante papel nos processos de remodelamento dos tecidos. Porém, o aumento da atividade de algumas MMPs é associado a uma série de processos patológicos, incluindo dor neuropática (Kawasaki *et al.*, 2008a).

As MMPs são genes-alvo do AP-1 (Brenner *et al.*, 1989;Jonat *et al.*, 1990;Schule *et al.*, 1990;Yang-Yen *et al.*, 1990), pois a expressão de diferentes metaloproteinases é controlada por proteínas que formam o dímero AP-1, por exemplo, c-Fos e Fra1, que controlam a expressão de MMP-3 e MMP-1 (Hu *et al.*, 1994). A expressão da MMP-9 (gelatinase B) é influenciada pelo AP-1, mas também está atribuída a diversos outros fatores de transcrição (Kaczmarek *et al.*, 2002). Além do mais, o AP-1 controla a expressão de TIMP-1, inibidor endógeno específico da MMP-9 (Hall *et al.*, 2003), e também a de MMP-2 (gelatinase A) em células cardíacas (Bergman *et al.*, 2003). Logo, a inibição do AP-1, como resultado, também inibir as gelatinases.

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são extremamente importantes na gênese da neuroinflamação, através da clivagem de proteínas da matriz extracelular e ativação de citocinas, por exemplo, TNF- α e IL-1 β , e quimiocinas pró-inflamatórias (Yong, 2005;Parks *et al.*, 2004). Ademais, muitas citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento medeiam a expressão das gelatinases. Nervos periféricos lesados experimentalmente, quando expostos ao fator de crescimento do nervo, TNF- α ou IL-1 β , induzem um aumento na expressão de MMP-9, por intermédio das células de Schwann (Zhang *et al.*, 2011;Chattopadhyay *et al.*, 2007).

Além disso, as gelatinases são responsáveis pela atividade catalítica sobre constituintes da matriz extracelular dos vasos, como colágeno, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina (Murphy & Nagase, 2008). A atividade líquida das MMPs é dependente da quantidade de enzima transcrita, da ativação dos zimogênios, que são formas inativas nas quais as MMPs são secretadas, e da interação com os TIMP's (Ra & Parks, 2007). Diferentes MMPs são constitutivamente expressas no cérebro de camundongos, tais como MMP-2, -9, -11, -12 e -14, mesmo que em baixos níveis (Sekine-Aizawa *et al.*, 2001).

No cerebelo de ratos, foi detectada baixa expressão de MMP-9 e alta de MMP-2, ao passo que nas células de Purkinje de ratos adultos foi observada abundância de MMP-2 de MMP-9 (Vaillant *et al.*, 1999). Análises mais detalhadas da expressão de RNAm no hipocampo demonstrou que a MMP-2 pode ser originada das células gliais, ao passo que a MMP-9 foi expressa particularmente nos neurônios (Szklarczyk *et al.*, 2002).

A participação das MMPs tem sido verificada em diferentes patologias, principalmente as que envolvem lesão nervosa, como Alzheimer, esclerose múltipla

e dor neuropática (Yong *et al.*, 1998). Aliás, o bloqueio de amplo espectro de MMPs ou até mesmo tratamento com inibidor das gelatinases oferecem neuroproteção e recuperação neurológica (Noble *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2008). Em modelo animal de esclerose múltipla, a MMP-1, -2, -3 e -9 estão colocalizadas em astrócitos, microglia e macrófagos cerebrais (Leppert *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 1998). Em lesões cerebrais ou na medula espinal (dor neuropática), as gelatinases degradam componentes da lâmina basal, desencadeando o rompimento da barreira hematoencefálica, desmielinização e resposta neuroinflamatória progressiva (Shigemori *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008). A desmielinização do axônio acarreta aumento na expressão de canais de sódio e a hiperexcitabilidade dos neurônios aferentes, resultado em sensibilização central (Zhang *et al.*, 2011). Além do que, ocorre migração celular para o sistema nervoso central e, obviamente, liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, TNF- α e IL-1 β , que também podem ser ativados pelas gelatinases. Todos esses eventos contribuem de maneira expressiva para a facilitação da dor (Zhang *et al.*, 2011).

Até onde se sabe, não há na literatura ensaios clínicos satisfatórios envolvendo inibidores de MMPs no tratamento de patologias dolorosas. Ainda assim, a inibição das gelatinases continua sendo um importante alvo farmacológico para o tratamento da dor neuropática (Zhang *et al.*, 2011; Dev *et al.*, 2010). Sabendo que as gelatinases possuem a sequência de ligação do AP-1, a inibição desse fator de transcrição e, conseqüentemente, a inibição de suas vias a jusante (*downstream*), inclusive a das gelatinases, seria um relevante alvo terapêutico para o tratamento da dor neuropática.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A dor neuropática é uma patologia que atinge cerca de um terço da população mundial, entretanto, são escassas as opções de terapia medicamentosa para esse tipo de dor e, muitas vezes, ineficazes. Então, estudos são necessários para melhorar o entendimento da fisiopatologia dessa doença. Embora existam na literatura inúmeros relatos acerca da participação de diversos fatores de transcrição na dor/hipernocicepção, o papel da proteína ativadora-1 (AP-1) na dor neuropática permanece não elucidado. Por isso, é de extrema importância avaliar o possível papel desse fator de transcrição na gênese/manutenção da dor neuropática. Assim, possíveis novos tratamentos poderão surgir, melhorando a qualidade de vida e sobrevivência dos que sofrem com a dor neuropática.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é que a indução e ativação do fator de transcrição AP-1 tenha um papel importante na gênese e manutenção da dor neuropática experimental, através da ativação de células gliais e de proteinocinases ativadas por mitógenos e indução da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios na medula espinal de camundongos.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar o papel do fator de transcrição AP-1 na gênese e manutenção da dor neuropática experimental.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Verificar a interferência da inibição do AP-1 na hipernocicepção mecânica neuropática para esclarecer o papel do AP-1 na dor neuropática experimental;

4.2.2 Avaliar a participação do AP-1 na ativação de células gliais (microglia e astrócitos) na dor neuropática experimental;

4.2.3 Verificar a importância do AP-1 na expressão proteinocinases ativadas por mitógenos na dor neuropática experimental;

4.2.4 Avaliar a participação do AP-1 na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios na dor neuropática experimental;

4.2.5 Verificar a participação do AP-1 na expressão das metaloproteinases da matriz extracelular 2 e 9 na dor neuropática experimental;

Material e métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Soluções

5.1.1 Imunofluorescência

- Solução de tampão salino-fosfato (PBS)

NaCl	8,0 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,2 g
Fosfato de Sódio dibásico (Na_2HPO_4)	1,15 g
Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,2 g
Água milli-Q q.s.p.	1 L

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH ou HCl e a solução final autoclavada e estocada em garrafas estéreis a 4°C antes de ser utilizada.

- Solução de glicina

Glicina 0,1 M	0,75 g
PBS	100 mL

- Solução de bloqueio

BSA 2%	0,4 g
Triton X-100	40 μL
PBS q.s.p.	20 mL

- Solução de diluição do anticorpo primário

Solução de bloqueio	1 parte
PBS	1 parte

- Solução de diluição do anticorpo secundário

BSA 1% 1 g
PBS q.s.p. 10 mL

5.1.2 Western blotting

- Tampão RIPA® com inibidores

Tris-HCl 50 mM
NaCl 0,15 M
EDTA 1 mM
Ajustar pH 7,4.

Detergentes:

Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%
Triton X-100 1%
Desoxiglicolato de sódio 0,5%

Inibidores de proteases:

PMSF 1 mM
Aprotinina 5 µg.mL⁻¹
Leupeptina 1 µg.mL⁻¹
Pepstatin 1 mg.mL⁻¹

Inibidores de fosfatases:

Ortovanadato de sódio 10,28 mM
Fluoreto de sódio 100 mM

- Solução Dodecil Sulfato de Sódio 10% (SDS)

SDS 10 g
Água milli-Q 100 mL

- Tampão de amostra 2X

Tris-HCL 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10%	1,6 mL
2-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul de bromofenol 1%	0,4 mL
Água milli-Q	3,8 mL

Após preparo, as alíquotas foram acondicionadas a -20 °C.

- Tampão de eletroforese 10%

Tris 25 mM	30 g
Glicina 250 mM pH 8,3	144,2 g
SDS 1%	100 mL
Água destilada	1 L

- Solução Bis/Acrilamida

Acrilamida	29 g
N' Bis-Metileno	1 g
Água milli-Q	100 mL

- Solução Tris-HCl 1,0 M

Tris base	12,11 g
Água milli-Q	100 mL

O pH foi ajustado para 6,8 e posteriormente armazenado em vidro âmbar à temperatura de 4 °C.

- Tampão de eletrotransferência

Tris-HCl 25 mM	
Glicina 192 mM	
Metanol 20%	
Água milli-Q q.s.p.	100 mL

O pH foi ajustado para 8,3.

- Solução Tampão Salino Fosfato 10% com Tween[®] 20 (TBS-T)

Tris 60,5 g

NaCl 87,87 g

Água milli-Q q.s.p. 1L

O pH foi ajustado para 8,0. No momento da utilização, foi realizada diluição 1:10 em água milli-Q e adicionado 0,5% de tween[®] 20.

5.1.3 ELISA

- Solução de tampão fosfato-salino (PBS)

Idem ao descrito na técnica de Imunofluorescência.

- Solução de ligação pH 9,0

Fosfato de sódio (Na₂PO₄) 0,1 M

- Tampão substrato pH 5,0

Ácido cítrico 34,7 mM

Fosfato de sódio (Na₂PO₄) 66,7 mM

- Substrato

Ortofenil-diaminobenzidina (OPD) 0,4 mg

Água oxigenada (H₂O₂) 0,4 µL

Tampão substrato q.s.p. 1 mL

5.1.4 Dosagem de nitrito/nitrato (Griess)

- Coquetel

NADPH 5% em água 500 µL

Tampão de hidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,5 M pH 7,5 1000 µL

Nitrato redutase 10U/500 µl 50 µL

- Ácido fosfórico (H_3PO_4) a 5%

Ácido fosfórico (H_3PO_4) 2,5 mL

Água deionizada 47,5 mL

- Solução A

Sulfanilamida 0,5 g

Ácido fosfórico (H_3PO_4) 25 mL

- Solução B

Alfa-naftiletenodiano (NEED) 0,05 g

Água deionizada 25 mL

- Reagente de Griess

Solução A 50 μL

Solução B 50 μL

Ácido fosfórico (H_3PO_4) 50 μL

Água deionizada 50 μL

5.1.5 Zimografia em gel

- Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%

Acrilamida 30 g

Bisacrilamida 0,8 g

Água milli-Q q.s.p. 100 mL

Armazenamento a 4 °C.

- Solução 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8

Trizma Base 91 g

Água milli-Q q.s.p. 500 mL

O pH foi ajustado para 8,8 e solução foi filtrada em papel de filtro. Foram adicionados 2 g de SDS (0,4%). Armazenamento a 4 °C.

- Solução 4X tris-HCl/SDS pH 6,8

Trizma Base 6,05 g

Água milli-Q q.s.p. 100 mL

O pH foi ajustado para 6,8 e solução foi filtrada em papel de filtro. Foi adicionado 0,66 g de SDS. Armazenamento a 4 °C.

- Solução Tris-HCl 1 M pH 7,4

Trizma Base 121 g

Água milli-Q q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 7,4. Armazenamento a 4 °C em frasco âmbar.

- Solução de persulfato de amônio (APS) 10%

APS 1 g

Água milli-Q q.s.p. 10 mL

As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

- Gelatina 40 mg/mL

Gelatina 1 g

Água milli-Q aquecida em banho-maria q.s.p. 25 mL

Armazenamento a -20 °C.

- Solução de corrida 5X

Trizma base 1,51 g

Glicina 72 g

SDS 5 g

Água milli-Q q.s.p. 1000 mL

A solução deve ser diluída para 1X para sua utilização. Armazenamento a 4 °C.

- Solução renaturante Triton X-100 2%

Triton X-100 10 mL

Água milli-Q aquecida em banho-maria q.s.p. 500 mL

- Solução Tris-HCl 50 mM cloreto de cálcio (CaCl_2) 10 mM pH 7,4

Solução tris-HCl 1 M pH 7,4.....	50 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,2 g
SDS	5 g
Água milli-Q q.s.p.	1000 mL
Armazenamento a 4 °C em frasco âmbar.	

- Solução Corante 10X

Metanol 30%.....	300 mL
Ácido acético 10%	100 mL
Comassie Blue G-250	5 g
Água milli-Q q.s.p.	1000 mL
Armazenamento em temperatura ambiente em frasco âmbar. Houve reutilização após filtração.	

- Solução Descorante

Metanol 30%	300 mL
Ácido acético 10%	100 mL
Água milli-Q q.s.p.	1000 mL

- Tampão de amostra não redutor 2X

Solução 4X tris-HCl/SDS pH 6,8	25 mL
Glicerol.....	20mL
SDS	4 g
Azul de bromofenol.....	1 mg
Água milli-Q q.s.p.	100 mL
Armazenamento das alíquotas a -70 °C.	

- Tampão de diluição

Solução Tris-HCl 1 M pH 7,4.....	2,5 mL
NaCl	0,45 g
Água milli-Q q.s.p.	50 mL

- Padrão de zimografia em gel

Soro bovino fetal 16 μ L

Tampão de diluição 184 μ L

Tampão de amostra não redutor 2X..... 200 μ L

Armazenamento de alíquotas a -20 °C.

5.2 Droga e diluentes

A droga utilizada neste estudo é denominada ácido (*E,E,Z,E*)-3-Metil-7-(4-metilfenil)-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,4,6,8-nonatetraenoico (Ilustração 3), de sigla SR11302, um análogo sintético do ácido retinoico. O ácido retinoico aumenta a ativação transcricional através de receptores de ácido retinoico (RAR) e receptor X retinoide (RXR). A SR11302 inibe a atividade do fator de transcrição AP-1 em aproximadamente em 80% sobre a ativação do AP-1 induzida por éster de forbol (TPA), através dos receptores RAR α e RAR γ , mas não dos RAR β ou RXR α (Fanjul *et al.*, 1994).

Ao contrário de outros análogos sintéticos do ácido retinoico, a SR11302 não reduziu a proliferação nem a diferenciação de células F9, sugerindo que essa droga não possui efeito anticâncer. Isso se deve, pelo menos em parte, à não ativação dos elementos responsivos ao ácido retinoico (RAREs) por essa droga (Huang *et al.*, 1997;Fanjul *et al.*, 1994). Por isso, a SR11302 foi a que melhor se adequou ao presente estudo, no qual se desejava apenas a inibição da atividade do AP-1.

Ilustração 3: Fórmula química do inibidor de AP-1 SR11302. Adaptado de Fanjul A. *et al.*, 1994 (Fanjul *et al.*, 1994).

O inibidor de AP-1, SR11302, ou o seu diluente foi administrado por via intratecal (i.t.), com diferentes protocolos temporais (Tabela 2). Essa droga foi administrada também em animais *naïve* e não foram observadas alterações no limiar basal dos mesmos (dados não mostrados).

Tabela 2: Protocolos de tratamento com SR11302

Droga / Origem	Protocolo de tratamento	Dose / Via de administração	Veículo para ressuspensão / diluição
SR11302 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA)	Pré-tratamento com múltiplas injeções (antes da SNI, 1, 2, 3, e 4 dias após SNI); pós-tratamento com múltiplas injeções (4, 5, 6 e 7 dias após SNI ou 7, 8, 9 e 10 dias após SNI) ou com injeção única 7 dias após SNI	3, 10, 30, 60 ou 100 µg (i.t.)	Ressuspensão em DMSO e tween® 80 (1:1). Diluição em NaCl 0,9%

SNI, *Spinal Nerve Injury*; i.t., intratecal; DMSO, dimetilsulfóxido; NaCl, cloreto de sódio.

5.3 Via de administração da droga

A via de administração do inibidor de AP-1, SR11302, foi a intratecal, conforme descrito anteriormente (Papir-Kricheli *et al.*, 1987). Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório 2% e tricotomizados na região lombar. Posteriormente, o animal foi alocado sobre um dispositivo cilíndrico em decúbito ventral, com a coluna vertebral hiperfletida, expondo os interespaços lombares L4 e L5. Em seguida, uma agulha hipodérmica nº 26 foi inserida no espaço subaracnóideo medular, perfurando a região medial entre as vértebras L4 e L5 (± 1) num ângulo de 45°. O volume injetado foi de aproximadamente 5 µL por animal. Os animais recuperaram os movimentos imediatamente após o término da anestesia.

5.4 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (20 – 30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo Campus de Ribeirão Preto (USP-RP), os quais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por pelo menos 2 dias anteriores aos experimentos. Nesse local, os animais ficaram sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Eles foram alocados no local de experimentação com pelo menos 1 hora de antecedência para ambientação. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 8 e 17 horas. O número de animais utilizados em cada experimento variou de 5 a 8 animais por grupo, especificado na legenda de cada resultado.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 070/2011, Anexo A) e com as diretrizes para uso de animais experimentais em estudos de dor da IASP (Zimmermann, 1983).

5.5 Modelo experimental de dor neuropática

O modelo experimental de dor neuropática utilizado neste estudo foi primariamente descrito em ratos (Decosterd & Woolf, 2000) e anos depois em camundongos (Shields *et al.*, 2003). Além de ser um modelo experimental de fácil execução, mimetiza os sinais da dor neuropática encontrados na clínica, por exemplo, alodinia mecânica, hipernocicepção mecânica, hipernocicepção térmica e alodinia ao frio, mas não são verificadas mudanças no limiar térmico ao calor (Woolf & Mannion, 1999; Erichsen & Blackburn-Munro, 2002; Al-Amin *et al.*, 2010; Bourquin *et al.*, 2006). Por isso, avaliações térmicas (calor) não foram contempladas neste

trabalho, visto que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (dados não mostrados).

Após anestesia inalatória (isoflurano 2%), a pele da superfície lateral da coxa traseira dos animais passou por antissepsia e em seguida foi incisionada, e o músculo femoral divulsionado, expondo as três ramificações do nervo ciático (peroneal comum, tibial e sural, Ilustração 4). Esse modelo consiste na amarração (fio de sutura 5-0) e imediata transecção das ramificações peroneal comum e tibial do nervo ciático, sendo removida uma porção de aproximadamente 1,5 mm.

A ramificação sural do nervo ciático permanece intacta, preservada, por isso esse modelo é denominado *Spared Nerve Injury* (SNI). Após, o músculo e a pele foram suturados com fio de sutura adequado. A técnica cirúrgica desse modelo experimental foi elegantemente demonstrada em camundongos, passo a passo em vídeo, por Richner e colaboradores (Richner *et al.*, 2011).

O grupo experimental controle foi composto por animais que foram falsamente operados (Sham), ou seja, foi realizada incisão na pele e divulsionamento do músculo femoral e exposição do nervo ciático de modo similar ao grupo SNI, porém sem qualquer manipulação desse nervo. A seguir, o músculo e a pele foram suturados. Possíveis danos no nervo sural podem ser facilmente identificados por paralisia e/ou rastejamento da pata operada (Richner *et al.*, 2011).

Ilustração 4: Esquema do modelo experimental de dor neuropática *Spinal Nerve Injury* - SNI. A figura demonstra as ramificações eferentes na medula espinal dos segmentos lombares L4, L5 e L6 formando o nervo ciático, o qual se ramifica, inicialmente, nos nervos tibial, peroneal comum e sural. Os dois primeiros são amarrados e cortados e o último, preservado. Adaptado de Calvo e Bennett, 2012 (Calvo & Bennett, 2012).

5.6 Avaliação nociceptiva mecânica

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi avaliado de acordo com o método *up-and-down*, conforme descrito anteriormente (Chaplan *et al.*, 1994), utilizando os filamentos de von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA). Os camundongos foram acondicionados em caixas de acrílico com a face dianteira transparente sobre uma tela de arame, proporcionando acesso à pata desses animais. Após a climatização dos animais (aproximadamente 1 h), os filamentos de von Frey foram aplicados perpendicularmente, sobre a região plantar lateral externa da pata traseira dos animais, por um período aproximado de 4 segundos ou até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por retirada da pata,

seguida de lambida da mesma e/ou “*flinch*”. Essa região da pata do animal é inervada pelo ramo sural do nervo ciático, o qual não sofre qualquer tipo de manipulação neste modelo experimental. Assim, é uma região crítica no desenvolvimento da neuropatia, e, por isso, é a região avaliada pelos filamentos (Richner *et al.*, 2011).

A avaliação dos camundongos foi sempre iniciada com o filamento de 0,4 g. Nesse método, pelo menos 6 avaliações, com intervalos de 10 segundos, foram feitas, por animal. A ausência de resposta do animal a um determinado filamento levou à utilização de outro filamento de maior massa, até que ocorra resposta de retirada. Havendo retirada, um filamento de menor massa foi aplicado, por isso denominado método de *up and down*.

Esse método de avaliação determina 50% do limiar de retirada da pata (Limiar 50%), calculado de acordo com Dixon (Dixon, 1991) pela seguinte equação:

$$\text{Limiar 50\%} = 10^{[\log \text{ do último filamento} \pm (\text{valor da tabela (Dixon, 1991)} \times 0,4)]}$$

5.7 Coleta da medula espinal e dosagem de proteína total

De acordo com os experimentos comportamentais realizados no presente estudo, foi obtida uma padronização, tal qual postulou a condição temporal de retirada da medula espinal, descrita a seguir.

Sete dias após a SNI, os animais receberam injeção única do inibidor de AP-1 (SR11302), do seu veículo ou nenhuma injeção. Três horas após essa injeção, os animais foram decapitados e colocados em uma mesa cirúrgica própria, tricotomizados na região dorso-lombar, seguido de antissepsia dessa região com álcool 70%. Posteriormente, foi feita incisão póstero-mediana seguida de abertura por planos até a lâmina óssea, realizando a laminectomia, para expor e retirar a porção lombar da medula espinal (L4–L5).

As medulas foram retiradas e estocadas a -70 °C em 1000 µL de reagente Trizol[®] (Ambion – Invitrogen Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, EUA), para realização de RT-PCR; em 300 µL de tampão RIPA[®] com inibidores de proteases e

fosfatases, para as técnicas de *western blotting* e zimografia em gel; ou em 250 µL em tampão fosfato (PBS), para realização de ELISA e Dosagem indireta de óxido nítrico.

Todas as amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador (IKAT10 basic ultra-turrax – IKA, Kengeri, Bangalore, Karnataka Índia). Posteriormente, as concentrações de proteínas das amostras para zimografia em gel e *western blotting* foram determinadas pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford *Protein Assay Kit*, PierceTM, Rockford, IL, EUA), via espectrofotômetro (Spectra MAX 250®- Molecular Devices, Silicon Valley, CA, EUA) a um comprimento de onda de 595 nm.

5.8 Imunofluorescência

Depois de submetidos à anestesia inalatória (isoflurano 2%), os animais (mesma condição temporal de coleta da medula espinal descrita no tópico anterior) foram perfundidos com a solução NaCl 0,9% seguida da solução de paraformaldeído 4% (PFA) tamponado com tampão fosfato 0,1 M. Após, foi realizada a extração da medula espinal na porção lombar (L4 – L5), a qual foi pós-fixada em solução de PFA 4%, a 4° C, por aproximadamente 2 horas. Posteriormente, retirou-se a solução de PFA e foi adicionada solução de sacarose 10 e 20%, mantendo-se, por aproximadamente, 12 horas em cada uma. Em seguida, os tecidos foram congelados em composto próprio para cortes histológicos contendo uma mistura de álcool polivinílico e polietilenoglicol diluído em PBS (OCT – *Tissue-Tek*®; Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Holanda). As peças congeladas contendo a medula espinal foram cortadas em criostato (LEICA CM1850, Alemanha) com espessura de 14 µm. Os cortes histológicos apresentaram homogeneidade entre eles.

O ensaio de imunofluorescência foi antecedido pela submissão das lâminas à estufa a vácuo por 1 hora, proporcionando uma melhor adesão dos cortes às lâminas. Os cortes histológicos fixados foram então lavados 3 vezes com PBS e submersos em solução de glicina por no mínimo 1 hora, para a completa retirada de

compostos aldeídicos. Posteriormente, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas, pela incubação com solução de bloqueio por 1 hora. Em seguida, os cortes foram incubados com solução contendo o anticorpo primário de interesse (Tabela 3) a 4 °C e após, lavados 5 vezes com PBS, por 5 min cada lavagem.

Então, os cortes foram incubados com solução contendo o anticorpo secundário (Tabela 3) por 2 horas à temperatura ambiente, com posterior lavagem (5 vezes com PBS, 5 min), para retirar o excesso de anticorpo. Em seguida, foi adicionado aos cortes Hoechst 33342, corante fluorescente azul de núcleo e, após, os cortes foram novamente lavados.

Finalmente, as lâminas foram montadas em solução de fluormount™ (Southern Biotech, Birmingham, West Midlands, RU) e adicionadas as lamínulas, sendo estocadas a 2-8 °C até a análise microscópica. As imagens foram obtidas através de microscopia confocal (Leica TCS-SP 5 AOBS, Leica, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 40X, com mesma intensidade de laser para todos os grupos. Para a quantificação da intensidade de fluorescência, utilizou-se o programa LAS AF versão 2.6.0 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Para isso, foi escolhida, aleatoriamente, uma área delimitada no corno dorsal da medula espinal idêntica para os grupos experimentais. Nessa área, primeiramente, foi quantificada a intensidade de fluorescência dos núcleos, marcados com Hoechst. Após, foi quantificada, nessa mesma área, a intensidade de fluorescência do c-Jun fosforilado co-localizado com o núcleo. Assim, obteve-se a intensidade de fluorescência do c-Jun ativado/fosforilado nuclear dos grupos estudados e o resultado foi demonstrado como c-Jun fosforilado nuclear (unidades de fluorescência).

Tabela 3: Anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Concentração utilizada	Tempo de exposição
Anti-p-c-Jun	Cell signaling	1:100	<i>Overnight</i>
Anti-Iba1/Alf-1	Millipore	1:300	<i>Overnight</i>
Anti-GFAP Alexa fluor® 488	eBioscience	1:100	<i>Overnight</i>
Alexa fluor® 488 donkey anti-mouse	Molecular Probes	1:100	2 h
Alexa fluor® 594 goat anti-rabbit	Invitrogen	1:400	2 h
Hoechst 33342	Sigma	1:1000	5 min

Iba1, molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; h, horas; min, minutos.

5.9 Avaliação da expressão gênica

5.9.1 Processamento das amostras e extração do RNA mensageiro

Os materiais plásticos e soluções utilizados em todo o procedimento descrito a seguir estavam livres de RNase. Para a extração do RNA total, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) para cada 750 µL de suspensão (tecido e Trizol®). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C e a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo, o qual já continha 500 µL de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) gelado. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados por 15 min a -20 °C, para precipitação do RNA disperso na fase aquosa. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, ficando aderido aos tubos o precipitado de RNA. A esse precipitado foram adicionados 1000 µL de álcool 75% (preparado com água livre de

DNA e RNA) e agitados no vórtex. As amostras foram então centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNAm foi ressuspensionado com 10 µL de água. A concentração de RNAm foi determinada através da densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm, através de aparelho específico (nanoVue plus GE® - GE Life sciences, Little Chalfont, Reino Unido).

5.9.2 Síntese de DNA complementar e Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real

O RNA mensageiro (RNAm) foi transcrito para DNA complementar (DNAc) utilizando 2 µg de amostra de RNAm, 1 µL de Oligo DT (0,5 µg/µL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e água q.s.p. 7 µL. A solução resultante dessa reação foi levada ao termociclador (Eppendorf mastercycler®, Hamburg, Alemanha), no qual foi submetida a ciclos de 70 °C por 5 min e 5 °C durante 1 min. A reação foi interrompida para adição de uma mistura de reagentes (1 µL de DNTP 10 mM, 4 µL de Buffer 5X, 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL transcriptase reversa (Pre-Improm II - Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e água q.s.p. para 13 µL). Após, a reação foi seguida com ciclos de 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 15 min.

A reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real foi executada com volume final de 6,25 µL para cada tubo, contendo 3,125 µL de SYBR-green® (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 µL de primer da sequência sense (Tabela 4, Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 µL de primer da sequência antisense (Tabela 4, Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,0125 µL de Rox® (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1,6125 µL de água e 1 µL de amostra de DNAc. A placa (MicroAmp® EnduraPlate™ Optical 96-well Fast Clear Reaction plate with Barcode, life technologies™, Carlsbad, CA, EUA) na qual esses reagentes e amostras foram inseridos foi acondicionada em aparelho adequado (ViiA™ 7 Real-Time PCR System - life technologies™, Carlsbad, CA, EUA) e mantida a 95 °C por 10 min e mais 40 ciclos de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min) e 72 °C (2 min). A curva de dissociação foi analisada a 65-95 °C, para verificar se

apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT). Os resultados foram demonstrados como expressão do gene em estudo em relação ao gene endógeno GAPDH.

Tabela 4: Sequência dos pares de *primers*

Primer	Sequência Sense	Sequência Antisense
GAPDH	5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'	5'-CGGCCAAATCCGTTTAC-3'
Iba1	5'-TGAGGAGCCATGAGCCAAAG-3'	5'-GCTTCAAGTTTGGACGGCAG-3'
p38	5'-AATGCGTCTGACGGGGACACC-3'	5'-GACAGCCAGGGGATTGGCACC-3'
TNF- α	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
IL-6	5'-TTCCCACCCCAATTTCCAAT-3'	5'-CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3'
IL-1 β	5'-CTCGCAGCAGCACATCAA C-3'	5'-TGTTTATCTCGGAGCCTGTAG-3'
IL-17A	5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'	5'-GGGTCTTCATTGCGGTGG-3'
MCP-1	5'-AGAAGGAATGGGTCCAGACA-3'	5'-TCATTTGGTTCCGATCCAG-3'
KC	5'-CTTCCCTTGGACATTTTGTGTC-3'	5'-TTTGAACGTCTCTGTCCCGAG-3'
MMP-9	5'-GCGTGTCTGGAGATTCGACTT-3'	5'-TATCCACGCGAATGACGCT-3'
MMP-2	5'-CGGAGATCTGCAAACAGGACA-3'	5'-CGCCAAATAAACCGGTCCTT-3'

GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; Iba1, molécula adaptadora ligante de cálcio inonizado-1; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucina; MCP-1, proteína quimiotatratente de monócitos-1; KC, quimiocina derivada de queratinócitos; MMP, metaloproteinase da matriz extracelular.

5.10 Western blotting

Após a dosagem de proteínas, foi retirado do sobrenadante das amostras volume correspondente a 10 μ g (para avaliação da expressão de GFAP), 30 μ g

(para JNK e ERK) ou 80 µg (para NOSi) de proteína misturados com volume correspondente do tampão de amostra e submetidas à desnaturação a 100 °C por 5 min.

Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 7% (NOSi) ou 12% (GFAP, JNK, ERK), de 1,0 mm de espessura, no sistema SDS-PAGE, conforme descrito anteriormente, para separação por eletroforese. A corrida foi realizada sob voltagem inicial de 80 volts no gel de largada e de 100 volts no gel de separação. Após a separação das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram incubados em tampão de eletrotransferência por 10 min. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, RU), utilizando-se um sistema de transferência semi-seco (Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% e ácido tricloroacético 3%, para certificação da transferência das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água milli-Q e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 1 h à temperatura ambiente e agitação leve em TBS-t contendo BSA 5% (p/v).

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-t por 5 min. Em seguida, foram incubadas sob refrigeração (4 °C) em solução TBS-t contendo BSA 5% (p/v) e o anticorpo primário de interesse (Tabela 5). Após, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min com TBS-t e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário de interesse (Tabela 5) à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS-t por 5 min.

A revelação das membranas foi feita com o auxílio de uma mistura de reagentes de um kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) e levadas ao aparelho de revelação (Molecular Image[®] ChemiDoc[™] XRS; Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), onde foi utilizado o filtro 0, por aproximadamente 5 min, com o auxílio do *software* ImageLab[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Para reutilização da membrana de nitrocelulose, a mesma sofreu o processo de *deblotting*, no qual a membrana é lavada com água milli-Q por 5 min e, após, é exposta à solução de *deblotting* (Restore[™] Western Blot Stripping Buffer, Thermo

Scientific, Rockford, IL, EUA) por 50 min em agitação moderada à temperatura ambiente. Após, a membrana é lavada com TBS-t por três vezes por 5 min. Os resultados foram demonstrados como expressão da proteína em questão relativa à expressão da β -actina, controle endógeno.

Tabela 5: Anticorpos primários e secundários utilizados no *western blotting*

Anticorpo	Fabricante	Concentração utilizada	Tempo de incubação
Anti-GFAP	BD	1:5000	<i>Overnight</i>
Anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell signaling	1:1000	<i>Overnight</i>
Anti-SAPK/JNK	Cell signaling	1:1000	<i>Overnight</i>
Anti-p-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell signaling	1:1000	<i>Overnight</i>
Anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell signaling	1:1000	<i>Overnight</i>
Anti-NOSi	Cell signaling	1:500	<i>Overnight</i>
Anti- β -actina	Abcam	1:5000	<i>Overnight</i>
Anti-mouse IgG	KPL	1:10000	1 h
Anti-rabbit IgG	KPL	1:5000	1 h

GFAP, proteína glial fibrilar ácida; SAPK, proteinoquinase ativada por estresse; JNK, quinase N-terminal c-Jun; Thr, treonina; Tyr, tirosina; MAPK, proteinoquinas ativadas por mitógenos; ERK, quinases regulada por sinal extracelular; NOSi, óxido nítrico sintase induzível; IgG, imunoglobulina; h horas.

5.11 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ensaio para determinação da concentração na medula espinal de TNF- α , IL-1 β e KC foi realizado conforme protocolo descrito previamente (Taktak *et al.*, 1991). Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μ l de tampão PBS contendo 2,0 μ g.mL⁻¹ do anticorpo policlonal biotinilado anti-TNF- α , anti-IL-1 β

ou anti-KC, os quais foram diluídos em solução de ligação pH 9,0 e incubados por 24 horas a 4 °C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20[®] (PBS-T; 200 µl.poço⁻¹), e em seguida foi incubada com 50 µl de solução de bloqueio (BSA 1%), para bloqueio das ligações inespecíficas, durante 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi lavada, conforme descrito acima, e em seguida foram adicionadas as amostras testes (triplicata), previamente colhidas do homogeneizado da medula espinal. Concentrações decrescentes das citocinas foram diluídas em PBS-T e utilizadas para a confecção de uma curva padrão. A placa foi coberta e mantida durante 12 horas a 4 °C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e, posteriormente, adicionados os anticorpos biotinilados anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-KC em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra (100 µL.poço⁻¹).

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida foram adicionados 50 µl de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-peroxidase (DAKO A/S Denmark, Glostrup, Dinamarca) diluída 1:5000 em PBS-T por 30 minutos. A placa foi lavada e incubada com 50 µl do substrato dihidrocloro 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão e adicionado 0,4 µl de H₂O₂ 30%/mL. Com o aparecimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 µl de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M. A medida da absorbância foi determinada a 490 nm em um espectrofotômetro (Spectra MAX 250[®] - Molecular Devices, Silicon Valley, CA, EUA). Os resultados foram expressos em pg.mg de tecido⁻¹ de TNF- α , IL-1 β e KC, em relação à curva padrão obtida.

5.12 Dosagem indireta de óxido nítrico (Reagente de Griess)

O volume de 50 µL do sobrenadante do homogenato da medula espinal em PBS foi incubado a 37 °C por 18 horas com 50 µL de coquetel contendo a enzima nitrato redutase. Essa reação permite a redução do nitrato presente no sobrenadante em nitrito, que pode ser dosado pela reação de Griess. Após a incubação, 80 µl do reagente de Griess foram adicionados. A absorbância do

produto foi registrada em espectrofotômetro (Spectra MAX 250[®] - Molecular Devices, Silicon Valley, CA, EUA), no comprimento de onda de 540 nm, e a concentração foi estimada de acordo com a curva padrão de nitrito. Os resultados são expressos em μMol de nitrato/nitrito por μg de tecido.

5.13 Zimografia em gel

A expressão das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) na medula espinal foi determinada pela técnica de zimografia em gel, conforme descrito previamente (Ceron *et al.*, 2012).

Posteriormente à dosagem de proteínas, do sobrenadante das amostras foi retirado volume correspondente a 20 (para avaliar a MMP-9) ou 100 μg (para a MMP-2) de proteína misturados em igual volume de tampão contendo SDS, a fim de carregar negativamente as proteínas das amostras para a corrida eletroforética, e essas amostras foram então submetidas à desnaturação proteica a 40 °C por 10 min.

Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (MMP-9) ou a 12% (MMP-2), ambos de 1,0 mm de espessura, contendo gelatina 0,5% (sistema SDS-PAGE - *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), utilizando o sistema Mini-Protean II Eletrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, EUA).

O padrão de zimografia (controle positivo das gelatinases, constituído de soro bovino fetal) foi utilizado na quantidade de 10 μL por poço do gel. A corrida foi realizada sob voltagem máxima e amperagem constante de 26 ampères por gel.

Após eletroforese, estes géis foram submetidos a banhos de Triton, para remover o SDS, e foram incubados em tampão Tris- CaCl_2 pH 7,4 por aproximadamente 20 horas (MMP-9) ou 24 horas (MMP-2) a 37 °C, objetivando a renaturação das proteínas e ativação enzimática, respectivamente. Os géis foram fixados e corados com solução de Coomassie Blue 0,05%, que cora todo o gel em azul devido sua afinidade por proteína (gelatina). Para visualização das bandas

referentes às MMPs, os géis foram descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%.

Observa-se a formação de bandas claras, devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pelas gelatinases, contra o fundo azul escuro do Coomassie. Os géis foram fotografados em aparelho adequado (Molecular Image[®] ChemiDoc[™] XRS, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), através do filtro 1 - *Coomassie Blue*, com o auxílio do *software* ImageLab[®] (Bio-Rad, Hercules CA, EUA).

A quantificação das bandas das MMPs se deu através do programa ImageJ (NIH – National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A MMP-2 foi identificada pela banda de 72 kDa e a MMP-9, pelas bandas de 84 e 92 kDa.

5.14 Análise estatística

Os experimentos foram realizados, pelo menos, duas vezes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O número amostral foi representado na legenda de cada figura. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) *two way*, quando houve interação entre os tratamentos e o tempo, seguido pelo *post-test* de Bonferroni. Por outro lado, quando os resultados foram de apenas um ponto (tempo), as análises foram realizadas usando ANOVA *one way*, seguido pelo *post-test* de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$. Para a realização das análises estatísticas supracitadas e confecção gráfica foi utilizado um programa estatístico específico computadorizado (GraphPad Prism Software, GraphPad Prism 5 Demo, EUA, 2007).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 A hipernocicepção mecânica induzida por SNI é dependente do AP-1

Primeiramente, foi estudada a participação do AP-1 na indução da hipernocicepção mecânica provocada pelo modelo experimental SNI. Os animais submetidos à SNI demonstraram claramente hipernocicepção mecânica por pelo menos 14 dias quando comparados aos animais falsamente operados (sham) (Figura 1). Por outro lado, o grupo SNI que recebeu tratamento imediatamente antes da SNI e nos dias 1, 2, 3 e 4 após a SNI (injeções indicadas pelas setas vermelhas, Figura 1) com a maior dose ($100 \mu\text{g.sítio}^{-1}$ por dia) do inibidor de AP-1 (SR11302), ao contrário das demais doses, teve a hipernocicepção mecânica reduzida por volta do 14º dia após a SNI (efeito tardio), quando comparado ao grupo SNI tratado com veículo (Figura 1).

Figura 1: Efeito do pré-tratamento com o inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR) ou falsamente operados (Sham) e, após, foram avaliados quanto à nocicepção mecânica, através dos filamentos de von Frey. Os animais receberam injeção intratecal imediatamente antes e 1, 2, 3 e 4 dias após a SNI, indicadas pelas setas vermelhas, de veículo (Sham ou SNI; 5 µl.sítio⁻¹ por dia) ou SR11302 (SNI + SR) nas doses de 3, 10, 30, 60 e 100 µg.sítio⁻¹ por dia. Os animais foram submetidos à análise da nocicepção mecânica imediatamente antes da SNI e 3, 5, 7, 10 e 14 dias após a SNI. Os resultados foram expressos pela média ± EPM de 8 animais por grupo. # $P < 0,01$ e § $P < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao valor correspondente do grupo dos animais SNI que receberam injeções de veículo (SNI).

Para verificar a importância do AP-1 na manutenção da dor neuropática experimental, foram feitos alguns protocolos de pós-tratamento com o inibidor de AP-1, SR11302. Primeiramente, foram feitas injeções intratecais únicas diárias dessa droga 4, 5, 6 e 7 dias após a SNI, indicadas pelas setas vermelhas, e avaliado o comportamento nociceptivo em diversos momentos (Figura 2). No 4º dia após a SNI, foram feitas avaliações 1, 3, 5 e 7 horas após a primeira injeção e os animais tratados com SR11302 não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais tratados com veículo (Figura 2). Todavia, após quatro injeções do inibidor de AP-1 (no sétimo dia após SNI), o grupo dos animais tratados com 30 µg.sítio⁻¹ (1 hora após a injeção) ou 100 µg.sítio⁻¹ (1 e 3 horas após injeção)

do inibidor de AP-1 apresentaram aumento no limiar mecânico quando comparado ao grupo dos animais SNI tratados com veículo (Figura 2).

Figura 2: Efeito do pós-tratamento com múltiplas injeções, iniciadas no 4º dia após SNI, do inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR) ou falsamente operados (Sham) e, após, avaliados quanto à nocicepção mecânica, através dos filamentos de von Frey. Os animais receberam injeção intratecal 4, 5, 6 e 7 dias após a SNI, indicadas pelas setas vermelhas, de veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{L.sítio}^{-1}$ por dia) ou SR11302 (SNI + SR) nas doses de 10, 30 e 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$ por dia. Os animais foram submetidos à análise da nocicepção mecânica imediatamente antes e 4 (0, 1, 3, 5 e 7 horas), 5, 6, 7 (0, 1, 3, 5 e 7 horas), 12, 14, 18 e 21 dias após a SNI. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 animais por grupo. # $P < 0,01$ e § $P < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao valor correspondente do grupo dos animais SNI que receberam injeções de veículo (SNI).

De acordo com a Figura 2, as injeções do inibidor de AP-1, SR11302, reduziram a hipernocicepção apenas no sétimo dia após a SNI. Por isso, o próximo protocolo de tratamento utilizou 4 injeções de SR11302, uma por dia, a partir do sétimo dia após SNI (Figura 3) e foi verificado que o grupo dos animais SNI que receberam injeções de doses maiores de SR11302 (30 ou 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$), mas não a dose de 10 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$, tiveram a hipernocicepção neuropática mecânica atenuada,

principalmente 3 e 5 horas após injeção, quando comparado ao grupo SNI tratado com veículo (Figura 3). Quando o tratamento com SR11302 é interrompido, os animais neuropáticos que receberam essa droga voltam a apresentar hipernocicepção neuropática, no dia seguinte à última injeção, semelhante aos animais SNI tratados com veículo (Figura 3).

Figura 3: Efeito do pós-tratamento com múltiplas injeções, iniciadas no 7º dia após SNI, do inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR) ou falsamente operados (Sham) e, após, avaliados quanto à nocicepção mecânica, através de filamentos de von Frey. Os animais receberam injeção intratecal 7, 8, 9 e 10 dias após a SNI, indicadas pelas setas vermelhas, de veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{L.sítio}^{-1}$ por dia) ou SR11302 (SNI + SR) nas doses de 10, 30 e 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$ por dia. Os animais foram submetidos à análise da nocicepção mecânica imediatamente antes da SNI e 7 (0, 1, 3, 5 e 7 horas), 8 (0, 1, 3, 5 e 7 horas), 9 (0, 1, 3 e 5 horas), 10 (0, 1, 3 e 5 horas), 11, 14 e 21 dias após a SNI. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, # $P < 0,01$ e § $P < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao valor correspondente do grupo dos animais SNI que receberam injeções de veículo (SNI).

Com o intuito de reduzir o número de injeções, foi realizada uma única injeção intratecal do inibidor de AP-1, SR11302, apenas no sétimo dia. O grupo dos animais

SNI tratados com o inibidor de AP-1 tiveram seu limiar nociceptivo mecânico aumentado entre 3 e 5 horas após injeção, aproximadamente, quando comparado ao grupo dos animais SNI tratados com veículo (Figura 4). Entretanto, essa antinocicepção desencadeada pela SR11302 se torna imperceptível dias após a injeção (Figura 4).

Figura 4: Efeito de injeção única de inibidor de AP-1 na nocicepção mecânica dos animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR) ou falsamente operados (Sham) e avaliados quanto à nocicepção mecânica, através de filamentos de von Frey. Os animais receberam injeção intratecal única 7 dias após a SNI, indicada pela seta vermelha, de veículo (Sham ou SNI; 5 μ l.sítio⁻¹) ou SR11302 (SNI + SR; 100 μ g.sítio⁻¹). Todos os animais foram submetidos à análise da nocicepção mecânica imediatamente antes da SNI e 5, 7 (0, 1, 3, 5 e 7 horas), 8, 12 e 14 dias após a SNI. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$ e § $P < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao valor correspondente do grupo dos animais SNI que receberam injeções de veículo (SNI).

De acordo com o resultado mostrado na Figura 4, a antinocicepção acarretada pelo inibidor de AP-1 (SR11302) foi mais acentuada três horas após a injeção intratecal dessa droga nos animais há 7 dias submetidos à SNI. Por isso,

para as análises moleculares adiante, foi padronizada a condição temporal de retirada da medula espinal sete dias após a SNI, três horas após a injeção única do inibidor de AP-1 (SR11302), do seu veículo ou nenhuma injeção (*Naïve*).

6.2 Inibição da ativação do c-jun nuclear na medula espinal pela SR11302

A análise por microscopia confocal demonstrou que houve ativação da microglia (Iba1; Figura 5) e dos astrócitos (GFAP; Figura 6) na medula espinal dos animais avaliados. Entretanto, não foi possível diferenciar visualmente essa ativação entre os grupos. A marcação de núcleos celulares (Hoechst, Figura 5 e Figura 6) também foi indiferente entre os grupos estudados. Por outro lado, grupo de animais submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI) possui maior ativação/fosforilação de c-Jun quando comparado ao grupo falsamente operado (c-Jun-f; Figura 5, Figura 6 e Figura 7). Esse aumento não é verificado no grupo dos animais SNI que foram tratados com o inibidor de AP-1 (c-Jun-f; Figura 5, Figura 6 e Figura 7) quando comparado com o grupo dos animais SNI tratados com veículo.

O número de núcleos e a fluorescência total emitida pelo marcador de núcleo Hoechst 33342 não diferiram entre os grupos (dado não mostrado), indicando que a área selecionada para quantificação do c-Jun fosforilado nuclear apresenta uniformidade na quantidade de células. Os animais SNI apresentaram um aumento quanto à localização nuclear do c-Jun ativado/fosforilado na medula espinal quando comparado ao grupo falsamente operado (Figura 7). Por outro lado, os animais SNI que foram tratados com o inibidor de AP-1 apresentaram redução do c-Jun ativado/fosforilado nuclear (Figura 7). Entretanto, as células as quais houve a marcação nuclear do c-Jun fosforilado não foram a microglia (Colocalização; Figura 5) nem os astrócitos (Colocalização; Figura 6).

Figura 5: Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun e da microglia. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para imunofluorescência (imagem confocal). As imagens demonstram imunoreatividade para microglia, através do anticorpo anti-Iba1 (verde, coluna da esquerda); para núcleo, através do Hoechst (azul, coluna do meio à esquerda); para c-Jun fosforilado (c-Jun-f), através do anticorpo anti-p-c-jun (vermelho, coluna do meio à direita) e colocalização dessas três marcações (coluna à direita). As setas indicam marcação dupla (lilás). Barras de escala de 50 μm .

Figura 6: Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun e dos astrócitos. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; $100 \mu\text{g}.\text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; $5 \mu\text{l}.\text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para imunofluorescência (imagem confocal). As imagens demonstram imunoreatividade para astrócitos, através do anticorpo anti-GFAP (verde, coluna da esquerda); para núcleo, através do Hoechst (azul, coluna do meio à esquerda); para c-Jun fosforilado (c-Jun-f), através do anticorpo anti-p-c-jun (vermelho, coluna do meio à direita) e colocalização dessas três marcações (coluna à direita). As setas indicam marcação dupla (lilás). Barras de escala de 50 μm .

Figura 7: Efeito do inibidor de AP-1 na ativação de c-Jun nuclear. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l.sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para imunofluorescência (imagem confocal). A intensidade de fluorescência do c-Jun fosforilado nuclear foi mensurada considerando a colocalização com a marcação nuclear (Hoechst 33342). "a", "b" e "c" ($P<0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

6.3 Ativação de células gliais na medula espinal provocada pela SNI é dependente do AP-1

Além de colaborarem para homeostase do sistema nervoso e protegerem a barreira hematoencefálica, as células da glia estão intensamente ativadas durante

processos dolorosos, nos quais atuam liberando diversos mediadores inflamatórios, bem como ativando cinases (Hald *et al.*, 2009).

O grupo dos animais submetidos à SNI apresentaram aumento na expressão na medula espinal do RNAm do Iba1, marcador de ativação microglial em relação ao grupo dos animais falsamente operados (sham) (Figura 8). Todavia, o grupo dos animais SNI tratados com inibidor de AP-1, esse aumento é bloqueado em relação aos animais SNI tratados com veículo (Figura 8).

Ainda, a expressão do GFAP, marcador de ativação astrocitária, encontra-se aumentada na medula espinal do grupo dos animais submetidos à SNI quando comparado à expressão do grupo dos animais falsamente operados (sham) (Figura 9). Esse aumento é bloqueado quando os animais SNI são tratados com o inibidor de AP-1 em relação aos animais SNI tratados com veículo (Figura 9).

Figura 8: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm de Iba1 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de Iba1 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a" e "b" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham e SNI, respectivamente.

Figura 9: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão do GFAP na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de proteína de GFAP por *western blotting*. (A) Imagem representativa da expressão de GFAP. (B) A expressão da proteína GFAP foi dada em relação à expressão da β -actina. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

6.4 Ativação de proteinocinases ativadas por mitógenos provocada pela SNI é dependente do AP-1

As proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK) têm sido apontadas como essenciais em muitos processos patológicos. Em processos dolorosos/neuropáticos há participação das três MAPKs (JNK, ERK e p38), por diferentes vias. Além de serem ativadas por mediadores pró-inflamatórios, as MAPKs induzem a liberação desses mediadores (Eferl & Wagner, 2003).

O grupo de animais submetidos à SNI apresentou um aumento na expressão da forma fosforilada de JNK (Figura 10A, imagem representativa; Figura 10B, gráfico) na medula espinal em relação aos animais falsamente operados (sham). Quando se avaliou a JNK total, não houve diferença entre os grupos estudados (Figura 10A, imagem representativa; Figura 10C, gráfico). O grupo dos animais submetidos à SNI e tratados com o inibidor de AP-1 tiveram a expressão da JNK na forma fosforilada, mas não da total, reduzida em relação aos animais SNI tratados com veículo (Figura 10A, imagem representativa; Figura 10B, gráfico).

Figura 10: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de JNK na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão da proteína JNK por *western blotting*. (A) Figura representativa da expressão de JNK fosforilada (JNKf), JNK total e β -actina. A expressão da forma fosforilada (B) e total (C) da JNK foi dada em relação à expressão da β -actina. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

Adicionalmente, o modelo experimental SNI desencadeou um aumento na expressão na medula espinal da forma fosforilada de ERK1 (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11B, gráfico) e ERK2 (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11D, gráfico) em relação aos animais falsamente operados (sham). A avaliação da ERK1 total (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11C, gráfico) e ERK2 total (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11E, gráfico) apontou que não há diferença entre os grupos estudados.

O grupo dos animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 tiveram a expressão da forma fosforilada de ERK1 (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11B, gráfico) e ERK2 reduzida (Figura 11A, imagem representativa; Figura 11D, gráfico) quando comparada ao grupo dos animais SNI que receberam veículo.

Figura 11: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de ERK na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (Naïve). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (Naïve). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão da proteína ERK por *western blotting*. (A) Figura representativa da expressão de ERK1 e ERK2 fosforilada (ERK1f e ERK2f, respectivamente), ERK1 e ERK2 total e β -actina. A expressão das proteínas ERK1 e ERK2 fosforiladas (B e C, respectivamente) e ERK1 e ERK2 totais (D e E, respectivamente) foram dadas em relação à expressão da β -actina. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e Naïve, respectivamente.

Ainda, observou-se um aumento da expressão de RNAm da MAPK p38 na medula espinal do grupo dos animais submetidos à SNI (Figura 12) quando comparado ao grupo dos animais falsamente operados (sham). Porém, o grupo dos animais SNI tratados com o inibidor de AP-1 não apresentaram esse aumento quando comparado ao grupo dos animais SNI tratados com veículo (Figura 12).

Figura 12: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da p38 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de p38 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

6.5 Aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1

As citocinas pró-inflamatórias estão associadas a quadros inflamatórios/dolorosos, principalmente, por induzirem sensibilização central (Kawasaki *et al.*, 2008b).

O grupo dos animais submetidos à SNI tiveram a expressão na medula espinal de RNAm e proteica do TNF- α (Figura 13A e 13B, respectivamente) aumentada quando comparada à do grupo dos animais falsamente operados (sham). O aumento do RNAm de TNF- α não ocorreu quando os animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 foram comparados aos animais SNI tratados com veículo (Figura 13A). A expressão proteica na medula espinal da TNF- α foi reduzida, porém não significativamente, nos animais tratados com SR11302, no momento estudado, comparada à dos animais SNI tratados com veículo (Figura 13B).

Figura 13: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm e proteica do TNF- α na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l.sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm por RT-PCR (A) ou da proteína de TNF- α por ELISA (B). A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH (A). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 (A) ou 5 (B) camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a" e "b" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham e SNI, respectivamente.

Os animais submetidos à falsa cirurgia (Sham) e à SNI tiveram a expressão na medula espinal de RNAm da IL-6 aumentada (Figura 14) em relação aos animais que não sofreram qualquer intervenção cirúrgica ou injeção (*Naïve*). Esse aumento não ocorre quando os animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 são comparados aos animais SNI tratados com veículo (Figura 14).

Figura 14: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da IL-6 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de IL-6 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

Os animais submetidos à SNI tiveram a expressão na medula espinal de RNAm e proteica da IL-1 β (Figura 15A e 15B, respectivamente) aumentada em relação aos animais falsamente operados (sham). Esse aumento não ocorreu quando os animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 são comparados com os animais SNI tratados com veículo (Figura 15A e 15B, respectivamente).

Figura 15: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm e proteica da IL-1 β na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (Naïve). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (Naïve). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm por RT-PCR (A) ou da proteína de IL-1 β por ELISA (B). A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH (A). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a" e "b" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham e SNI, respectivamente.

Ademais, outra citocina pró-inflamatória avaliada foi a IL-17A. Os animais submetidos à SNI tiveram a expressão na medula espinal de RNAm da IL-17A aumentada (Figura 16) em relação aos animais falsamente operados (Sham). Nos animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1, esse aumento não ocorreu, quando comparados aos animais SNI tratados com veículo (Figura 16).

Figura 16: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão de RNAm da IL-17A na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de IL-17A por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a" e "b" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham e SNI, respectivamente.

6.6 Aumento na expressão de quimiocinas na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1

As quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas e estão relacionadas principalmente à sinalização celular, caracterizando-as como potentes mediadores, inclusive da inflamação, contribuindo para a sensibilização central (Gao *et al.*, 2009).

Uma quimiocina importante é a MCP-1 (CCL2), a qual conhecidamente recruta monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de lesão tecidual ou infecção. Os animais submetidos à SNI tiveram a expressão de RNAm de MCP-1 aumentada na medula espinal (Figura 17) em relação aos animais falsamente operados (Sham). Esse aumento não ocorreu quando os animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 foram comparados aos animais SNI tratados com veículo (Figura 17).

Figura 17: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm do MCP-1 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de MCP-1 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

Os animais submetidos à SNI tiveram não somente a expressão na medula espinal de RNAm da quimiocina MCP-1 aumentada, mas também a de RNAm e proteica de KC (Figura 18A e 18B, respectivamente), outra quimiocina importante, quando comparada à dos animais falsamente operados (sham). Esse aumento não ocorreu quando os animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 foram comparados aos animais SNI tratados com veículo (Figura 18A e 18B, respectivamente).

Figura 18: Efeito do inibidor de AP-1 sobre a expressão do RNAm e da proteína de KC na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm por RT-PCR (A) ou da proteína de KC por ELISA (B). A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH (A). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

6.7 Aumento na concentração de óxido nítrico e na expressão da óxido nítrico sintase induzível na medula espinal provocado pela SNI é dependente do AP-1

Além das citocinas pró-inflamatórias apresentadas até aqui, outros mediadores podem caracterizar um quadro inflamatório/doloroso, por exemplo, o óxido nítrico (Cury *et al.*, 2011). Através de avaliação das concentrações dos metabólitos do óxido nítrico (NO), nitrato e nitrito, observou-se aumento da produção de óxido nítrico na medula espinal dos animais submetidos à SNI (Figura 19) quando comparado aos animais falsamente operados (sham). Esse aumento não foi observado nos animais SNI tratados com o inibidor de AP-1 quando comparado aos animais SNI tratados com veículo (Figura 19).

A produção desse mediador químico pode ser por diferentes meios, sendo principalmente via enzimática, pelas óxido nítrico sintases (NOS). Uma das isoformas de NOS é induzida por diferentes mediadores em condições dolorosas, a chamada óxido nítrico sintase induzível (NOSi), que produz NO em altas concentrações (De *et al.*, 2006). O grupo dos animais submetidos à SNI apresentou um aumento na expressão de NOSi na medula espinal em relação ao grupo dos animais falsamente operados (sham) (Figura 20). Porém, os animais SNI tratados com o inibidor de AP-1 não apresentaram esse aumento quando comparados aos animais SNI tratados veículo (Figura 20).

Figura 19: Efeito do inibidor de AP-1 na estimativa da concentração de óxido nítrico na medula espinal em animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 µg.sítio⁻¹), veículo (Sham ou SNI; 5 µl.sítio⁻¹) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para estimativa da concentração de óxido nítrico, através da reação de Griess. Os resultados foram expressos pela média ± EPM de 5 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

Figura 20: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão da óxido nítrico sintase induzível na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g.sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l.sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão da NOSi por *western blotting* (A e B). (A) Figura representativa. (B) A expressão proteica da NOSi foi dada em relação à expressão da β -actina. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

6.8 Aumento da atividade gelatinolítica das gelatinases provocado pela SNI é dependente do AP-1

Além dos mediadores pró-inflamatórios avaliados, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) têm importante papel em processos patológicos. Nesse quadro, as mais estudadas têm sido as gelatinases, MMP-9 e MMP-2 (Zhang *et al.*, 2011).

No grupo dos animais submetidos à SNI foi observado aumento da expressão do RNAm (Figura 21) e proteica da MMP-9 (Figura 22A, figura representativa do gel; Figura 22B, gráfico) na medula espinal quando comparado ao grupo dos animais falsamente operados (sham). Já nos animais submetidos à SNI tratados com o inibidor de AP-1 não foi observado aumento na expressão de RNAm (Figura 21) e proteica de MMP-9 (Figura 22A, figura representativa do gel; Figura 22B, gráfico) quando comparado aos animais SNI tratados com veículo.

Figura 21: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm da MMP-9 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de MMP-9 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

Figura 22: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão proteica da MMP-9 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de proteína da MMP-9 por zimografia em gel. (A) Imagem representativa de um zimograma de gelatina SDS-PAGE. (B) Gráfico correspondente à zimografia em gel da MMP-2. Os pesos moleculares das bandas da MMP-9 foram identificados após eletroforese em SDS-PAGE 7%, através do padrão de zimografia (Padrão, 10 μl). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a", "b" e "c" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham, SNI e *Naïve*, respectivamente.

No tempo avaliado, a expressão do RNAm da MMP-2 foi inalterada entre os grupos estudados (Figura 23). Entretanto, a atividade gelatinolítica da MMP-2 foi aumentada na medula espinal dos animais submetidos à SNI (Figura 24A, figura representativa do gel; Figura 24B, gráfico) quando comparada à dos animais falsamente operados (sham). Nos na não foi observado esse aumento comparado aos animais SNI tratados com veículo (Figura 24A, figura representativa do gel; Figura 24B, gráfico).

Figura 23: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão de RNAm da MMP-2 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da expressão de RNAm de MMP-2 por RT-PCR. A expressão do gene foi normalizada em relação à expressão da GAPDH. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes.

Figura 24: Efeito do inibidor de AP-1 na expressão da MMP-2 na medula espinal de animais submetidos à SNI. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao modelo experimental de dor neuropática (SNI ou SNI + SR), falsamente operados (Sham) ou não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (*Naïve*). No sétimo dia após a SNI, os animais receberam injeção i.t. de SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{sítio}^{-1}$), veículo (Sham ou SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{sítio}^{-1}$) ou nenhuma injeção (*Naïve*). Após 3h da injeção, a medula espinal (L4-L5) foi coletada para análise da proteína da MMP-2 por zimografia em gel. (A) Imagem representativa de um zimograma de gelatina SDS-PAGE. (B) Gráfico correspondente à zimografia em gel da MMP-2. O peso molecular da banda da MMP-2 foi identificado após eletroforese em SDS-PAGE 12% através do padrão de zimografia (Padrão, 10 μl). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM de 8 camundongos por grupo e representam dois experimentos independentes. "a" e "b" ($P < 0,05$) indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Sham e SNI, respectivamente.

Discussão

7 DISCUSSÃO

A dor neuropática é causada, geralmente, por lesões ou disfunções nervosas, tratamentos medicamentosos ou por doenças que afetam o sistema somatossensorial, acarretando redução drástica na qualidade de vida e até mesmo ser severamente debilitante (Manjavachi *et al.*, 2013).

Por isso, esforços têm sido feitos para que a fisiopatologia da dor neuropática seja mais bem compreendida e, como resultado, a descoberta de novos alvos farmacológicos para tratamento da mesma. Objetivando uma melhor compreensão da fisiopatologia da dor neuropática, modelos animais dessa patologia têm sido utilizados desde o início da década de 70, quando Wall e colaboradores reconheceram que uma lesão no nervo periférico ocasionou mecanismos fisiopatológicos distintos daqueles apresentados por modelos experimentais de dor aguda (Wall & Gutnick, 1974b).

No presente trabalho, foi utilizado o modelo experimental de lesão limitada do nervo ciático (*Spared Nerve Injury* - SNI), menos invasivo que outros modelos e cujo perfil de resposta entre os animais tem pouca variação. Esse modelo provoca hipersensibilidade mecânica imediatamente após a cirurgia, a qual permanece por muitos dias, verificada através da hipernocicepção e alodinia mecânica (Decosterd & Woolf, 2000). Além desses sinais característicos de uma lesão nervosa, a SNI também provoca hipernocicepção térmica e alodinia ao frio, mas não são verificadas mudanças no limiar basal térmico ao calor, de maneira semelhante ao que ocorre em humanos com dor neuropática (Woolf & Mannion, 1999). Quanto a esse fenômeno, acredita-se que há uma mudança na sensibilidade dos nociceptores, mas não uma mudança na excitabilidade dos terminais somatossensoriais (Decosterd & Woolf, 2000). Então, por mimetizar os sinais de dor neuropática em humanos e ser de fácil execução, esse modelo experimental de dor neuropática foi escolhido para este trabalho.

Uma propriedade da dor neuropática experimental e clínica é a sensibilização central, fenômeno identificado particularmente com a redução do limiar nociceptivo e aumento na responsividade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal a estímulos diversos (Woolf, 2011). Com isso, os neurônios sensibilizados permitem

que estímulos não nocivos provoquem dor (alodinia) e facilitam a transmissão de estímulos previamente dolorosos, ou seja, a sensação dolorosa é intensificada (hiperalgesia/hipernocicepção) (Ji *et al.*, 2003). A sensibilização central ocorre devido à repetida estimulação dos nociceptores e em decorrência de alterações plásticas nos neurônios e células envolvidas na transmissão nervosa e sustentação dos neurônios, como células da glia. Essas alterações costumam ocorrer via segundos mensageiros cuja expressão/atividade estão sob comando de fatores de transcrição, por exemplo, o NF- κ B (Xu *et al.*, 2001).

Entretanto, pouco se sabe da correlação entre o AP-1, um outro fator de transcrição importante, e a dor neuropática. Até o momento, já foi descrita a participação desse fator na indução da expressão de diversos mediadores inflamatórios, inclusive na artrite reumatoide, uma patologia dolorosa (Schonthaler *et al.*, 2011b; Zenz *et al.*, 2008a; Rylski & Kaczmarek, 2004). O presente trabalho verificou, pela primeira vez, a participação do AP-1 na hipernocicepção mecânica provocada por um modelo experimental de dor neuropática. Para isso, foi utilizada a ferramenta farmacológica de inibição do AP-1 SR11302, um análogo do ácido retinoico. Essa droga foi escolhida porque possui seletividade de inibição do AP-1 de mais de oitenta por cento sobre a ativação do AP-1 induzida por éster de forbol (TPA), sem induzir a transativação de genes induzida pelo AP-1 (Fanjul *et al.*, 1994). Ademais, essa droga não tem efeito significativo sobre os elementos responsivos ao ácido retinoico, sequência-consenso responsável pela indução transcricional desse ácido (Fanjul *et al.*, 1994).

Os resultados deste estudo apontaram que a hipernocicepção mecânica desencadeada pela SNI é, pelo menos em parte, dependente do AP-1. Essa dependência foi melhor visualizada quando os animais receberam a droga após a SNI (pós-tratamento), o que sugere que o AP-1 seja mais importante na manutenção que na indução da hipernocicepção neuropática neste modelo experimental. Isso nos fez acreditar que o AP-1 pode ser um novo alvo farmacológico para o tratamento da dor neuropática. Obviamente, foi necessário entender melhor o porquê o bloqueio do AP-1 provocava antinocicepção no modelo experimental estudado.

A injeção do inibidor de AP-1, SR11302, foi feita pela via intratecal, no canal raquidiano, diretamente no espaço subaracnoideo, que por mais que seja cuidadosa e executada por profissional altamente treinado, pode lesionar a medula espinal.

Quando lesionada, pode haver migração de neutrófilos, células cujo conteúdo citoplasmático é rico em diversas enzimas e mediadores inflamatórios, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases da matriz extracelular. Ou seja, esses mediadores estariam sendo formados e liberados em virtude dessa possível lesão na medula espinal e não em decorrência da ativação do AP-1 após a SNI, o que constituiria uma limitação metodológica para avaliação dos nossos achados. Todavia, as medulas espinais que receberam injeção intratecal (SR11302 ou veículo) não apresentaram migração de neutrófilos (dado não mostrado), descartando a possibilidade de algum dano significativo à medula espinal provocado pela injeção intratecal.

A droga SR11302 é, atualmente, a mais utilizada experimentalmente para inibição de AP-1, mesmo que ainda tenha seu mecanismo de ação inibitório do AP-1 não elucidado por completo (Fanjul *et al.*, 1994). Essa droga é frequentemente referenciada em estudos *in vitro*, por isso, foi necessário saber se na dose e nas condições experimentais utilizadas no presente estudo (*in vivo*) houve realmente a inibição do AP-1. Já é sabido que a expressão do AP-1 é rapidamente induzida, porque esse fator de transcrição é constituído por proteínas induzidas por genes de expressão imediata (IEGs), os quais são expressos de maneira transitória, gerando RNAm com tempo de meia-vida reduzido (Karin, 1995). Corroborando com essas informações, foi relatado aumento na expressão do AP-1 uma hora após lesão da medula espinal através de um modelo experimental de dor neuropática em ratos (Xu *et al.*, 2001). Aliás, a expressão de c-Fos, um IEG e um dos principais componentes do AP-1, é detectada em aproximadamente 30 minutos a 1 hora nas lâminas superficiais da medula espinal após diferentes estímulos térmicos, mecânicos ou químicos (Coggeshall, 2005).

Não obstante, é muito difícil identificar e afirmar com precisão aumento ou diminuição da expressão e ativação do AP-1, pois pode ser formado por inúmeras combinações de proteínas (Karin *et al.*, 1997b). A maioria dos estudos relaciona o aumento da expressão e ativação (fosforilação) de c-Jun e, menos frequente, do c-Fos, principais constituintes do dímero do AP-1, com o aumento da expressão e ativação do AP-1 (Angel *et al.*, 1988; Allegretto *et al.*, 1990; Foletta *et al.*, 1998; Wagner & Eferl, 2005). Assim, o presente trabalho confirmou a eficácia do inibidor do AP-1, SR11302, através da análise da imunofluorescência de c-Jun

ativado (fosforilado). O c-Jun fosforilado teve sua localização no núcleo celular, sugerindo fortemente que o c-Jun se encontra ativado. Em relação ao tipo celular, provavelmente o c-Jun ativado se encontra no núcleo dos neurônios, haja vista que não houve colocalização do c-Jun fosforilado nuclear com Iba1 (marcador de microglia) nem com GFAP (marcador de astrócitos) na medula espinal. Apesar da ativação da microglia e dos astrócitos ser evidente pela imunofluorescência, não foi possível identificar diferenças entre os grupos estudados. Por isso, a ativação das células gliais foi mais bem avaliada pelas técnicas de RT-PCR (microglia) e *western blotting* (astrócitos).

A ativação das células gliais ocorre após indução experimental de dor neuropática *per se*, conforme já foi reportado, mas também pode ser ativada por citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos etc. (Xie *et al.*, 2009; Hald *et al.*, 2009; Gao & Ji, 2010a). Aliás, na medula espinal, a interrupção da homeostase causada pela dor neuropática experimental transforma células residentes gliais (microglia e astrócitos) em células relacionadas ao estado doloroso, através de mudanças morfológicas e liberação de mediadores algógenos (Clark *et al.*, 2013; Austin & Moalem-Taylor, 2010). A ativação microglial é caracterizada pelo aumento na expressão de diferentes marcadores, como o CD11b e Iba1, bem como a ativação da MAPK p38 (McMahon *et al.*, 2005; Terayama *et al.*, 2008). Corroborando com essas informações, este estudo demonstrou que a SNI desencadeia ativação da microglia, através do aumento da expressão do RNAm do marcador de atividade microglial Iba1 e da MAPK p38, ambos dependentes da ativação de AP-1. Outros estudos já haviam sugerido que o AP-1 esteja relacionado à ativação da microglia (Jeong *et al.*, 2013; Schnegg *et al.*, 2012). Nesse contexto, a microglia é reportada como uma das primeiras células da medula espinal a ser ativada, aproximadamente 4 horas após lesão nervosa periférica (Tanga *et al.*, 2004), mas se prolonga por meses (Clark *et al.*, 2007a; Clark *et al.*, 2007b; Coyle, 1998). A ativação da microglia na medula espinal promove a facilitação do estímulo doloroso, pois libera diversos mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO, PGE₂, os quais aumentam a ativação dos neurônios espinais, provocando sensibilização central (Austin & Moalem-Taylor, 2010). Além disto, a microglia também é reportada como responsável pela ativação dos astrócitos (Rohl *et al.*, 2007).

Os astrócitos representam o tipo celular mais abundante do sistema nervoso central e sua ativação é verificada dias após indução experimental de dor neuropática e se prolonga por muitos dias, por isso, parecem importantes na manutenção desse quadro (Hald *et al.*, 2009; Tanga *et al.*, 2004). O aumento da ativação dos astrócitos, mensurado através de marcadores específicos, como o GFAP e S100 β , foi observado em diferentes modelos experimentais de dor neuropática (Stuesse *et al.*, 2001; Coyle, 1998; Vega-Avelaira *et al.*, 2007). De modo não diferente, dados do presente trabalho demonstraram que a SNI provocou aumento na ativação dos astrócitos, através do aumento da expressão de GFAP, marcador de astrócitos, dependente de AP-1. Essa ativação pode ter sido causada pela microglia anteriormente ativada. Além disso, o AP-1 pode estar contribuindo para a ativação astrocitária via regulação transcricional do GFAP ou por alguma via indireta, via ativação neuronal, como sugerem os dados de localização da forma fosforilada de c-Jun. Logo, nossos dados corroboram com Bachetti e colaboradores, que reportaram que a expressão do GFAP foi induzida por diversos fatores de transcrição, inclusive pelo AP-1 (Bachetti *et al.*, 2010).

A ativação astrocitária decorrente de lesão nervosa periférica ocasiona liberação de mediadores pró-inflamatórios na medula espinal e no cérebro, ligados à manutenção da dor neuropática e aos aspectos afetivo-motivacionais da dor neuropática, respectivamente (Austin & Moalem-Taylor, 2010). Entre os mediadores liberados após ativação dessas células estão TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO, PG, aminoácidos excitatórios, ATP, os quais promovem a redução do limiar de ativação dos nociceptores, além de ativar diretamente os neurônios, facilitando a condução nervosa da dor – sensibilização central (Austin & Moalem-Taylor, 2010). Em prova disso, Wei e colaboradores demonstraram que a ligação do nervo infraorbital provocou ativação astrocitária por pelo menos 28 dias, acompanhada de aumento na expressão de TNF- α e IL-1 β na medula rostral ventromedial, local este que, quando administrado flurocitrato, inibidor de astrócitos, ou propentofilina, inibidor da microglia e liberação de citocinas (Raghavendra *et al.*, 2003b), houve atenuação da hipersensibilização provocada pelos mediadores acima supracitados (Wei *et al.*, 2008). Logo, a inibição da ativação de células gliais são medidas farmacológicas bastante interessantes para o tratamento da dor neuropática, pois evitaria a

liberação de inúmeros mediadores pró-nociceptivos, bem como a ativação de proteinoquinasas.

A ativação de proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK) ocorre, dentre outros locais, nas células gliais após lesão nervosa experimental, e medeiam diferentes fases da dor neuropática (Zhuang *et al.*, 2005). Após indução de hipernocicepção neuropática pelo modelo experimental SNL (*Spinal Nerve Ligation*), ocorre na medula espinal um aumento na fosforilação da ERK nos diferentes tempos estudados na microglia e astrócitos (Mika *et al.*, 2013), de p38 na microglia (Tsuda *et al.*, 2004) e de JNK nos astrócitos durante todo o tempo avaliado, contribuindo para a manutenção da dor neuropática experimental (Gao *et al.*, 2009; Zhuang *et al.*, 2006). Quando a via da JNK é inibida, por injeção intratecal de um peptídeo inibidor de JNK, a instalação do quadro hipernociceptivo desencadeado por modelo animal de hipernocicepção neuropática é prevenida (Zhuang *et al.*, 2006).

Neste trabalho, verificou-se aumento na expressão da JNK ativada (fosforilada), dependente de AP-1 nos animais submetidos à SNI. Frequentemente, a ativação da JNK é acompanhada pelo aumento da expressão de c-Jun (Zhuang *et al.*, 2006). Em consequência da inibição de JNK pelo inibidor de AP-1, o seu principal substrato c-Jun provavelmente teve sua ativação ainda mais reduzida, que pode ser verificado pela imunofluorescência. Com a redução de JNK e c-Jun pela droga SR11302, ambos a montante (*upstream*) do AP-1, provavelmente prejudicaram a ativação do AP-1 provocada pela SNI, reduzindo a hipernocicepção neuropática mecânica, visto nos resultados anteriores. Além disso, o nível de JNK total foi indiferente entre os grupos estudados, indicando que o AP-1 não induziu a transcrição de JNK, mas sua ativação. Karin e colaboradores já haviam reportado a ligação entre AP-1 e JNK quando mostraram que o aumento da atividade do AP-1 em resposta a estímulos que ativam a JNK, por exemplo, TNF- α ou irradiação ultravioleta, é devido ao aumento na síntese de c-Jun e, possivelmente, também de c-Fos (Karin, 1995). A hipersensibilização neuronal provocada pela JNK se deve, pelo menos em parte, à indução da expressão da quimiocina MCP-1 nos astrócitos da medula espinal, a qual promove sensibilização central rapidamente por aumento na transmissão sináptica excitatória (lâmina II da medula espinal) e ativação de ERK (Gao *et al.*, 2009).

Após ativação das fibras C, a fosforilação de ERK ocorre em aproximadamente 1 minuto na medula espinal e pode ser induzida por estímulos nocivos de frio, calor e mecânico, mas não por estímulos inócuos (Ji *et al.*, 1999). Apesar de serem normalmente caracterizadas em ERK1 e ERK2, com diferentes pesos moleculares, ao menos na dor neuropática, não há diferença elucidada entre elas. Logo, foram citadas indistintamente como ERK. A ERK fosforilada é apontada como marcadora de ativação neuronal, devido a sua rápida expressão após estímulos, por exemplo, capsaicina (Gao & Ji, 2009). Neste trabalho, verificou-se que a SNI induziu aumento na expressão de ERK fosforilada (ativada), dependente da ativação do AP-1. Por outro lado, a expressão de ERK total é indiferente entre os grupos estudados. Ou seja, o AP-1 provavelmente induziu apenas a fosforilação, mas não a transcrição genética da ERK. Um dos principais substratos da ERK é o c-Fos, um dos principais componentes do AP-1, o qual quando é inibido por oligonucleotídeo antisense (ODN) após indução experimental de dor neuropática, a ativação do AP-1 na medula espinal é também inibida (Xu *et al.*, 2001), comprovando sua importante participação na composição do AP-1. Com a inibição da ativação de ERK, sugere-se que a fosforilação e ativação de c-Fos, seu principal substrato, tenha sido prejudicada também, contribuindo para a redução da atividade do AP-1, ou seja, o efeito global de inibição do AP-1 pelo SR11302 foi provavelmente amplificado.

Além dessas MAPK, a p38 também está envolvida na ativação do AP-1, via fosforilação e ativação de fatores de transcrição a montante (*upstream*) do AP-1, como TCF, MEF2C e ATF2 (Eferl & Wagner, 2003). Essa MAPK é geralmente ativada por citocinas pró-inflamatórias e por estresse celular, ao passo que a administração de inibidores de p38 aliviou a inflamação e a artrite reumatoide experimentais (Kumar *et al.*, 2003; Boyle *et al.*, 2006). A ativação da p38 aumenta diferentes mediadores inflamatórios, dentre eles TNF- α , IL-1 β e PGE₂, e a expressão de p38 pode ser aumentada em resposta a diversos estímulos, tais como IL-1 β , COX-2 e NOSi (Ji *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2003). A expressão basal da p38 fosforilada na medula espinal é moderada e, após estímulos nocivos, aumentada. Após SNI em ratos, a expressão dessa MAPK aumentou por volta da décima segunda hora e atingiu seu pico de expressão no terceiro dia após a SNI na medula espinal (Wen *et al.*, 2007). O bloqueio intratecal da via de sinalização da p38 reduz a

hipernocicepção evocada por modelos experimentais de dor neuropática (Jin *et al.*, 2003; Tsuda *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2009), juntamente com diminuição da ativação da microglia (Chang *et al.*, 2009), sugerindo que a p38 possivelmente ativa a microglia. Neste estudo, verificou-se o aumento da expressão de RNAm da p38 sete dias após SNI, dependente da atividade do AP-1. Portanto, esse resultado sugere que o AP-1, ao contrário das outras MAPK, está induzindo a transcrição genética de p38. Esse aumento pode ter sido acarretado não somente pela SNI, mas também pelo estímulo de citocinas pró-inflamatórias. Além do mais, a ativação da p38 pode estar colaborando para a ativação da microglia.

Como visto anteriormente, a ativação de células gliais, assim como ativação de MAPK provocam liberação de inúmeros mediadores algógenos, relacionados ao processo doloroso. Por outro lado, muitos desses mediadores desencadeiam a ativação de células gliais e também de MAPK, tornando um ciclo de ativação de celular e enzimas e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Logo, o inibidor de AP-1 seria uma ferramenta terapêutica plausível para o tratamento da dor neuropática, pois inibiu tanto a ativação das células gliais como das MAPK e, provavelmente, inibe as vias a jusante (*downstream*) dessas células e quinases.

Sabendo que a ativação de células gliais e MAPK provocam intensa liberação de mediadores pró-inflamatórios na dor neuropática, os quais provocam sensibilização central, contribuindo para a cronificação do processo doloroso, verificamos se essa liberação de mediadores era dependente de AP-1. As citocinas pró-inflamatórias são elementos-chave em um processo doloroso, pois acarretam síntese/liberação de outras citocinas, quimiocinas, enzimas, cinases etc. Além disso, elas contribuem para a sensibilização central, ou seja, na indução e manutenção da dor. Em prova disso, estudos mostraram que a administração intratecal de antagonistas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Milligan *et al.*, 2001) e IL-1 β (Mika *et al.*, 2008) ou anticorpo neutralizante de IL-6 (Schoeniger-Skinner *et al.*, 2007) atenuou os comportamentos hipernociceptivos em modelos experimentais de dor neuropática.

No presente estudo, foi verificada elevada expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α dependente da ativação do AP-1, sugerindo que a inibição desse fator de transcrição impediria a participação do TNF- α na sensibilização central na SNI, reduzindo a dor. Afinal, a injeção intratecal de TNF- α é o suficiente para induzir

sintomas de dor neuropática, como hipernocicepção térmica e alodinia mecânica, pois pode aumentar direta e rapidamente a transmissão sináptica excitatória no corno dorsal da medula espinal (Kawasaki *et al.*, 2008b), ativar a MAPK p38 na microglia espinal (Hao *et al.*, 2007; Svensson *et al.*, 2005) e ativar a JNK, a qual promove aumento na expressão de KC e MCP-1, nos astrócitos espinais, levando à hipersensibilização central (Gao *et al.*, 2009). A administração intratecal de um bloqueador de TNF- α reduziu a hipernocicepção neuropática em ratos (Marchand *et al.*, 2009). Então, a inibição do TNF- α através do inibidor de AP-1 (SR11302) provavelmente atenuou a sensibilização central provocada pela SNI, refletindo na antinocicepção provocada por essa droga, verificada nos experimentos comportamentais.

O TNF- α também induz produção/liberação de diversas outras citocinas pró-inflamatórias. Na hipernocicepção inflamatória em ratos, mas não em camundongos, o TNF- α desencadeia a liberação de IL-1 β dependente de IL-6 (Cunha *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 1992). Entretanto, a cascata de ativação e liberação de citocinas ainda não foi bem esclarecida na dor neuropática. Neste estudo, foi verificado um aumento na expressão de RNAm da citocina pró-inflamatória IL-6 dependente da atividade de AP-1, sugerindo que o AP-1 leva a produção/liberação também de IL-6 após SNI. Cunha e colaboradores (Cunha *et al.*, 2005) demonstraram que a injeção intraplantar de IL-6 em camundongos desencadeia hipernocicepção, a qual foi bloqueada pela administração de indometacina (inibidora da síntese de prostaglandinas), mas não com a administração de IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1 β), sugerindo que a hipernocicepção provocada pela IL-6 não depende de receptores da IL-1 β , mas é de prostaglandinas. A prostaglandina E₂ promove hipersensibilização neuronal pela abertura dos canais de sódio dependentes de voltagem e fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (Gold *et al.*, 1998). Consequentemente, a IL-6 provavelmente estaria provocando sensibilização central, via prostaglandina após SNI.

A citocina IL-1 β é conhecidamente pró-nociceptiva, envolvida em inúmeros processos dolorosos, acarretando liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-6 e TNF- α (Clark *et al.*, 2013). Quando administrada por via intratecal, a IL-1 β induz hipernocicepção e alodinia em ratos (Mika *et al.*, 2008). No presente estudo, a inibição da liberação do IL-1 β pela inibição do AP-1 (SR11302)

provavelmente contribuiu para a antinocicepção desencadeada pela SNI. Afinal, animais experimentais que têm a sinalização da IL-1 β prejudicada, têm os sinais dolorosos induzidos por danos nervosos atenuados (Wolf *et al.*, 2006). Além disso, o bloqueio de vias de sinalização dependentes da IL-1 β não somente atenua os sinais de dor neuropática, mas também impede a atividade neuronal ectópica espontânea, provocados por modelo experimental de dor neuropática (Gabay *et al.*, 2011).

Na prática, o bloqueio da IL-1 β e suas vias dependentes já é utilizado com sucesso no tratamento da artrite reumatoide: a anakinra, antagonista recombinante do receptor de IL-1 β tipo I humano (Mertens & Singh, 2009). A administração de anticorpo anti-IL-1 β reduziu sinais de hipernocicepção neuropática (SNI) em ratos (Wang *et al.*, 2008b; Wang *et al.*, 2008a). A administração intratecal de anticorpos neutralizantes de IL-1 β , TNF- α ou IL-6 diminuiu drasticamente os comportamentos hipernociceptivos provocados por modelos experimentais de hipernocicepção neuropática (Mika *et al.*, 2008; Milligan *et al.*, 2001; Schoeniger-Skinner *et al.*, 2007). Por isso, o bloqueio da expressão de IL-1 β , citocina envolvida na sensibilização central, provocado pela inibição de AP-1 aumenta o potencial terapêutico do inibidor do AP-1 para o tratamento da dor neuropática.

Uma infinidade de mediadores pró-nociceptivos estão relacionados com a dor neuropática, como visto acima. Atualmente, a citocina IL-17A tem emergido como uma dessas, pois participa de diversas patologias, tais como artrite reumatóide, esclerose múltipla, alergia, asma, alguns tipos de cânceres, doença inflamatória intestinal e psoríase (Pappu *et al.*, 2010). Em cultura de células epiteliais brônquicas humanas, a IL-17A promove liberação de diversas quimiocinas, como KC, através da ativação de MAPKs, principalmente p38 e ERK. Quando administrada em cultura de macrófagos, a IL-17A promove liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas TNF- α e IL-1 β . Ainda, a participação da IL-17A foi demonstrada em diferentes modelos experimentais de dor neuropática em ratos (Noma *et al.*, 2011). No presente trabalho, foi demonstrado que a SNI provocou aumento acentuado na expressão de IL-17A na medula espinal de maneira dependente do AP-1. O aumento da expressão de IL-17A pode estar contribuindo para o aumento da expressão de TNF- α e IL-1 β e, em consequência, contribuindo para hipersensibilização dos nociceptores, acentuando a hipernocicepção. Além disso, o aumento visto na SNI de IL-17A pode ser um dos responsáveis pela ativação dos

astrócitos e da microglia vistos neste trabalho. Afinal, Kim e Moalem-Taylor reportaram que os animais deficientes para IL-17 submetidos a um modelo experimental de dor neuropática tiveram a ativação dessas células gliais reduzida (Kim & Moalem-Taylor, 2011).

Não somente as citocinas pró-inflamatórias estão ligadas à dor neuropática, mas também as quimiocinas, citocinas altamente especializadas produzidas em células do sistema nervoso e imune (Old & Malcangio, 2012). Além de o seu alto poder quimiotático, as quimiocinas também têm sido relacionadas com a sensibilização central em processos dolorosos neuropáticos, através de modulação da atividade elétrica de neurônios por diferentes vias regulatórias, incluindo ativação de MAPK e liberação de neurotransmissores, principalmente por desencadear ativação de células gliais (Old & Malcangio, 2012; White *et al.*, 2007). Por isso, não é uma surpresa que muitos autores verificaram aumento da expressão da quimiocina derivada de queratinócitos (KC) na medula espinhal de camundongos após lesão nervosa (Manjavachi *et al.*, 2013). Assim, nós também encontramos aumento na expressão de KC na medula espinal de animais que foram submetidos à SNI, dependente de AP-1. Resultados prévios mostram que a KC participa da hipernocicepção, pois quando se injeta a mesma em animais *naïve*, há hipernocicepção, ao passo que a injeção de anticorpos neutralizantes dessa citocina, impedem essa hipernocicepção (Manjavachi *et al.*, 2013). Logo, a inibição do AP-1 provoca redução da expressão de KC, impedindo, provavelmente, a ativação de diversas vias de sinalização envolvidas na dor neuropática, como a via das MAPKs e subsequente ativação de células gliais.

Outra quimiocina importante na transmissão nociceptiva é a MCP-1/CCL2, que está presente em neurônios de médio e pequeno calibre e astrócitos na medula espinal e nos neurônios do GRD, principalmente naqueles que contêm substância P e CGRP (Gao *et al.*, 2009). Quanto aos seus receptores, CCR2, estão presentes na microglia, astrócitos e neurônios. Posteriormente à lesão nervosa, há aumento da produção de TNF- α na microglia, que desencadeia ativação da JNK nos astrócitos e provoca aumento exacerbado de MCP-1 (Mika *et al.*, 2013). Corroborando com essas informações, porém sem identificar a sequência cronológica dos eventos, o presente trabalho demonstrou que a lesão ao nervo ciático (SNI) provocou ativação da microglia, aumento na expressão na medula espinhal de TNF- α , ativação de

astrócitos, aumento na expressão de JNK e, aumento na expressão de MCP-1 na medula espinal, provavelmente contribuindo para a manutenção da dor neuropática. Diferentes estudos já correlacionaram o aumento da expressão de MCP-1 à dor neuropática, inclusive a injeção intratecal dessa citocina acarretou sensibilização mecânica e térmica, a qual foi bloqueada quando administrado antagonista do receptor de MCP-1, CCR2 (White *et al.*, 2007; Gao & Ji, 2010b). Além disso, a MCP-1, como dito anteriormente, contribui para a sensibilização central, pois facilita a transmissão sináptica excitatória e ativa a ERK (Gao *et al.*, 2009), e a ativação da ERK também foi verificada no presente estudo. Neste trabalho, a dor neuropática experimental desencadeou a ativação da microglia, o aumento da expressão de TNF- α , JNK, ativação de astrócitos, aumento na expressão de MCP-1 e ERK. Todas essas alterações estão relacionadas à sensibilização central, as quais se mostraram dependentes de AP-1 neste estudo. Logo, a inibição do AP-1 é, indubitavelmente, um alvo farmacológico promissor para o tratamento da dor neuropática.

Evidentemente, quando se fala de mediadores inflamatórios, não se pode negligenciar as enzimas e moléculas sinalizadoras. Dentre estas, há o óxido nítrico, mediador derivado da L-arginina por ação de formas neuronais e não neuronais de NO sintases (Esplugues, 2002). A literatura reporta efeito dual do óxido nítrico na nocicepção, dependente do tempo avaliado, modelo experimental estudado, via de administração de doadores de NO, sítio de ação etc. (Cury *et al.*, 2011). Em diversas condições patológicas ou estímulos físicos ou biológicos, a geração de altos níveis de óxido nítrico estão associados ao aumento na expressão e atividade da NOSi (Reale *et al.*, 2006). Corroborando com esses achados, neste trabalho foi demonstrado que o aumento na concentração de pareado com o aumento na expressão de NOSi NO na medula espinal induzido por SNI é dependente da atividade de AP-1. Outros estudos já haviam relatado que o NO está envolvido na manutenção de sinais de dor neuropática em ratos (Chacur *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 1998). Apesar do conhecido efeito dual do NO na nocicepção, no presente estudo é sugerido que o NO e a NOSi estejam contribuindo para o quadro de sensibilização central e facilitação do processo doloroso, visto que a região promotora da NOSi contém o sítio de ligação para o AP-1 (Marks-Konczalik *et al.*, 1998). Além do mais, a indução de NOSi através de AP-1 ocorre por vias dependentes das MAPK p38 e ERK (Marks-Konczalik *et al.*, 1998), corroborando com os resultados apresentados

neste trabalho que demonstraram aumento na expressão de p38 e na ativação de ERK, contribuindo para o processo doloroso. O óxido nítrico também atua na regulação da expressão de uma variedade de genes relacionados à matriz extracelular, incluindo os que codificam o inibidor tecidual de metaloproteinases-1 (TIMP-1) e a MMP-9 (Hsu *et al.*, 2007; Ridnour *et al.*, 2007).

As MMP-2 e -9 são enzimas que degradam componentes da matriz extracelular, citocinas imaturas e outros substratos, além de degradarem também gelatina *in vitro*, o que permite avaliar sua atividade enzimática em laboratório, de onde vem a designação gelatinases (Frankowski *et al.*, 2012). As gelatinases estão relacionadas a muitos processos fisiológicos, como cicatrização de feridas e remodelamento no desenvolvimento normal (Yong, 2005). Elas também participam de diferentes patologias, por exemplo, Alzheimer, câncer e esclerose múltipla (Yong *et al.*, 1998). Em modelos animais de esclerose múltipla, a MMP-1, -2, -3 e -9 estão colocalizadas em astrócitos, microglia e macrófagos cerebrais (Leppert *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 1998). Em lesões cerebrais ou na medula espinal, as gelatinases degradam componentes da lâmina basal, desencadeando o rompimento da barreira hematoencefálica, desmielinização e resposta neuroinflamatória progressiva (Lakhan & Avramut, 2012; Shigemori *et al.*, 2006), provavelmente contribuindo enormemente para a cronificação do processo doloroso. O bloqueio de amplo espectro de MMPs ou até mesmo o tratamento com inibidor das gelatinases oferecem neuroproteção e recuperação neurológica (Noble *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2008). Logo, a inibição das MMPs, como já é pensada há tempos, pode ser uma estratégia farmacológica no tratamento de diversas patologias, inclusive da dor neuropática. A periodontite, doença inflamatória grave que acomete os tecidos de suporte e sustentação dos dentes, é frequentemente tratada de maneira eficaz com doxiciclina, antimicrobiano potente e inibidor de gelatinases (Lakhan & Avramut, 2012).

O presente trabalho demonstrou que a atividade gelatinolítica da MMP-2, mas não a expressão do RNAm, encontra-se elevada no grupo SNI, dependente da atividade do AP-1. Por isso, sugere-se que a MMP-2 esteja envolvida no processo neuropático induzido pelo AP-1, mas não seja por indução transcricional, visto que o nível de RNAm de MMP-2 está inalterado nos grupos estudados. Já é bem documentado que a MMP-2 pode ser ativada de diferentes maneiras e uma delas é

a ativação pós-transcricional (Agrawal *et al.*, 2008), neste caso, o AP-1 não induziu a transcrição da MMP-2, mas apenas a ativação. Essa ativação pode estar ocorrendo diretamente ou indiretamente, através da indução transcricional do AP-1 para citocinas, por exemplo, TNF- α e IL-1 β , como visto anteriormente, que clivam as MMPs, ativando-as. Kawasaki e colaboradores já haviam demonstrado a participação das gelatinases na hipernocicepção neuropática, no modelo de lesão do nervo espinal (*Spinal Nerve Injury*), onde o nível de MMP-2 aumentou no GRD da medula espinal apenas a partir do 21º dia após a cirurgia, com ativação astrocitária, ao passo que a expressão de MMP-9 foi rapidamente aumentada (poucas horas), permanecendo por poucos dias no GRD da medula espinal, com ativação da microglia (Kawasaki *et al.*, 2008a). Este dado corrobora para o aumento encontrado apenas na MMP-9, e não na -2, no tempo avaliado no presente trabalho.

Ainda, foi demonstrado que a injeção intratecal de MMP-2 ou de MMP-9 provoca sinais característicos de hipernocicepção neuropática, como hipernocicepção mecânica (Kawasaki *et al.*, 2008a). Nesse mesmo estudo, foi visto que a MMP-9 e a MMP-2 também clivam a pró-IL-1 β em IL-1 β ativa em fase inicial e tardia, respectivamente, da hipernocicepção neuropática experimental (Kawasaki *et al.*, 2008a). Como um ciclo, a IL-1 β também estimula a produção de MMP-9 em cultura de neurônios humanos, bem como em cérebros de camundongos submetidos a um trauma (Vecil *et al.*, 2000). No presente estudo foi visto o aumento da atividade gelatinolítica da MMP-2 e -9 no sétimo dia após a SNI, o qual foi reduzido após tratamento com inibidor de AP-1, coincidindo com a também redução do RNAm de TNF- α e IL-1 β , citocinas conhecidamente ativadas por clivagem pelas gelatinases.

Corroborando com esses achados, Xu e colaboradores reportaram que a inibição intratecal do AP-1, através do ODN antisense c-Fos, suprime o aumento da expressão na medula espinal de MMP-9 após indução experimental de dor neuropática (Xu *et al.*, 2001). Com a inibição do AP-1 e também das gelatinases, como reportado neste trabalho, provavelmente houve redução da desmielinização do nervo, através da degradação da proteína básica de mielina causada pelas gelatinases, principalmente a MMP-9 (Kawasaki *et al.*, 2008a; Chattopadhyay *et al.*, 2007). Por isso, a inibição das gelatinases, seja indiretamente pela inibição do AP-1 ou diretamente, é uma estratégia terapêutica da dor neuropática que os estudiosos

devem levar a sério, pois podem impedir tanto a degradação do sistema de condução nervosa quanto o aumento de citocinas pró-inflamatórias e, por conseguinte, a dor.

Dado o exposto, resumidamente, o modelo experimental de dor neuropática estudado (SNI) provoca ativação do fator de transcrição AP-1 (Ilustração 5), o qual se mostrou envolvido na indução e ativação de diferentes vias de sinalização que estão relacionadas ao processo de sensibilização central e hipernocicepção. Provavelmente, a SNI, por via dependente de AP-1, ativou, primeiramente, as células gliais e as MAPK na medula espinal. Consequentemente, houve aumento de diferentes mediadores algógenos, tais como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, NO, NOSi e, metaloproteinases da matriz extracelular, dependente da ativação do AP-1 (Ilustração 5). Todas essas vias de sinalização estão envolvidas no processo de sensibilização central e, assim sendo, na manutenção da dor neuropática.

Há tempos, pesquisadores vêm reportando a inibição do AP-1 como uma promissora ferramenta farmacológica no tratamento de diferentes patologias, principalmente no câncer (Kim & Iwao, 2003; Zenz *et al.*, 2008b; Schonthaler *et al.*, 2011a). Então, a partir dos resultados mostrados no presente trabalho, um inibidor do AP-1, que inibirá suas vias de sinalização intracelular a jusante (*downstream*), pode ser considerado uma estratégia farmacológica interessantíssima também para a terapêutica da dor neuropática.

Ilustração 5: Esquema da hipernocicepção neuropática dependente do AP-1. O modelo experimental de hipernocicepção neuropática desencadeia ativação do fator de transcrição AP-1 na medula espinal, com aumento na ativação nuclear do seu principal componente c-Jun. A SNI, por via dependente do AP-1, provoca ativação da microglia e astrócitos, células gliais envolvidas na liberação de mediadores algógenos. A microglia está envolvida no aumento da expressão dos mediadores TNF α , IL-1 β , IL-6, NO, NOSi, MMP-9 e a MAPK p38 e ativação da MAPK ERK, dependentes de AP-1. Por outro lado, a ativação dos astrócitos provoca aumento na expressão de TNF α , IL-1 β , NO, NOSi, IL-17A e MMP-2 e ativação da ERK e JNK. A JNK provoca aumento na expressão das quimiocinas MCP-1 e KC, dependentes de AP-1. A p38, a IL-17A, MMP-2 e MMP-9 provocam aumento na ativação de TNF α e IL-1 β . Além disso, a p38 e a IL-17A também ativam a microglia e os astrócitos, respectivamente. Todos esses achados contribuem, de alguma forma, para a sensibilização central, fenômeno provavelmente responsável pela cronificação da hipernocicepção neuropática.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, a hipótese foi parcialmente confirmada, já que o AP-1 parece não ser tão importante para a indução, mas é para a manutenção da hipernocicepção neuropática provocada pela SNI. Sua importância é verificada através da ativação de células gliais e proteinocinases ativadas por mitógenos, além de induzir expressão de mediadores inflamatórios e metaloproteinases da matriz extracelular. Por isso, o AP-1 é um promissor alvo farmacológico para tratamento da dor neuropática. Entretanto, a inibição crônica desse fator transcricional ubíquo tem a desvantagem de que importantes proteínas podem ter sua expressão reprimida, podendo gerar reações adversas desconhecidas.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Abbadie, C & Besson, JM. (1992). c-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neuroscience*, **48**, 985-993.
2. Abbadie, C, Lombard, MC, Morain, F & Besson, JM. (1992). Fos-like immunoreactivity in the rat superficial dorsal horn induced by formalin injection in the forepaw: effects of dorsal rhizotomies. *Brain Res*, **578**, 17-25.
3. Agrawal, SM, Lau, L & Yong, VW. (2008). MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol*, **19**, 42-51.
4. Al-Amin, H, Sarkis, R, Atweh, S, Jabbur, S & Saade, N. (2010). Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: Effects on brain cytokines and neurotrophins. *Exp Neurol*.
5. Allegretto, EA, Smeal, T, Angel, P, Spiegelman, BM & Karin, M. (1990). DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem*, **42**, 193-206.
6. Angel, P, Hattori, K, Smeal, T & Karin, M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*, **55**, 875-885.
7. Angel, P, Imagawa, M, Chiu, R, Stein, B, Imbra, RJ, Rahmsdorf, HJ, Jonat, C, Herrlich, P & Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729-739.
8. Austin, PJ & Moalem-Taylor, G. (2010). The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*, **229**, 26-50.
9. Bachetti, T, Di, ZE, Lantieri, F, Caroli, F, Regis, S, Filocamo, M, Rainero, I, Gallone, S, Cilia, R, Romano, S, Savoardo, M, Pareyson, D, Biancheri, R, Ravazzolo, R & Ceccherini, I. (2010). A novel polymorphic AP-1 binding element of the GFAP promoter is associated with different allelic transcriptional activities. *Ann Hum Genet*, **74**, 506-515.

10. Barnes, PJ & Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, **336**, 1066-1071.
11. Baron, R & Binder, A. (2004). [How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept]. *Orthopade*, **33**, 568-575.
12. Basbaum, AI, Bautista, DM, Scherrer, G & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **139**, 267-284.
13. Beedles, KE, Sharpe, PT, Wagner, EF & Grigoriadis, AE. (1999). A putative role for c-Fos in the pathophysiology of Paget's disease. *J Bone Miner Res*, **14 Suppl 2**, 21-28.
14. Beggs, S & Salter, MW. (2007). Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*, **21**, 624-633.
15. Behrens, A, Sibilio, M, David, JP, Mohle-Steinlein, U, Tronche, F, Schutz, G & Wagner, EF. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J*, **21**, 1782-1790.
16. Bergers, G, Graninger, P, Braselmann, S, Wrighton, C & Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol*, **15**, 3748-3758.
17. Bergman, MR, Cheng, S, Honbo, N, Piacentini, L, Karliner, JS & Lovett, DH. (2003). A functional activating protein 1 (AP-1) site regulates matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) transcription by cardiac cells through interactions with JunB-Fra1 and JunB-FosB heterodimers. *Biochem J*, **369**, 485-496.
18. Bourquin, AF, Suveges, M, Pertin, M, Gilliard, N, Sardy, S, Davison, AC, Spahn, DR & Decosterd, I. (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*, **122**, 14.
19. Boyle, DL, Jones, TL, Hammaker, D, Svensson, CI, Rosengren, S, Albani, S, Sorkin, L & Firestein, GS. (2006). Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med*, **3**, e338.

20. Brach, MA, Riedel, D & Herrmann, F. (1990). Induction of monocytic differentiation and modulation of the expression of c-fos, c-fms and c-myc protooncogenes in human monoblasts by cytokines and phorbol ester. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **59**, 54-58.
21. Brenner, CA, Adler, RR, Rappolee, DA, Pedersen, RA & Werb, Z. (1989). Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev*, **3**, 848-859.
22. Calvo, M & Bennett, DL. (2012). The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol*, **234**, 271-282.
23. Casals-Diaz, L, Vivo, M & Navarro, X. (2009). Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. *Exp Neurol*, **217**, 84-95.
24. Ceron, CS, Rizzi, E, Guimaraes, DA, Martins-Oliveira, A, Cau, SB, Ramos, J, Gerlach, RF & Tanus-Santos, JE. (2012). Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol*, **31**, 261-270.
25. Chacur, M, Matos, RJ, Alves, AS, Rodrigues, AC, Gutierrez, V, Cury, Y & Britto, LR. (2010). Participation of neuronal nitric oxide synthase in experimental neuropathic pain induced by sciatic nerve transection. *Braz J Med Biol Res*, **43**, 367-376.
26. Chang, RC, Chiu, K, Ho, YS & So, KF. (2009). Modulation of neuroimmune responses on glia in the central nervous system: implication in therapeutic intervention against neuroinflammation. *Cell Mol Immunol*, **6**, 317-326.
27. Chang, YW, Tan, A, Saab, C & Waxman, S. (2010). Unilateral focal burn injury is followed by long-lasting bilateral allodynia and neuronal hyperexcitability in spinal cord dorsal horn. *J Pain*, **11**, 119-130.
28. Chaplan, SR, Bach, FW, Pogrel, JW, Chung, JM & Yaksh, TL. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, **53**, 55-63.
29. Chattopadhyay, S, Myers, RR, Janes, J & Shubayev, V. (2007). Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun*, **21**, 561-568.

30. Chen, J, Liao, MY, Gao, XL, Zhong, Q, Tang, TT, Yu, X, Liao, YH & Cheng, X. (2013). IL-17A Induces Pro-Inflammatory Cytokines Production in Macrophages via MAPKinases, NF-kappaB and AP-1. *Cell Physiol Biochem*, **32**, 1265-1274.
31. Clark, AK, Gentry, C, Bradbury, EJ, McMahon, SB & Malcangio, M. (2007a). Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain*, **11**, 223-230.
32. Clark, AK, Old, EA & Malcangio, M. (2013). Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*, **6**, 803-814.
33. Clark, AK, Yip, PK, Grist, J, Gentry, C, Staniland, AA, Marchand, F, Dehvari, M, Wotherspoon, G, Winter, J, Ullah, J, Bevan, S & Malcangio, M. (2007b). Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10655-10660.
34. Coggeshall, RE. (2005). Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol*, **77**, 299-352.
35. Coggeshall, RE, Tate, S & Carlton, SM. (2004). Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett*, **355**, 45-48.
36. Coyle, DE. (1998). Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia*, **23**, 75-83.
37. Cunha, FQ, Poole, S, Lorenzetti, BB & Ferreira, SH. (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **107**, 660-664.
38. Cunha, TM, Verri, WA, Jr., Schivo, IR, Napimoga, MH, Parada, CA, Poole, S, Teixeira, MM, Ferreira, SH & Cunha, FQ. (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol*, **83**, 824-832.
39. Cunha, TM, Verri, WA, Jr., Silva, JS, Poole, S, Cunha, FQ & Ferreira, SH. (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1755-1760.

40. Cury, Y, Picolo, G, Gutierrez, VP & Ferreira, SH. (2011). Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide*, **25**, 243-254.
41. Dass, CR & Choong, PF. (2008). C-jun: pharmaceutical target for DNzyme therapy of multiple pathologies. *Pharmazie*, **63**, 411-414.
42. Davis, RJ. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-252.
43. De, AJ, Clayton, NM, Collins, SD, Colthup, P, Chessell, I & Knowles, RG. (2006). GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, **120**, 170-181.
44. Decosterd, I & Woolf, CJ. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, **87**, 149-158.
45. DeLeo, JA & Yezierski, RP. (2001). The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*, **90**, 1-6.
46. Dev, R, Srivastava, PK, Iyer, JP, Dastidar, SG & Ray, A. (2010). Therapeutic potential of matrix metalloprotease inhibitors in neuropathic pain. *Expert Opin Investig Drugs*, **19**, 455-468.
47. Dixon, WJ. (1991). Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev*, **15**, 47-50.
48. Dolan, S, Field, LC & Nolan, AM. (2000). The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain*, **86**, 311-320.
49. Dominguez, E, Rivat, C, Pommier, B, Mauborgne, A & Pohl, M. (2008). JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem*, **107**, 50-60.
50. Dworkin, RH, O'Connor, AB, Audette, J, Baron, R, Gourlay, GK, Haanpaa, ML, Kent, JL, Krane, EJ, Lebel, AA, Levy, RM, Mackey, SC, Mayer, J, Miaskowski, C, Raja, SN, Rice, AS, Schmader, KE, Stacey, B, Stanos, S, Treede, RD, Turk, DC, Walco, GA & Wells, CD. (2010). Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, **85**, S3-14.

51. Eferl, R, Hasselblatt, P, Rath, M, Popper, H, Zenz, R, Komnenovic, V, Idarraga, MH, Kenner, L & Wagner, EF. (2008). Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10525-10530.
52. Eferl, R & Wagner, EF. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **3**, 859-868.
53. Erichsen, HK & Blackburn-Munro, G. (2002). Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Pain*, **98**, 151-161.
54. Esplugues, JV. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol*, **135**, 1079-1095.
55. Fanjul, A, Dawson, MI, Hobbs, PD, Jong, L, Cameron, JF, Harlev, E, Graupner, G, Lu, XP & Pfahl, M. (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*, **372**, 107-111.
56. Ferreira, SH, Ferrari, LF, Cunha, TM, Nascimento, PG, Verri, WA, Jr. & Cunha, FQ. (2009). Dor Inflamatória. In *Dor - Princípios e prática*. ed. Artmed.
57. Ferreira, SH, Lorenzetti, BB & Poole, S. (1993). Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **110**, 1227-1231.
58. Foletta, VC, Segal, DH & Cohen, DR. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol*, **63**, 139-152.
59. Foletta, VC, Sonobe, MH, Suzuki, T, Endo, T, Iba, H & Cohen, DR. (1994). Cloning and characterisation of the mouse fra-2 gene. *Oncogene*, **9**, 3305-3311.
60. Frankowski, H, Gu, YH, Heo, JH, Milner, R & Del Zoppo, GJ. (2012). Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol*, **814**, 221-233.
61. Gabay, E, Wolf, G, Shavit, Y, Yirmiya, R & Tal, M. (2011). Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury. *Eur J Pain*, **15**, 242-248.

62. Gao, YJ. (2010). Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain.
63. Gao, YJ & Ji, RR. (2009). c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J*, **2**, 11-17.
64. Gao, YJ & Ji, RR. (2010a). Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther*, **126**, 56-68.
65. Gao, YJ & Ji, RR. (2010b). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, **7**, 482-493.
66. Gao, YJ, Zhang, L, Samad, OA, Suter, MR, Yasuhiko, K, Xu, ZZ, Park, JY, Lind, AL, Ma, Q & Ji, RR. (2009). JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci*, **29**, 4096-4108.
67. Glover, JN & Harrison, SC. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-261.
68. Gold, MS, Levine, JD & Correa, AM. (1998). Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci*, **18**, 10345-10355.
69. Gosselin, RD, Suter, MR, Ji, RR & Decosterd, I. (2010). Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*, **16**, 519-531.
70. Guha, M & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, **13**, 85-94.
71. Guma, M, Hammaker, D, Topolewski, K, Corr, M, Boyle, DL, Karin, M & Firestein, GS. (2012). Antiinflammatory functions of p38 in mouse models of rheumatoid arthritis: advantages of targeting upstream kinases MKK-3 or MKK-6. *Arthritis Rheum*, **64**, 2887-2895.
72. Guo, W, Wang, H, Watanabe, M, Shimizu, K, Zou, S, LaGraize, SC, Wei, F, Dubner, R & Ren, K. (2007). Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci*, **27**, 6006-6018.
73. Hald, A, Nedergaard, S, Hansen, RR, Ding, M & Heegaard, AM. (2009). Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain*, **13**, 138-145.

74. Hall, MC, Young, DA, Waters, JG, Rowan, AD, Chantry, A, Edwards, DR & Clark, IM. (2003). The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*, **278**, 10304-10313.
75. Hansen, RR & Malcangio, M. (2013). Astrocytes--multitaskers in chronic pain. *Eur J Pharmacol*, **716**, 120-128.
76. Hao, S, Mata, M, Glorioso, JC & Fink, DJ. (2007). Gene transfer to interfere with TNFalpha signaling in neuropathic pain. *Gene Ther*, **14**, 1010-1016.
77. Haslinger, A & Karin, M. (1985). Upstream promoter element of the human metallothionein-IIA gene can act like an enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8572-8576.
78. Hathway, GJ, Vega-Avelaira, D, Moss, A, Ingram, R & Fitzgerald, M. (2009). Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates. *Pain*, **144**, 110-118.
79. Herbein, G, Varin, A & Fulop, T. (2006). NF-kappaB, AP-1, Zinc-deficiency and aging. *Biogerontology*, **7**, 409-419.
80. Hess, J, Angel, P & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, **117**, 5965-5973.
81. Hilberg, F, Aguzzi, A, Howells, N & Wagner, EF. (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, **365**, 179-181.
82. Honore, P, Rogers, SD, Schwei, MJ, Salak-Johnson, JL, Luger, NM, Sabino, MC, Clohisy, DR & Mantyh, PW. (2000). Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*, **98**, 585-598.
83. Hsu, YC, Wang, LF, Chien, YW & Lee, WR. (2007). Induction of TIMP-1 and HSP47 synthesis in primary keloid fibroblasts by exogenous nitric oxide. *J Dermatol Sci*, **45**, 37-44.
84. Hu, E, Mueller, E, Oliviero, S, Papaioannou, VE, Johnson, R & Spiegelman, BM. (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene

- expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J*, **13**, 3094-3103.
85. Huang, C, Ma, WY, Dawson, MI, Rincon, M, Flavell, RA & Dong, Z. (1997). Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5826-5830.
 86. Hunt, SP, Pini, A & Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, **328**, 632-634.
 87. International Association for the Study of Pain. (2013). Classification of Chronic Pain.
 88. Intondi, AB, Dahlgren, MN, Eilers, MA & Taylor, BK. (2008). Intrathecal neuropeptide Y reduces behavioral and molecular markers of inflammatory or neuropathic pain. *Pain*, **137**, 352-365.
 89. Jeong, YH, Hyun, JW, Kim Van, LT, Kim, DH & Kim, HS. (2013). Kalopanaxsaponin A Exerts Anti-Inflammatory Effects in Lipopolysaccharide-Stimulated Microglia via Inhibition of JNK and NF-kappaB/AP-1 Pathways. *Biomol Ther (Seoul)*, **21**, 332-337.
 90. Ji, RR, Baba, H, Brenner, GJ & Woolf, CJ. (1999). Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci*, **2**, 1114-1119.
 91. Ji, RR, Gereau, RW, Malcangio, M & Strichartz, GR. (2009). MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*, **60**, 135-148.
 92. Ji, RR, Kawasaki, Y, Zhuang, ZY, Wen, YR & Decosterd, I. (2006). Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol*, **2**, 259-269.
 93. Ji, RR, Kohno, T, Moore, KA & Woolf, CJ. (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, **26**, 696-705.
 94. Ji, RR & Suter, MR. (2007). p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain*, **3**, 33.
 95. Jin, SX, Zhuang, ZY, Woolf, CJ & Ji, RR. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord

- microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci*, **23**, 4017-4022.
96. Jin, X & Gereau, RW. (2006). Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*, **26**, 246-255.
 97. Jochum, W, Passegue, E & Wagner, EF. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, **20**, 2401-2412.
 98. Jonat, C, Rahmsdorf, HJ, Park, KK, Cato, AC, Gebel, S, Ponta, H & Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, **62**, 1189-1204.
 99. Jones, AK, al-Janabi, MA, Solanki, K, Sobnack, R, Greenwood, A, Doyle, DV, Britton, KE & Huskisson, EC. (1991). In vivo leukocyte migration in arthritis. *Arthritis Rheum*, **34**, 270-275.
 100. Julius, D & Basbaum, AI. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-210.
 101. Kaczmarek, L, Lapinska-Dzwonek, J & Szymczak, S. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J*, **21**, 6643-6648.
 102. Kalso, E, Edwards, JE, Moore, RA & McQuay, HJ. (2004). Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain*, **112**, 372-380.
 103. Kandel ER, Schwartz JH & Jessel TM. (2000). The perception of pain. In *Principles of neural science*. ed. MacGraw-Hill. pp. 472-491. EUA.
 104. Karin, M. (1990). Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol*, **2**, 126-131.
 105. Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **270**, 16483-16486.
 106. Karin, M. (1996). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**, 127-134.
 107. Karin, M, Haslinger, A, Heguy, A, Dietlin, T & Cooke, T. (1987). Metal-responsive elements act as positive modulators of human metallothionein-IIA enhancer activity. *Mol Cell Biol*, **7**, 606-613.

108. Karin, M, Liu, Z & Zandi, E. (1997a). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
109. Karin, M, Liu, Z & Zandi, E. (1997b). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
110. Kawasaki, Y, Xu, ZZ, Wang, X, Park, JY, Zhuang, ZY, Tan, PH, Gao, YJ, Roy, K, Corfas, G, Lo, EH & Ji, RR. (2008a). Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*, **14**, 331-336.
111. Kawasaki, Y, Zhang, L, Cheng, JK & Ji, RR. (2008b). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*, **28**, 5189-5194.
112. Kim, CF & Moalem-Taylor, G. (2011). Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. *J Pain*, **12**, 370-383.
113. Kim, S & Iwao, H. (2003). Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *J Pharmacol Sci*, **91**, 177-181.
114. Kimelberg, HK. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, **45**, 191-202.
115. Kobayashi, H, Chattopadhyay, S, Kato, K, Dolkas, J, Kikuchi, S, Myers, RR & Shubayev, VI. (2008). MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol Cell Neurosci*, **39**, 619-627.
116. Kumar, S, Boehm, J & Lee, JC. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 717-726.
117. Lakhan, SE & Avramut, M. (2012). Matrix metalloproteinases in neuropathic pain and migraine: friends, enemies, and therapeutic targets. *Pain Res Treat*, **2012**, 952906.
118. Latchman, DS. (1997). Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1305-1312.

119. Lee, JY, Choi, DC, Oh, TH & Yune, TY. (2013). Analgesic effect of acupuncture is mediated via inhibition of JNK activation in astrocytes after spinal cord injury. *PLoS One*, **8**, e73948.
120. Lee, TI & Young, RA. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, **34**, 77-137.
121. Lee, W, Haslinger, A, Karin, M & Tjian, R. (1987a). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, **325**, 368-372.
122. Lee, W, Mitchell, P & Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **49**, 741-752.
123. Leppert, D, Lindberg, RL, Kappos, L & Leib, SL. (2001). Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev*, **36**, 249-257.
124. Liu, H, Mantyh, PW & Basbaum, AI. (1997). NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature*, **386**, 721-724.
125. Liu, Y, Ludes-Meyers, J, Zhang, Y, Munoz-Medellin, D, Kim, HT, Lu, C, Ge, G, Schiff, R, Hilsenbeck, SG, Osborne, CK & Brown, PH. (2002). Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene*, **21**, 7680-7689.
126. Loeser, JD. (1980). Perspectives on pain. In *Proceedings of the First World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics*. pp. 316-345. London.
127. Loeser, JD & Melzack, R. (1999). Pain: an overview. *Lancet*, **353**, 1607-1609.
128. Manassero, G, Repetto, IE, Cobiañchi, S, Valsecchi, V, Bonny, C, Rossi, F & Vercelli, A. (2012). Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol Pain*, **8**, 39.
129. Manjavachi, MN, Costa, R, Quintao, NL & Calixto, JB. (2013). The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*, **79C**, 17-27.

130. Marchand, F, Tsantoulas, C, Singh, D, Grist, J, Clark, AK, Bradbury, EJ & McMahon, SB. (2009). Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain*, **13**, 673-681.
131. Marks-Konczałik, J, Chu, SC & Moss, J. (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem*, **273**, 22201-22208.
132. Martin, T, Cardarelli, PM, Parry, GC, Felts, KA & Cobb, RR. (1997). Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol*, **27**, 1091-1097.
133. McMahon, SB, Cafferty, WB & Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol*, **192**, 444-462.
134. Meller, ST & Gebhart, GF. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, **52**, 127-136.
135. Meller, ST, Pechman, PS, Gebhart, GF & Maves, TJ. (1992). Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, **50**, 7-10.
136. Meng, X, Zhang, Y, Lao, L, Saito, R, Li, A, Backman, CM, Berman, BM, Ren, K, Wei, PK & Zhang, RX. (2013). Spinal interleukin-17 promotes thermal hyperalgesia and NMDA NR1 phosphorylation in an inflammatory pain rat model. *Pain*, **154**, 294-305.
137. Merskey, H. (1994). Logic, truth and language in concepts of pain. *Qual Life Res*, **3 Suppl 1**, S69-S76.
138. Mertens, M & Singh, JA. (2009). Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*, **36**, 1118-1125.
139. Mika, J, Korostynski, M, Kaminska, D, Wawrzczak-Bargiela, A, Osikowicz, M, Makuch, W, Przewlocki, R & Przewlocka, B. (2008). Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model. *Pain*, **138**, 587-597.
140. Mika, J, Zychowska, M, Popielek-Barczyk, K, Rojewska, E & Przewlocka, B. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*.

141. Millan, MJ. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, **57**, 1-164.
142. Milligan, ED, O'Connor, KA, Nguyen, KT, Armstrong, CB, Twining, C, Gaykema, RP, Holguin, A, Martin, D, Maier, SF & Watkins, LR. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci*, **21**, 2808-2819.
143. Milligan, ED, Twining, C, Chacur, M, Biedenkapp, J, O'Connor, K, Poole, S, Tracey, K, Martin, D, Maier, SF & Watkins, LR. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci*, **23**, 1026-1040.
144. Milligan, ED & Watkins, LR. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 23-36.
145. Mitchell, RL, Henning-Chubb, C, Huberman, E & Verma, IM. (1986). c-fos expression is neither sufficient nor obligatory for differentiation of monomyelocytes to macrophages. *Cell*, **45**, 497-504.
146. Murphy, G & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, **29**, 290-308.
147. Nikolov, DB & Burley, SK. (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 15-22.
148. Noback CR, Strominger NL & Dmarest RJ. (1996). The human nervous system: structure and function. Pain and temperature. ed. Williams & Wilkins. pp. 126-137. New York.
149. Noble, LJ, Donovan, F, Igarashi, T, Goussev, S & Werb, Z. (2002). Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci*, **22**, 7526-7535.
150. Noma, N, Khan, J, Chen, IF, Markman, S, Benoliel, R, Hadlaq, E, Imamura, Y & Eliav, E. (2011). Interleukin-17 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. *Neurosci Lett*, **493**, 86-91.
151. Obata, K, Yamanaka, H, Kobayashi, K, Dai, Y, Mizushima, T, Katsura, H, Fukuoka, T, Tokunaga, A & Noguchi, K. (2004). Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for

- mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci*, **24**, 10211-10222.
152. Ohtori, S, Takahashi, K, Moriya, H & Myers, RR. (2004). TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976)*, **29**, 1082-1088.
 153. Old, EA & Malcangio, M. (2012). Chemokine mediated neuron-glia communication and aberrant signalling in neuropathic pain states. *Curr Opin Pharmacol*, **12**, 67-73.
 154. Papir-Kricheli, D, Frey, J, Laufer, R, Gilon, C, Chorev, M, Selinger, Z & Devor, M. (1987). Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain*, **31**, 263-276.
 155. Pappu, R, Ramirez-Carrozzi, V, Ota, N, Ouyang, W & Hu, Y. (2010). The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol*, **30**, 185-195.
 156. Parks, WC, Wilson, CL & Lopez-Boado, YS. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **4**, 617-629.
 157. Pautz, A, Art, J, Hahn, S, Nowag, S, Voss, C & Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, **23**, 75-93.
 158. Perkins, ND. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*, **12**, 121-132.
 159. Pinto, LG, Cunha, TM, Vieira, SM, Lemos, HP, Verri, WA, Jr., Cunha, FQ & Ferreira, SH. (2010). IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*, **148**, 247-256.
 160. Proffitt, J, Crabtree, G, Grove, M, Daubersies, P, Bailleul, B, Wright, E & Plumb, M. (1995). An ATF/CREB-binding site is essential for cell-specific and inducible transcription of the murine MIP-1 beta cytokine gene. *Gene*, **152**, 173-179.
 161. Purwata, TE. (2011). High TNF-alpha plasma levels and macrophages iNOS and TNF-alpha expression as risk factors for painful diabetic neuropathy. *J Pain Res*, **4**, 169-175.

162. Ra, HJ & Parks, WC. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*, **26**, 587-596.
163. Raghavendra, V, Tanga, F & DeLeo, JA. (2003a). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 624-630.
164. Raghavendra, V, Tanga, F, Rutkowski, MD & DeLeo, JA. (2003b). Anti-hyperalgesic and morphine-sparing actions of propentofylline following peripheral nerve injury in rats: mechanistic implications of spinal glia and proinflammatory cytokines. *Pain*, **104**, 655-664.
165. Raivich, G & Behrens, A. (2006). Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol*, **78**, 347-363.
166. Raivich, G, Bohatschek, M, Da, CC, Iwata, O, Galiano, M, Hristova, M, Nateri, AS, Makwana, M, Riera-Sans, L, Wolfer, DP, Lipp, HP, Aguzzi, A, Wagner, EF & Behrens, A. (2004). The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron*, **43**, 57-67.
167. Reale, M, De Lutiis, MA, Patruno, A, Speranza, L, Felaco, M, Grilli, A, Macri, MA, Comani, S, Conti, P & Di, LS. (2006). Modulation of MCP-1 and iNOS by 50-Hz sinusoidal electromagnetic field. *Nitric Oxide*, **15**, 50-57.
168. REXED, B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*, **100**, 297-379.
169. Richner, M, Bjerrum, OJ, Nykjaer, A & Vaegter, CB. (2011). The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. *J Vis Exp*.
170. Ridnour, LA, Windhausen, AN, Isenberg, JS, Yeung, N, Thomas, DD, Vitek, MP, Roberts, DD & Wink, DA. (2007). Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16898-16903.
171. Riera-Sans, L & Behrens, A. (2007). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell development by the activator protein 1 transcription factor c-Jun. *J Immunol*, **178**, 5690-5700.
172. Roeder, RG. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-335.

173. Rohl, C, Lucius, R & Sievers, J. (2007). The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res*, **1129**, 43-52.
174. Rylski, M & Kaczmarek, L. (2004). Ap-1 targets in the brain. *Front Biosci*, **9**, 8-23.
175. Schafers, M, Lee, DH, Brors, D, Yaksh, TL & Sorkin, LS. (2003). Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci*, **23**, 3028-3038.
176. Schaible, HG & Schmidt, RF. (1988). Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol*, **60**, 2180-2195.
177. Schnegg, CI, Kooshki, M, Hsu, FC, Sui, G & Robbins, ME. (2012). PPARdelta prevents radiation-induced proinflammatory responses in microglia via transrepression of NF-kappaB and inhibition of the PKCalpha/MEK1/2/ERK1/2/AP-1 pathway. *Free Radic Biol Med*, **52**, 1734-1743.
178. Schneider, SP & Perl, ER. (1994). Synaptic mediation from cutaneous mechanical nociceptors. *J Neurophysiol*, **72**, 612-621.
179. Schoeniger-Skinner, DK, Ledeboer, A, Frank, MG, Milligan, ED, Poole, S, Martin, D, Maier, SF & Watkins, LR. (2007). Interleukin-6 mediates low-threshold mechanical allodynia induced by intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Brain Behav Immun*, **21**, 660-667.
180. Schonthaler, HB, Guinea-Viniegra, J & Wagner, EF. (2011a). Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis*, **70 Suppl 1**, i109-i112.
181. Schonthaler, HB, Guinea-Viniegra, J & Wagner, EF. (2011b). Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis*, **70 Suppl 1**, i109-i112.
182. Schule, R, Rangarajan, P, Kliwer, S, Ransone, LJ, Bolado, J, Yang, N, Verma, IM & Evans, RM. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, **62**, 1217-1226.
183. Segond von, BG, Boettger, MK, Konig, C, Iwakura, Y, Brauer, R & Schaible, HG. (2013). Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not

- TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. *Mol Cell Neurosci*, **52**, 152-160.
184. Sekine-Aizawa, Y, Hama, E, Watanabe, K, Tsubuki, S, Kanai-Azuma, M, Kanai, Y, Arai, H, Aizawa, H, Iwata, N & Saido, TC. (2001). Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *Eur J Neurosci*, **13**, 935-948.
 185. Sharp, FR. (1994). The sense of antisense fos oligonucleotides. *Ann Neurol*, **36**, 555-556.
 186. Sheng, M, Thompson, MA & Greenberg, ME. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, **252**, 1427-1430.
 187. Shields, SD, Eckert, WA, III & Basbaum, AI. (2003). Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain*, **4**, 465-470.
 188. Shigemori, Y, Katayama, Y, Mori, T, Maeda, T & Kawamata, T. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl*, **96**, 130-133.
 189. Smeal, T, Angel, P, Meek, J & Karin, M. (1989). Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev*, **3**, 2091-2100.
 190. Sommer, C & Kress, M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, **361**, 184-187.
 191. Sotgiu, ML & Biella, G. (2000). Contribution of central sensitization to the pain-related abnormal activity in neuropathic rats. *Somatosens Mot Res*, **17**, 32-38.
 192. Stuesse, SL, Crisp, T, McBurney, DL, Schechter, JB, Lovell, JA & Cruce, WL. (2001). Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. *Exp Brain Res*, **137**, 219-227.
 193. Suzuki, T, Okuno, H, Yoshida, T, Endo, T, Nishina, H & Iba, H. (1991). Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5537-5542.

194. Svensson, CI, Schafers, M, Jones, TL, Powell, H & Sorkin, LS. (2005). Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett*, **379**, 209-213.
195. Sweitzer, S, Martin, D & DeLeo, JA. (2001). Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, **103**, 529-539.
196. Szklarczyk, A, Lapinska, J, Rylski, M, McKay, RD & Kaczmarek, L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci*, **22**, 920-930.
197. Taiwo, YO, Bjerknes, LK, Goetzl, EJ & Levine, JD. (1989). Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, **32**, 577-580.
198. Taktak, YS, Selkirk, S, Bristow, AF, Carpenter, A, Ball, C, Rafferty, B & Poole, S. (1991). Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J Pharm Pharmacol*, **43**, 578-582.
199. Tanga, FY, Raghavendra, V & DeLeo, JA. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int*, **45**, 397-407.
200. Terayama, R, Fujisawa, N, Yamaguchi, D, Omura, S, Ichikawa, H & Sugimoto, T. (2011). Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury. *Neurosci Res*, **69**, 100-110.
201. Terayama, R, Omura, S, Fujisawa, N, Yamaai, T, Ichikawa, H & Sugimoto, T. (2008). Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. *Neuroscience*, **153**, 1245-1255.
202. Thacker, MA, Clark, AK, Bishop, T, Grist, J, Yip, PK, Moon, LD, Thompson, SW, Marchand, F & McMahon, SB. (2009). CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*, **13**, 263-272.
203. Treisman, R. (1992). The serum response element. *Trends Biochem Sci*, **17**, 423-426.

204. Tsai, EY, Jain, J, Pesavento, PA, Rao, A & Goldfeld, AE. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Mol Cell Biol*, **16**, 459-467.
205. Tsuda, M, Inoue, K & Salter, MW. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*, **28**, 101-107.
206. Tsuda, M, Mizokoshi, A, Shigemoto-Mogami, Y, Koizumi, S & Inoue, K. (2004). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*, **45**, 89-95.
207. Vaillant, C, Didier-Bazes, M, Hutter, A, Belin, MF & Thomasset, N. (1999). Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci*, **19**, 4994-5004.
208. Vecil, GG, Larsen, PH, Corley, SM, Herx, LM, Besson, A, Goodyer, CG & Yong, VW. (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res*, **61**, 212-224.
209. Vega-Avelaira, D, Moss, A & Fitzgerald, M. (2007). Age-related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. *Brain Behav Immun*, **21**, 617-623.
210. Vesely, PW, Staber, PB, Hoefler, G & Kenner, L. (2009). Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res*, **682**, 7-12.
211. Wagner, EF. (2001). AP-1--Introductory remarks. *Oncogene*, **20**, 2334-2335.
212. Wagner, EF & Eferl, R. (2005). Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev*, **208**, 126-140.
213. Wagner, EF & Nebreda, AR. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, **9**, 537-549.
214. Wall PD & Melzack R. (1999). Textbook of pain. pp. 59-103.
215. Wall, PD & Gutnick, M. (1974a). Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol*, **43**, 580-593.

216. Wall, PD & Gutnick, M. (1974b). Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature*, **248**, 740-743.
217. Wang, R, King, T, Ossipov, MH, Rossomando, AJ, Vanderah, TW, Harvey, P, Cariani, P, Frank, E, Sah, DW & Porreca, F. (2008a). Persistent restoration of sensory function by immediate or delayed systemic artemin after dorsal root injury. *Nat Neurosci*, **11**, 488-496.
218. Wang, Z, Ma, W, Chabot, JG & Quirion, R. (2009). Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia. *FASEB J*, **23**, 2576-2586.
219. Wang, Z, Wang, J, Li, X, Yuan, Y & Fan, G. (2008b). Interleukin-1 beta of Red nucleus involved in the development of allodynia in spared nerve injury rats. *Exp Brain Res*, **188**, 379-384.
220. Watkins, LR, Hutchinson, MR, Johnston, IN & Maier, SF. (2005). Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. *Trends Neurosci*, **28**, 661-669.
221. Watkins, LR, Hutchinson, MR, Ledeboer, A, Wieseler-Frank, J, Milligan, ED & Maier, SF. (2007). Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*, **21**, 131-146.
222. Watkins, LR, Milligan, ED & Maier, SF. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci*, **24**, 450-455.
223. Wei, F, Guo, W, Zou, S, Ren, K & Dubner, R. (2008). Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation. *J Neurosci*, **28**, 10482-10495.
224. Weiss, C & Bohmann, D. (2004). Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis. *Cell Cycle*, **3**, 111-113.
225. Wen, YR, Suter, MR, Ji, RR, Yeh, GC, Wu, YS, Wang, KC, Kohno, T, Sun, WZ & Wang, CC. (2009). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology*, **110**, 155-165.
226. Wen, YR, Suter, MR, Kawasaki, Y, Huang, J, Pertin, M, Kohno, T, Berde, CB, Decosterd, I & Ji, RR. (2007). Nerve conduction blockade in the sciatic

- nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. *Anesthesiology*, **107**, 312-321.
227. White, FA, Feldman, P & Miller, RJ. (2009). Chemokine signaling and the management of neuropathic pain. *Mol Interv*, **9**, 188-195.
 228. White, FA, Jung, H & Miller, RJ. (2007). Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20151-20158.
 229. White, FA, Sun, J, Waters, SM, Ma, C, Ren, D, Ripsch, M, Steflik, J, Cortright, DN, Lamotte, RH & Miller, RJ. (2005). Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14092-14097.
 230. Wolf, G, Gabay, E, Tal, M, Yirmiya, R & Shavit, Y. (2006). Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. *Pain*, **120**, 315-324.
 231. Woolf, CJ. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, **152**, S2-15.
 232. Woolf, CJ & Mannion, RJ. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, **353**, 1959-1964.
 233. Xie, W, Strong, JA & Zhang, JM. (2009). Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. *Neuroscience*, **160**, 847-857.
 234. Xu, J, Kim, GM, Ahmed, SH, Xu, J, Yan, P, Xu, XM & Hsu, CY. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. *J Neurosci*, **21**, 92-97.
 235. Yamauchi, K, Osuka, K, Takayasu, M, Usuda, N, Nakazawa, A, Nakahara, N, Yoshida, M, Aoshima, C, Hara, M & Yoshida, J. (2006). Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem*, **96**, 1060-1070.

236. Yang-Yen, HF, Chambard, JC, Sun, YL, Smeal, T, Schmidt, TJ, Drouin, J & Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, **62**, 1205-1215.
237. Yashpal, K, Mason, P, McKenna, JE, Sharma, SK, Henry, JL & Coderre, TJ. (1998). Comparison of the effects of treatment with intrathecal lidocaine given before and after formalin on both nociception and Fos expression in the spinal cord dorsal horn. *Anesthesiology*, **88**, 157-164.
238. Yong, VW. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 931-944.
239. Yong, VW, Krekoski, CA, Forsyth, PA, Bell, R & Edwards, DR. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci*, **21**, 75-80.
240. Yong, VW, Power, C, Forsyth, P & Edwards, DR. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 502-511.
241. Yoon, YW, Sung, B & Chung, JM. (1998). Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport*, **9**, 367-372.
242. Yu, F, Kamada, H, Niizuma, K, Endo, H & Chan, PH. (2008). Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **25**, 184-195.
243. Zenz, R, Eferl, R, Kenner, L, Florin, L, Hummerich, L, Mehic, D, Scheuch, H, Angel, P, Tschachler, E & Wagner, EF. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature*, **437**, 369-375.
244. Zenz, R, Eferl, R, Scheinecker, C, Redlich, K, Smolen, J, Schonhaler, HB, Kenner, L, Tschachler, E & Wagner, EF. (2008a). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*, **10**, 201.
245. Zenz, R, Eferl, R, Scheinecker, C, Redlich, K, Smolen, J, Schonhaler, HB, Kenner, L, Tschachler, E & Wagner, EF. (2008b). Activator protein 1

- (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*, **10**, 201.
246. Zhang, H, Chang, M, Hansen, CN, Basso, DM & Noble-Haeusslein, LJ. (2011). Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, **8**, 206-220.
 247. Zhang, J, Shi, XQ, Echeverry, S, Mogil, JS, De, KY & Rivest, S. (2007). Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci*, **27**, 12396-12406.
 248. Zhuang, ZY, Gerner, P, Woolf, CJ & Ji, RR. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*, **114**, 149-159.
 249. Zhuang, ZY, Wen, YR, Zhang, DR, Borsello, T, Bonny, C, Strichartz, GR, Decosterd, I & Ji, RR. (2006). A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci*, **26**, 3551-3560.
 250. Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, **16**, 109-110.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do comitê de ética para experimentação animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 070/2011, sobre o projeto intitulado *“Investigação do papel do fator de transcrição AP-1 na gênese da hipernocicepção inflamatória e neuropática”*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Sérgio Henrique Ferreira** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de junho de 2011.

(We certify that the protocol nº 070/2011, about *“Investigation of role of AP-1 transcriptional factor in inflammatory and neuropathic hypernociception genesis”*, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 06/27/2011.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2011.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício

ANEXO B - Manuscrito

Role of AP-1 transcription factor in neuropathic hypernociception mice model

Rafael Poloni, Miriam das Dores M. Fonseca, Flávia V. Santa-Cecília, Rangel L. Silva, Fernando de Q. Cunha and Sergio H. Ferreira*

Department of Pharmacology of the Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

* Corresponding author: Department of Pharmacology – Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo Av. Bandeirantes 3900 Ribeirão Preto SP Brazil 14049-900. E-mail: shferrei@fmrp.usp.br. Tel: +55 16 36023222.

ABSTRACT

Neuropathic pain results from nerve damage or dysfunction, which is associated to the painful process' chronification. This process may include participation of the inducible genes, which may be modulated by transcription factors, including the activator protein-1 (AP-1), which can structurally be formed by proteins Jun and Fos families. Our hypothesis is that activation of transcription factor AP-1 would contribute for the maintenance of neuropathic pain, by inducing the production/release of pro-inflammatory mediators and extracellular matrix metalloproteinase (MMP), by mitogen-activated protein kinases and glial cells activation in mice spinal cord, which can trigger central sensitization. Thus pharmacological inhibition of AP-1 may be a potential therapeutic strategy for treating neuropathic pain. Female C57BL/6 mouse (20-30 g) were housed in temperature-controlled rooms (22-25 °C) with access to water and food *ad libitum* and 5-12 animals per experimental group were used. All experiments were conducted in accordance with the Ethics Committee of the Ribeirão Preto Medical School (070/2011, University of São Paulo, Brazil). The animals received inhalatory anesthesia (2% isoflurane) and were submitted to an experimental model of neuropathic pain Spared Nerve Injury (SNI). The animals were treated intrathecally (i.t.) with AP-1 inhibitor SR11302 in the dose range of 3-100 $\mu\text{g}\cdot\text{site}^{-1}$ or vehicle (DMSO, tween[®]20 and saline). The mechanical nociceptive evaluation was performed with von Frey filaments. On the seventh day after SNI, after anesthesia, the segment L4-L5 of the spinal cords of animals submitted or not to SNI were removed 3 hours after i.t. injection of the inhibitor of AP-1 (SR11302) or vehicle for evaluating the expression of phosphorylated c-Jun, by immunofluorescence; the expression of messenger RNA (mRNA) of pro-inflammatory mediators, by RT-PCR; the protein expression, by western blotting; the nitrite/nitrate concentration, by Griess reaction and the MMP-2 and MMP-9 expression, by gel zymography. Intrathecal single injection of an inhibitor of AP-1 (SR11302) on day 7 after SNI is enough to attenuated mechanical hypernociception in 3-5 hours after injection. The SNI causes an increase of mRNA expression of activated glial cells markers (Iba1 and GFAP), MAPK's expression (JNK, ERK and p38), pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17A), chemokines (MCP-1 and KC), inducible NO sintase and NO, MMP-2 and MMP-9, compared to the false-operated animals. This increase was attenuated when animals were pretreated (3 hours before) with the AP-1 blocker,

SR11302. This study shows that the inhibition of transcription factor AP-1 may be a potential analgesic/anti-inflammatory for treating neuropathic pain, by reducing the hypernociception and the synthesis of pro-inflammatory mediators.

Keywords: AP-1; Neuropathic hypernociception; Pro-inflammatory mediators; MAPK; c-Jun; glial cells.

INTRODUCTION

Neuropathic pain results from nerve damage or dysfunction and induces plastic changes throughout the nociceptive sensory system, which is associated to the painful process' chronification (1). Neuropathic pain can occur without apparent cause, however, may be secondary to some other condition, such as cancer, diarrhea, herpes zoster, multiple sclerosis, hypoxia, stroke, human immunodeficiency virus etc. (2). The main features of neuropathic pain are hyperalgesia (increased pain sensation to painful stimuli), spontaneous pain and allodynia (pain caused by non-noxious stimuli). These manifestations are associated with spinal changes, with probable sensitization of primary afferent neurons in peripheral and central neurons, a phenomenon called peripheral and central sensitization, respectively (3). The central and peripheral sensitization can be primarily identified primarily on reducing the nociceptive threshold and increased responsiveness of dorsal horn neurons of the spinal cord to various stimuli. Although there are many groups involved in research trying to better understand the pathophysiology of neuropathic pain, this disease is still poorly understood. Consequently, treatment for this disease is very limited, the most effective treatment options for neuropathic pain are the same as years ago. Although few advances in the treatment of neuropathic pain have occurred on the last decade, there has been progress in understanding the pathophysiology of this illness.

In the last two decades, non-neuronal cells such as glia cells, began to be correlated with central sensitization, as well as the pathophysiology of chronic pain., The activated microglia, increases the expression of specific markers such as calcium binding adapter molecule ionized - 1 (Iba1), and release pro-inflammatory factors,

including the pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β), chemokines, cytotoxic compounds (inducible nitric oxide synthase (iNOS), oxygen and nitrogen free radicals) and activation of astrocytes (4-9). Astrocytes are the most abundant and macroglial cells and its activation can be identified by specific marker glial fibrillary acidic protein (GFAP). After noxious stimulation, astrocytes enter a state of activation, to reducing the re-uptake of glutamate and the release of several neurotransmitters in the spinal cord, e.g. pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17A), nitric oxide (NO), chemokine (*keratinocyte-derived chemokine*, KC, monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), prostaglandins, excitatory amino acids, ATP and activating protein kinases (2;10). In addition, nitric oxide regulates the expression of a variety of extracellular matrix-related genes, including those encoding tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and extracellular matrix metalloproteinase (MMP) -9 (11;12).

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) have been considered glial intracellular mediators and are classified into three main types of families of kinases, with distinct pathways: extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase N-terminal c-Jun (JNK) and p38. After the induction of experimental neuropathic pain, there is an increase in the activation of ERK, JNK and p38 in different populations of neurons in the dorsal root ganglion and glial cells (13), contributing, then, to neuron hypersensitivity. These kinases are related to the activation of several transcription factors, e.g. activator protein-1 (AP-1). This transcription factor is involved in the inflammatory process and is the which is structurally formed by protein families Jun, Fos, ATF (activating transcription factor) or MAF (muscular aponeurotic fibrosarcoma) (14;15), arranged as homo- or heterodimers connected by a structure called "leucine zipper" (16). The AP-1 appears to be essential for the maintenance of physiological and pathological condition of the immune system, e.g. psoriasis, where AP-1 seems to determine which cytokine genes are activated, thus, modulating the progression of the disease (17). The activation of AP-1 induces the production of pro-inflammatory cytokines, which can trigger central and peripheral sensitization. Cytokines, for example, IL-1 β and TNF- α , cause central sensitization via activation of sodium channels resistant to tetrodotoxin 1.8, thus reducing the threshold for activation of neurons and facilitating the hypernociception (18;19). However, the role of AP-1 in the maintenance of neuropathic hypernociception is incompletely understood. Our

hypothesis is that activation of transcription factor AP-1 would contribute for the maintenance of neuropathic pain, by inducing the glial cells activation and thereafter the MAPK activation and production/release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17A), chemokines (MCP-1 and KC) and in mice spinal cord, thus pharmacological inhibition of AP-1 may be a potential therapeutic strategy for treating neuropathic pain.

METHODS

Animals

Female C57BL/6 mouse (20-30 g) were housed in temperature-controlled rooms (22-25 °C) with access to water and food *ad libitum* and 5-8 animals per experimental group were used. All experiments were conducted in accordance with the Ethics Committee of the Ribeirão Preto Medical School (070/2011, University of São Paulo, Brazil). The animals received inhalatory anesthesia (2% isoflurane) and were submitted to an experimental model of neuropathic pain Spared Nerve Injury (SNI) (20).

Drug

The animals were treated intrathecally (i.t.) with AP-1 inhibitor SR11302, (*E,E,Z,E*)-3-Methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-n-onatetraenoic acid, in the dose of 100 μ g/site or vehicle (DMSO, tween[®]20 and saline).

Behavioural test

The mechanical nociceptive evaluation was performed with von Frey filaments up and down method as previously described (21).

Biochemistry tests

Seven days after SNI, after anesthesia, the spinal cord (L4-L5 segment) of animals was collected 3 hours after injection of AP-1 inhibitor (SR11302), vehicle, or no injection. The spinal cord was properly processed and used for evaluating the expression of phosphorylated c-Jun, by immunohistochemistry, expression of messenger RNA (mRNA) of Iba1, p38, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17A, KC, MCP-1 and

iNOS, by RT-PCR, the protein expression of GFAP, JNK and ERK, by western blotting, and to assess the estimated amount of nitric oxide, by Griess reaction, the levels of MMP-2 and MMP-9, by gel zymography.

Immunohistochemistry

Animals were terminally anesthetized with isoflurane 2 % and perfused through the ascending aorta with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (4 °C). After the perfusion, spinal cord were removed and postfixed in the same fixative for 2 hours, which was then replaced overnight with 20% saccharose. All of the DRG were embedded in optimum cutting temperature (OCT) OCT, and spinal cord sections (14 µm) were cut in a cryostat and processed for immunofluorescence. All of the sections were blocked with 2% BSA in 0.3% Triton X-100 for 1 hour at RT and incubated for 2 hours at 4 °C with a mixture of polyclonal rabbit anti-phospho-c-Jun (1:100; Cell signaling), polyclonal goat anti-Iba1 (1:300; Millipore), polyclonal goat anti-GFAP Alexa fluor[®] (1:100; eBioscience), Alexa fluor[®] 488 donkey anti-mouse (1:100; Molecular Probes), Alexa fluor[®] 594 goat anti-rabbit (1:400; Invitrogen) antibodies and Hoechst 33342 (1:1000; Sigma). Finally, it was incubated with a mixture of conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Then, the sections were incubated with Hoechst 33342 for 5 min and after washed.

Western blotting analysis

After indicated stimulation, spinal cords were homogenized in a lysis buffer containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Sigma). The protein concentrations of the lysate were determined using aBCAProtein Assay kit (Pierce), and 10 µg (GFAP), 30 µg (JNK and ERK) or 80 µg (iNOS) of protein was loaded for each lane. Protein samples were separated on SDS/PAGE gel (7% gradient gel to iNOS and 12% to GFAP, JNK and ERK; Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech). The filters were blocked with 5% bovine serum albumin and incubated overnight at 4 °C with primary antibody, anti-GFAP (1:5,000; BD), anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (1:1,000; Cell Signaling), anti-SAPK/JNK (1:1,000; Cell Signaling), anti-p-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (1:1,000; Cell Signaling), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (1:1,000; Cell

Signaling), anti-iNOS (1:500; cell signaling). The incubation for 1 hour at room temperature with HRP conjugated secondary antibody (1:20,000; Jackson ImmunoResearch). The blots were visualized in ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech) for 2 min and exposed onto hyperfilms (Amersham Pharmacia Biotech) for 1–30 min. The β -actin expression (1:5,000; Abcam) antibody was used as a loading control.

RT-PCR

The expression of mRNA of Iba1, p38, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17A, MCP-1 and KC in mice spinal cord was determined by RT-PCR. Briefly, mice were killed by decapitation under anesthesia, and the spinal cord (L4-L5 segment) were harvested and left in contact with 10 mL of TRIzol reagent (for 10 min). Reverse transcription was performed with 0.5 μ g of total RNA. The primers used were as follows: Iba1 (sense, 5'-TGAGGAGCCATGAGCCAAAG-3'; antisense, 5'-GCTTCAAGTTTGGACGGCAG-3'), p38 (sense, 5'-AATGCGTCTGACGGGGACACC-3'; antisense, 5'-GACAGCCAGGGGATTGGCACC-3'), TNF- α (sense, 5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3'; antisense, 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'), IL-6 (sense, 5'-TTCCACCCCAATTTCCAAT-3'; antisense, 5'-CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3'), IL-1 β (sense, 5'-CTCGCAGCAGCACATCAA C-3'; antisense, 5'-TGTTTCATCTCGGAGCCTGTAG-3'), IL-17A (sense, 5'-CTCCAGAAGGCCCTCAGACTA-3'; antisense, 5'-GGGTCTTCATTGCGGTGG-3'), MCP-1 (sense, 5'-AGAAGGAATGGGTCCAGACA-3'; antisense, 5'-TCATTTGGTTCCGATCCAG-3') and GAPDH (sense, 5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'; antisense, 5'-CGGCCAAATCCGTTCAC-3'). The expression of GAPDH mRNA was used as an internal control in all samples. The PCR protocol started with 4 min of incubation at 94 °C followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. The final extension was at 72 °C for 10 min as previously described (19).

Determination of spinal cord nitrate + nitrite concentrations - Griess Reaction

Spinal cord samples were collected in tubes and immediately centrifuged at 1000 g for 3 min and aliquots were stored at -70 °C until analysis. Spinal cord nitrate + nitrite concentrations were determined in duplicate by using the Griess reaction as previously described (22) with the following modifications. Briefly, 50 µl of spinal cord supernatant was incubated with the same volume of nitrate reductase buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 10 mM flavin adenine dinucleotide, and 2 units of nitrate reductase/ml) in individual wells of a 96-well plate. Samples were allowed to incubate overnight at 37 °C in the dark. Eighty microlitres of freshly prepared Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) were added to each well and the plate was incubated for an additional 15 min at room temperature. A standard nitrate curve was obtained by incubating sodium nitrate (0.2–200 µM) with the same reductase buffer. The total amount of nitrite recovery was > 96% and absorbances were measured at 540 nm using a microplate reader. The results are reported as µMol of nitrate/nitrite per µg of tissue.

Gel Zymography Assay

Gelatin zymography was performed as previously described (23). Briefly, tissues were homogenized in buffer containing 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 10 mM CaCl₂, 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) and 1 mM NEM (N-ethylmaleimide). These extracts, normalized for protein concentration, were subjected to electrophoresis on 12% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (0.1%). After electrophoresis, the gel was incubated for 1 h at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, followed by further incubation at 37°C for 16 h in Tris–HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM CaCl₂. The gels were fixed with 30% methanol and 10% acetic acid, stained with 0.05% Coomassie brilliant blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands, which were quantified by densitometry using the Molecular Image[®] ChemiDoc[™] XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Inter-gel analysis was possible after normalization of the gelatinolytic activity with an internal standard (fetal calf serum).

Statistical analysis

The results are presented as the means $\pm$ SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test was performed and differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Participation of AP-1 on the SNI-evoked mechanical neuropathic hypernociception

Intrathecal single injection of an inhibitor of AP-1 (SR11302) on day 7 after SNI is enough to attenuated mechanical hypernociception in 3-5 hours after injection (Figure 1; $P < 0.05$). This behavioral result suggests that AP-1 is involved in the maintenance of neuropathic hypernociception.

Effect of AP-1 inhibition on the activated c-jun/AP-1 expression on spinal cord

Analysis by confocal microscopy showed that the spinal cord of mice subjected to experimental model of neuropathic pain (SNI) presented higher activation/phosphorylation of c-Jun compared to false-operated group (p-c-Jun, Figure 2 and Figure 3), and this increase is inhibited by treatment with the inhibitor of AP-1 (p-c-Jun, Figure 2 and Figure 3). Yet, it was possible to identify their location, mostly, nuclear c-Jun activated/phosphorylated (Figure 2 and Figure 3, Merged). However, the cells with nuclear colocalization with phosphorylated c-Jun were not microglia (Figure 2) and astrocytes (Figure 3).

Effect of AP-1 inhibitor on the glial cells activation

In the present study, mRNA expression of Iba1, a marker of microglial activation, is increased in spinal cord of animals submitted to SNI (Figure 4A) and reduced in animals submitted to SNI and treated with AP-1 inhibitor (Figure 4A). Still, the expression of GFAP, a marker of astroglial activation, is increased in animals subjected to SNI (Figure 4B representative image; Figure 4C representative graph).

This increase is blocked when the SNI animals are treated with the inhibitor of AP-1 (Figure 4B representative image; Figure 4C representative graph).

Effect of AP-1 inhibitor on the mitogen-activated protein kinases expression

The SNI model triggers an increase in the expression of the phosphorylated form of JNK (Figure 5A, representative image, Figure 5B, representative plot). This increase was not observed when evaluating total JNK (Figure 5A, representative image, Figure 5C, representative plot). The animals submitted to SNI treated with the inhibitor of AP-1 presented reduction on the phosphorylated JNK expression (Figure 5A, representative image; Figure 5B, representative graph).

Additionally, the results below demonstrate that the experimental model SNI triggers an increased on the phosphorylated ERK1 expression (Figure 6A, representative image; Figure 6B, representative graph) and phosphorylated ERK2 expression (Figure 6A, representative image; Figure 6D, representative graph). However, this increase was not observed when evaluating total ERK1 (Figure 6A, representative image, Figure 6C, representative plot) or total ERK2 (Figure 6A, representative image; Figure 6E, representative plot), respectively. The animals submitted to SNI who were treated with the inhibitor of AP-1 had reduced phosphorylated ERK1 (Figure 6A, representative image, Figure 6B, representative plot) and ERK2 expression reduced (Figure 6A, representative image, Figure 6D, representative plot).

Also, we observed an increase in the p38 mRNA expression in animals submitted to SNI (Figure 7), which was minimized by treatment with inhibitor of AP-1 (Figure 7).

Effect of AP-1 inhibitor on the pro-inflammatory mediators expression

The animals were submitted to SNI had the expression of mRNA of TNF- α (Figure 8A), IL-6 (Figure 8B), IL-1 β (Figure 8C), IL-17A (Figure 8D), KC (Figure 8E), MCP-1 (Figure 8F) and iNOS (Figure 8G) increased in the spinal cord compared to animals false-operated (Sham). This increase does not occur when animals submitted to SNI

are treated with the AP-1 inhibitor. We also observed an increase in nitric oxide concentration in animals submitted to SNI (Figure 8H). This increase was prevented when animals were treated with the AP-1 inhibitor (Figure 8H).

Effect of AP-1 inhibitor on the gelatinases expression

The SNI increased mRNA the MMP-2 (Figure 9A, the representative figure; Figure 9B, representative graph) and MMP-9 (Figure 9C, the representative figure; Figure 9D, representative graph) expression. The animals submitted to SNI treated with the inhibitor of AP-1 had reduced MMP-2 (Figure 9A, representative figure; Figure 9B, representative graph) and MMP-9 (Figure 9C, representative figure; Figure 9D, representative graph) expression reduced.

DISCUSSION

Neuropathic pain is a common condition, usually caused by nerve injury or disorders, drug treatments or disease affecting the somatosensory system, leading to drastic reduction in quality of life and, even, being severely debilitating (24). Therefore, efforts have been made for the better understanding of pathophysiology of neuropathic pain, and, hence, the discovery of new therapeutic targets for treatment of this illness. As a tool to assist in understanding the pathophysiology of neuropathic pain, animal models of neuropathic pain have been used since the early 70s, when Wall and colleagues identified that an injury to the peripheral nerve occasioned distinct pathophysiological mechanisms than those presented by experimental acute pain models (25).

In the present work, the experimental model Spared Nerve Injury (SNI) was used, due to the fact that it is less invasive than many other known models and the response between animals profile has no significant variation. This model causes mechanical hypersensitivity immediately after surgery, which remains for many days, verified by hypernociception and mechanical allodynia (26). SNI also causes thermal hypernociception and allodynia to cold, but changes are not checked at baseline threshold thermal heat, similar to what occurs in humans with neuropathic pain (27). In view of the fact that it mimetises the signs of neuropathic pain in humans, this experimental model of neuropathic pain (SNI) was chosen for this work.

A feature of experimental neuropathic pain is central sensitization, a phenomenon that can be identified mainly with reduced nociceptive threshold and increased responsiveness of dorsal horn neurons of the spinal cord to various stimuli. Central sensitization occurs due to repetitive stimulation of nociceptors, as well as due to plastic changes in neurons and cells involved in nerve transmission and maintenance of neurons, such as glial cells. These changes usually occur under control of transcription factors, for example NF- κ B and AP-1.

It has been described the involvement of AP-1 in gene induction of various inflammatory mediators in some pathologies (28-30). However, little is known about the correlation between AP-1 and neuropathic pain. This study researched, for the first time, the involvement of AP-1 in SNI-induced mechanical hypernociception. Then, pharmacological tool inhibition of AP-1 SR11302, an analog of retinoic acid was used. This drug was chosen among the numerous analogues of retinoic acid inhibitors of AP-1 due to the fact that it has selectivity for inhibition of AP-1 of more than eighty percent without stimulated AP-1-induced gene transactivation. Furthermore, this drug has no significant effect on the retinoic acid response elements, consensus-sequence responsible for the transcriptional induction of retinoic acid (31).

We found that the maintenance of experimental neuropathic pain depends, at least partially, on the involvement of AP-1, being, therefor, a hope for future treatment of neuropathic pain, since currently available treatments are extremely limited. After confirming the involvement of AP-1 in an experimental model of neuropathic pain SNI was standardized to the next experiments with spinal cords collected seven days after SNI and three hours after injection of vehicle or SR11302 without any treatment. The collection of spinal cord three hours after the injection of the drug SR11302 may seem insufficient to inhibit the transcription factor AP-1. However, this transcription factor is fabricated with immediate early genes (IEG), which are expressed transiently, generating mRNA with time reduced half-life (32).

Corroborating this information, the expression of AP-1 is increased one hour after spinal cord injury in rats submitted to an experimental model of neuropathic hypernociception (33). Furthermore, the expression of c-Fos, an IEG and a major component of AP-1, is detected in approximately 30 min to 1 h in the superficial

lamina of the spinal cord after acute intense stimuli such as thermal stimulus, mechanical or chemical (oil mustard, endotoxin, scorpion venom, bee venom) (34).

The drug SR11302 is currently the most widely used experimentally to inhibit AP-1, even though it still has a unknown mechanism of inhibitory action of AP-1 unknown (31). However, this drug is often used *in vitro*, so it is necessary to know if there is actually the inhibition of AP-1 and, also, the dose under experimental conditions used in this study. Although it is still difficult to accurately identify and affirm increase/decrease of AP-1, it can be formed by several combinations of proteins, most studies related increased expression and activation of c-Jun, the main constituent of the dimer AP-1, with increased expression and activation, respectively, of AP-1 (35-37). Therefore, this study confirmed the action of the AP-1 inhibitor, SR11302, by immunofluorescence analysis of phosphorylated c-Jun. Through this technique, it was observed that the SNI promotes seven days after surgery, increased AP-1 activation, as demonstrated by increased activated (phosphorylated) c-Jun. Furthermore, intrathecal injection of the inhibitor of AP-1, SR11302, reduced c-Jun activation, thereby decreased activation of AP-1. The increase in activated/phosphorylated c-Jun had its location in the cell nucleus, which suggests further that c-Jun is activated. In relation to cell location, probably the c-Jun is activated in the nucleus of neurons, given that there was no merged of nuclear phosphorylated c-Jun with Iba1 (microglia marker) or with GFAP (marker for astrocytes). However, the immunofluorescence is not enough to say that there is no involvement of these cells in this model of neuropathic pain.

The activation of glial cells occurs after experimental induction of neuropathic pain, as has been reported, but can also be activated by cytokines, chemokines, neuropeptides etc. (38-40). In the spinal cord, the interruption of homeostasis caused by experimental induction of neuropathic pain becomes resident glial cells (microglia and astrocytes) in the painful condition related cells by morphological changes and release of pain-related mediators (41;42). The microglial activation is characterized by increased expression of different markers, such as CD11b and Iba1, as well as activation of p38 (43;44). Corroborating this information, this study demonstrated that the SNI triggers microglial activation, through increased mRNA expression of Iba1, the microglial marker activity, AP-1 activation-dependent. Activation of microglia in the spinal cord promotes the facilitation of painful stimuli, it releases various

inflammatory mediators such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO, PGE₂, which increases the activation of spinal neurons (42), leading to central sensitization. Microglia also seems to be responsible for the subsequent activation of (45).

Astrocytes are the most abundant cell type in the central nervous system and its activation is observed after experimental induction of neuropathic pain and, also, it is important in maintaining such an environment (39;46). The increased astrocyte activation, measured by specific markers, such as GFAP and S100 β , was observed in various experimental models of neuropathic pain (47-49). This study demonstrated that the SNI caused an increase in the activation of astrocytes by increasing expression of GFAP, a marker of astrocytes activation. The expression of GFAP seems to be induced by several transcription factors, including the AP-1 (50). And this study indicated that AP-1 may be contributing to astrocytic activation, by GFAP transcriptional regulation pathway.

The astroglial activation due to peripheral nerve injury leads to release of pro-inflammatory mediators in the spinal cord and brain, linked to the maintenance of neuropathic pain and the affective-motivational aspects of neuropathic pain, respectively (42). Animals deficient in GFAP had the development of hypersensitivity, following peripheral nerve injury, however, the duration of activation of these cells was shortened (2), corroborating the idea that astrocytes are related to the maintenance of neuropathic pain. Among the mediators released after activation of these cells, there are TNF- α , IL-6, IL-1 β , NO, PG, excitatory amino acids, ATP, which promotes the reduction of the activation threshold of nociceptors, in addition to directly activate neurons, facilitating nerve conduction of pain (42).

In glial cells after experimental injury to the nerve or the spinal cord, it is also observed intense phosphorylation/activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK), which mediate various stages of neuropathic pain (51). After SNL-induced hypernociception, occurs an increase in ERK phosphorylation in the spinal cord in different time (2), p38 phosphorylation in microglia (52) and JNK phosphorylation in astrocytes (53).

Often, the activation of JNK is accompanied by increased expression of c-Jun, the major substrate of this MAPK (53). Not only experimental models of neuropathy induce expression of JNK, but also pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , which induces a transient increase of JNK in astrocytes (54). Furthermore, it is known

that SNL induced JNK activation in astrocytes, heavily contributing to neuropathic hypernociception (55). When this pathway is inhibited by intrathecal injection of a peptide JNK inhibitor, the neuropathic hypernociception is prevented (53). In this study, there was increased expression of JNK activated (phosphorylated), dependent on AP-1 in animals submitted to SNI. The c-Jun, the main component of the dimer AP-1, is the best known substrate of JNK and thus from the time that the AP-1 was inhibited by SR11302 along with inhibiting the activation of c-Jun nuclear, may have been a feedback, where the inhibition of c-Jun/AP-1 not decrease the activation of JNK. Corroborating this affirmative, the level of JNK total was indifferent between the two groups, indicating that the AP-1 did not induce transcription of JNK, but only its activation. Karin *et al.* showed that increased AP-1 activity in response to stimuli that activate JNK, for example, TNF- α or ultraviolet irradiation is due to the increased synthesis of c-Jun and possibly also c-Fos (32). The JNK activation-evoked neuronal sensitization is due, at least in part, to induction of expression in spinal cord astrocytes chemokine MCP-1, which rapidly triggers an increase in central sensitization of excitatory synaptic transmission and ERK activation (55).

After activation of C-fibers, ERK phosphorylation occurs in approximately 1 minute in spinal cord and can be induced by noxious stimuli of cold, heat and mechanical, but not innocuous stimuli (56). The family of ERK is involved in many cellular processes such as proliferation, differentiation, motility, and death. The ERK's also participate in painful processes, including neuropathic pain, which are activated in neurons, microglia and astrocytes (51). Although they are generally characterized by ERK1 and ERK2 with different molecular weights, at least in neuropathic pain, no difference between them is elucidated. The phosphorylated ERK is implicated as a marker of neuronal activation, due to rapid expression after stimuli, for example, capsaicin (57). In this study, it was found that, seven days after SNI, there is increased expression of phosphorylated ERK1 and ERK2 -dependent on the activation of AP-1. Moreover, the expression of total ERK1 or ERK2 is indifferent between groups. The AP-1 induced only likely phosphorylation of ERK1 and ERK2, but not its gene transcription. As one of the main substrates of ERK c-Fos is a major component of the AP-1 inhibition may be c-Fos/AP-1 feedback triggering, reducing the activation of ERK. Besides these MAPK, p38 is also involved in the activation of AP-1 via phosphorylation and activation of upstream transcription factors of the AP-1, as TCF,

ATF2 and MEF2C (15). This is usually MAPK activated by pro-inflammatory cytokines and cellular stress, since the administration of inhibitors of p38 alleviated inflammation and arthritis (58;59). The p38 activation seems to increase TNF- α , PGE₂ and IL-1 β expression and the expression of p38 can be increased in response to various stimuli such as IL-1 β , COX-2 and iNOS (58;60). Intrathecal blockade of the p38 signaling pathway reduces neuropathic hypernociception (52;61-63) together with decreased microglial activation (64), suggesting that p38 activates microglia. In this study, there was increased spinal cord expression of p38 mRNA in SNI-submitted mice, dependent on AP-1 activity. Therefore, this result suggests that AP-1, unlike other MAPK pathway, is induced p38 gene transcription. But this increase being due to stimulation of pro-inflammatory cytokines and obviously mRNA expression can not be reflected in p38 activated.

As seen above, the activation of glial cells as well as activation of MAPK, causes the release of numerous pain-related mediators. Moreover, many of these mediators trigger the activation of glial cells and MAPK making a cycle of cell activation and the release of inflammatory enzymes and mediators. Then, according to the hypothesis of this study, activation of AP-1 was induced by neuropathic pain through activation of glial cells and MAPK, the production and release of pro-inflammatory mediators in the spinal cord, leading to central sensitization, thus contributing to the painful process' chronification. Therefore, different assessments were made to verify the participation of painful-related mediators in the spinal cord of animals submitted to SNI and dependence on them with AP-1.

Pro-inflammatory cytokines are key elements in a painful process, as these results in synthesis/release of other cytokines, chemokines, enzymes, kinases etc. Furthermore, these cytokines contribute to central sensitization, or in the induction and maintenance of pain. In proof of this, studies have shown that intrathecal administration of antagonists of pro-inflammatory TNF- α (65) and IL-1 β (66) or IL-6 (67) attenuated painful behavior in experimental models of neuropathic pain.

In the present study, we observed no increase in TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-17A pro-inflammatory cytokines mRNA expression. This increase was partially prevented in animals treated with the inhibitor of AP-1, suggesting that the production/release of TNF- α , IL-6 IL-1 β and IL-17^a in the spinal cord after SNI is dependent on the activation of AP-1. Intrathecal administration of a blocker of TNF- α reduced

hypernociception in neuropathic rats (68). Cunha *et al.* (69) demonstrating that intraplantar injection of IL-6 in mice triggers hypernociception. When IL-1 β is administered intrathecally, it induces hypernociception and allodynia in rats (66). The IL -17A cytokine participates in several pathologies, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, allergy, asthma, kind of cancers, psoriasis and inflammatory bowel disease (70). The involvement of IL -17A has been shown in different experimental models of neuropathic pain in rats (71).

Not only the pro-inflammatory cytokines are related to neuropathic pain, but also chemokines, cytokines produced in highly specialized cells of the immune and nervous system. Besides its high chemotactic power, chemokines have also been related to central sensitization in neuropathic pain processes through modulation of the electrical activity of neurons by different regulatory pathways , including neurotransmitter release (72). So it is not surprising that many authors found increased expression of KC in the spinal cord of mice after nerve injury (24). Thus, we also found increased expression of KC and MCP-1 mRNA in the spinal cord of animals that submitted to SNI. Previous results showed that KC and MCP-1 participate in hypernociception because when injecting the same in naïve animals, there was hypernociception, since the injection of this cytokine neutralizing antibodies prevents this hypernociception (24). Our results showed that the KC and MCP-1 expression is dependent on the activity of AP-1, therefore, the inhibitor of AP-1 would be an ideal therapy for neuropathic pain.

Inflammatory mediators include not only cytokines but also enzymes, signaling molecules etc. Among these, there is nitric oxide, derived from L-arginine by the action of neuronal and non-neuronal form of NO synthases (73). In several pathological conditions or physical or biological stimuli, the generation of high levels of nitric oxide are associated with iNOS increased expression (74). Here, we had demonstrated that SNI induces the increase in the NO concentration in the spinal cord and the increase in iNOS expression, both dependent on the activity of AP-1, contributing to the central sensitization and facilitation painful process.

In addition, nitric oxide regulates the expression of a variety of extracellular matrix-related genes, including those encoding tissue inhibitor of metalloproteinases- (TIMP-1) and MMP-9 (11;12). MMP-9 is an extracellular matrix metalloproteinase, which has the gelatin as substrate, as well as MMP-2, so they can be called gelatinases.

Gelatinases are enzymes involved in pathological processes such as Alzheimer's disease, cancer and multiple sclerosis (75) and the blocking of MMP's offers neuroprotection and neurological recovery (76;77). In the brain or spinal cord injuries, gelatinases seem to degrade components of basal layer, triggering the disruption of the blood brain barrier, progressive demyelination and neuroinflammatory response (78).

This study showed that the expression of MMP- 2 is higher in SNI group and is dependent on AP -1 activity. Therefore, it is suggested that MMP-2 is involved in AP-1-induced neuropathic process. Furthermore, it was shown that intrathecal injection of MMP-2 or MMP-9 causes neuropathic hypernociception, typical signals such as mechanical hypernociception. In the same study, it was shown that MMP-9 and MMP-2 also cleave pro-IL-1 β to IL-1 β and activates early and late phase, respectively, of experimental neuropathic hypernociception (79). The IL-1 β appears to stimulate the production of MMP-9 in human neurons culture and in brains of mice submitted to trauma (80). In the present study, since these gelatinases increased on the seventh day after SNI three hours after the treatment with AP-1 inhibitor, mRNA expression of these proteins was reduced, coinciding also with the reduction in IL- 1 β mRNA, thus, reducing mechanical hypernociception installed.

Regarding MMP -9 expression, it was observed that MMP increased seven days after SNI and this increase can be prevented by treatment with an inhibitor of AP- 1, suggesting that AP-1 is probably involved in transcriptional induction and activation of MMP- 9. In contrast to MMP-2 which is highly expressed in the spinal cord in DRG in late phase only in an experimental model of neuropathic pain, the expression of MMP-9 in DRG spinal cord at the initial stage increased , contributing to demyelination nerve through degradation of myelin basic protein (79;81). MMP -9 is capable of degrading components of the extracellular matrix of basal layer, contributing to the loss of vascular integrity (82;83), leading to extravasation of typical molecules characteristic of a inflammatory / neuropathic process (81;84).

In view of the above, the experimental model of neuropathic pain studied herein causes activation of MAPK and glial cells in the spinal cord as well as increased expression of various mediators related to pain processes. All these events have shown, at least partially, dependency on the actions of the AP-1 transcription factor.

Thus, an inhibitor of AP-1 and, therefore, its way downstream can be considered as interesting pharmacological target for the treatment of neuropathic pain.

Current treatments for neuropathic pain are only partially effective and additional development is hindered by the incomplete knowledge of how neuropathic pain is induced and maintained. This study shows that the inhibition of transcription factor AP-1 may be a potential analgesic/anti-inflammatory drug for treating neuropathic pain, since AP-1 inhibitor blocks, for a few hours, the mechanical hypernociception triggered by experimental model of neuropathic pain, by reducing glial cells and MAPK activation and reducing the synthesis of inflammatory mediators, interleukins, chemokines, NO, MMP-2 and -9.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sergio R. Rosa and Ieda dos Santos for excellent technical assistance. This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/0983-2). We are also grateful to Marisol Ranucci Cardozo for English language editing of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- (1) Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 2009 Sep;10(9):895-926.
- (2) Mika J, Zychowska M, Popiolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B. Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 2013 Mar 13.
- (3) Baron R, Binder A. [How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept]. *Orthopade* 2004 May;33(5):568-75.
- (4) Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 2005 Feb;28(2):101-7.
- (5) Gao YJ. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. 2010 Apr.
- (6) DeLeo JA, Yezierski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 2001 Feb 1;90(1-2):1-6.
- (7) Hathway GJ, Vega-Avelaira D, Moss A, Ingram R, Fitzgerald M. Brief, low frequency stimulation of rat peripheral C-fibres evokes prolonged microglial-induced central sensitization in adults but not in neonates. *Pain* 2009 Jul;144(1-2):110-8.

- (8) Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:33.
- (9) Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2009 Jan;10(1):23-36.
- (10) Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I. Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist* 2010 Oct;16(5):519-31.
- (11) Hsu YC, Wang LF, Chien YW, Lee WR. Induction of TIMP-1 and HSP47 synthesis in primary keloid fibroblasts by exogenous nitric oxide. *J Dermatol Sci* 2007 Jan;45(1):37-44.
- (12) Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, et al. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Oct 23;104(43):16898-903.
- (13) Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci* 2004 Apr 9;74(21):2643-53.
- (14) Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat Res* 2009 Jul;682(1):7-12.
- (15) Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003 Nov;3(11):859-68.
- (16) Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995 Jan 19;373(6511):257-61.
- (17) Coggeshall RE, Tate S, Carlton SM. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci Lett* 2004 Jan 23;355(1-2):45-8.
- (18) Jin X, Gereau RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 2006 Jan 4;26(1):246-55.
- (19) Vieira SM, Cunha TM, Franca RF, Pinto LG, Talbot J, Turato WM, et al. Joint NOD2/RIPK2 signaling regulates IL-17 axis and contributes to the development of experimental arthritis. *J Immunol* 2012 May 15;188(10):5116-22.
- (20) Shields SD, Eckert WA, III, Basbaum AI. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain* 2003 Oct;4(8):465-70.
- (21) Dixon WJ. Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev* 1991;15(1):47-50.
- (22) Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2010 Jan;36(1):91-4.
- (23) Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J, et al. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol* 2012 May;31(4):261-70.
- (24) Manjavachi MN, Costa R, Quintao NL, Calixto JB. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* 2013 Nov 1;79C:17-27.
- (25) Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 1974 Apr 26;248(5451):740-3.

- (26) Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000 Aug;87(2):149-58.
- (27) Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999 Jun 5;353(9168):1959-64.
- (28) Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonthaler HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):201.
- (29) Rylski M, Kaczmarek L. Ap-1 targets in the brain. *Front Biosci* 2004 Jan 1;9:8-23.
- (30) Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis* 2011 Mar;70 Suppl 1:i109-i112.
- (31) Fanjul A, Dawson MI, Hobbs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E, et al. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 1994 Nov 3;372(6501):107-11.
- (32) Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995 Jul 14;270(28):16483-6.
- (33) Xu J, Kim GM, Ahmed SH, Xu J, Yan P, Xu XM, et al. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. *J Neurosci* 2001 Jan 1;21(1):92-7.
- (34) Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 2005 Dec;77(5):299-352.
- (35) Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 1988 Dec 2;55(5):875-85.
- (36) Allegretto EA, Smeal T, Angel P, Spiegelman BM, Karin M. DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem* 1990 Apr;42(4):193-206.
- (37) Foletta VC, Segal DH, Cohen DR. Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *J Leukoc Biol* 1998 Feb;63(2):139-52.
- (38) Xie W, Strong JA, Zhang JM. Early blockade of injured primary sensory afferents reduces glial cell activation in two rat neuropathic pain models. *Neuroscience* 2009 Jun 2;160(4):847-57.
- (39) Hald A, Nedergaard S, Hansen RR, Ding M, Heegaard AM. Differential activation of spinal cord glial cells in murine models of neuropathic and cancer pain. *Eur J Pain* 2009 Feb;13(2):138-45.
- (40) Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther* 2010 Apr;126(1):56-68.
- (41) Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res* 2013;6:803-14.
- (42) Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* 2010 Dec 15;229(1-2):26-50.
- (43) McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol* 2005 Apr;192(2):444-62.
- (44) Terayama R, Omura S, Fujisawa N, Yamaai T, Ichikawa H, Sugimoto T. Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2008 Jun 2;153(4):1245-55.

- (45) Rohl C, Lucius R, Sievers J. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res* 2007 Jan 19;1129(1):43-52.
- (46) Tanga FY, Raghavendra V, DeLeo JA. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int* 2004 Jul;45(2-3):397-407.
- (47) Stuesse SL, Crisp T, McBurney DL, Schechter JB, Lovell JA, Cruce WL. Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. *Exp Brain Res* 2001 Mar;137(2):219-27.
- (48) Coyle DE. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 1998 May;23(1):75-83.
- (49) Vega-Avelaira D, Moss A, Fitzgerald M. Age-related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. *Brain Behav Immun* 2007 Jul;21(5):617-23.
- (50) Bachetti T, Di ZE, Lantieri F, Caroli F, Regis S, Filocamo M, et al. A novel polymorphic AP-1 binding element of the GFAP promoter is associated with different allelic transcriptional activities. *Ann Hum Genet* 2010 Nov;74(6):506-15.
- (51) Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 2005 Mar;114(1-2):149-59.
- (52) Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 2004 Jan 1;45(1):89-95.
- (53) Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 2006 Mar 29;26(13):3551-60.
- (54) Zhang P, Miller BS, Rosenzweig SA, Bhat NR. Activation of C-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in primary glial cultures. *J Neurosci Res* 1996 Oct 1;46(1):114-21.
- (55) Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* 2009 Apr 1;29(13):4096-108.
- (56) Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 1999 Dec;2(12):1114-9.
- (57) Gao YJ, Ji RR. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J* 2009 Jan 1;2:11-7.
- (58) Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003 Sep;2(9):717-26.
- (59) Boyle DL, Jones TL, Hammaker D, Svensson CI, Rosengren S, Albani S, et al. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med* 2006 Sep;3(9):e338.

- (60) Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 2009 Apr;60(1):135-48.
- (61) Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 2003 May 15;23(10):4017-22.
- (62) Wang Z, Ma W, Chabot JG, Quirion R. Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia. *FASEB J* 2009 Aug;23(8):2576-86.
- (63) Wen YR, Suter MR, Ji RR, Yeh GC, Wu YS, Wang KC, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology* 2009 Jan;110(1):155-65.
- (64) Chang RC, Chiu K, Ho YS, So KF. Modulation of neuroimmune responses on glia in the central nervous system: implication in therapeutic intervention against neuroinflammation. *Cell Mol Immunol* 2009 Oct;6(5):317-26.
- (65) Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, et al. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 2001 Apr 15;21(8):2808-19.
- (66) Mika J, Korostynski M, Kaminska D, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M, Makuch W, et al. Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model. *Pain* 2008 Sep 15;138(3):587-97.
- (67) Schoeniger-Skinner DK, Ledebore A, Frank MG, Milligan ED, Poole S, Martin D, et al. Interleukin-6 mediates low-threshold mechanical allodynia induced by intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Brain Behav Immun* 2007 Jul;21(5):660-7.
- (68) Marchand F, Tsantoulas C, Singh D, Grist J, Clark AK, Bradbury EJ, et al. Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain* 2009 Aug;13(7):673-81.
- (69) Cunha TM, Verri WA, Jr., Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Feb 1;102(5):1755-60.
- (70) Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J Clin Immunol* 2010 Mar;30(2):185-95.
- (71) Noma N, Khan J, Chen IF, Markman S, Benoliel R, Hadlaq E, et al. Interleukin-17 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2011 Apr 15;493(3):86-91.
- (72) White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 18;104(51):20151-8.
- (73) Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 2002 Mar;135(5):1079-95.
- (74) Reale M, De Lutiis MA, Patruno A, Speranza L, Felaco M, Grilli A, et al. Modulation of MCP-1 and iNOS by 50-Hz sinusoidal electromagnetic field. *Nitric Oxide* 2006 Aug;15(1):50-7.
- (75) Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 1998 Feb;21(2):75-80.

- (76) Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci* 2002 Sep 1;22(17):7526-35.
- (77) Yu F, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2008 Mar;25(3):184-95.
- (78) Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2006;96:130-3.
- (79) Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med* 2008 Mar;14(3):331-6.
- (80) Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, et al. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 2000 Jul 15;61(2):212-24.
- (81) Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun* 2007 Jul;21(5):561-8.
- (82) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980 Mar 6;284(5751):67-8.
- (83) Gijbels K, Galardy RE, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 1994 Dec;94(6):2177-82.
- (84) Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Banik NL, Lee WA, Perot PL, Jr. Alteration of thromboxane and prostacyclin levels in experimental spinal cord injury. *Neurology* 1985 Jul;35(7):1003-9.

LEGENDS

Figure 1: Effect of post-treatment with a single injection of AP-1 inhibitor in SNI-induced neuropathic hypernociception. C57BL/6 mice were submitted (SNI) or not (Sham) to SNI and submitted to nociceptive mechanical evaluation by von Frey filaments. The mice were given intrathecal injection (indicated by the red arrow) of vehicle (Sham and SNI) or 100 $\mu\text{g} \cdot \text{site}^{-1}$ of SR11302 only on the seventh day after SNI. This animals were subjected to analysis of mechanical nociception immediately prior to surgery and 5, 7 (0, 1, 3, 5 and 7 h), 8, 12 and 14 days after SNI. The results were expressed as the mean $\pm$ SEM of 7 animals per group. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ and § $P < 0.001$ vs. SNI vehicle-treated group.

Figure 2: Effect of inhibiting AP-1 activation of c-Jun in microglia. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-

operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naive). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g}.\text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l}.\text{site}^{-1}$) or no injection (Naive). Three hours after injection, spinal cord (L4-L5 segment) was collected for immunofluorescence (confocal image). The images demonstrate immunoreactivity microglia through the anti-Iba1 (green, left column) to nucleus through Hoechst (blue, middle left column), phosphorylated c-Jun (p-c-Jun) through the anti-p-c-Jun (red, middle right column) and merged of these markings (right column). Arrows indicate double colocalization (purple). Scale bars 50 μm .

Figure 3: Effect of inhibiting AP-1 activation of c-Jun in astrocytes. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naive). On the seventh day after SNI, the animals were injected with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g}.\text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l}.\text{site}^{-1}$) or no injection (Naive). Three hours after injection, spinal cord (L4-L5 segment) was collected for immunofluorescence (confocal image). The images demonstrate immunoreactivity astrocytes through the anti-GFAP (green, left column) to nucleus through Hoechst (blue, middle left column), phosphorylated c-Jun (p-c-Jun) through the anti-p-c-Jun (red, middle right column) and merged of these markings (right column). Arrows indicate double colocalization (purple). Scale bars 50 μm .

Figure 4: Effect of AP-1 inhibitor on the glial cells activation. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naïve). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g}.\text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l}.\text{site}^{-1}$) or no injection (Naïve). After 3h the injection, the spinal cord (L4-L5 segment) was collected for analysis of mRNA expression, by RT-PCR (A) and of GFAP protein expression by western blotting (B and C). (A) The gene expression was normalized to GAPDH expression. (B) Representative image of the expression of GFAP. (C) The expression of GFAP protein was given in relation to the expression of β -actin. The results were expressed as mean $\pm$ SEM of 12 mice per group and represent two independent experiments. "a", "b" and "c" ($P < 0.05$)

indicates a statistically significant difference when compared to the Sham and SNI Naïve groups, respectively.

Figure 5: Effect of AP-1 inhibitor on the JNK expression in the spinal cord of animals submitted to SNI. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naïve). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g}.\text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l}.\text{site}^{-1}$) or no injection (Naïve). After 3h the injection, the spinal cord (L4-L5 segment) was collected for analysis of expression of JNK by western blotting. (A) Representative figure of the expression of phosphorylated JNK (pJNK), total JNK and β -actin. The expression of the phosphorylated (B) and total form (C) of JNK was given relative to the expression of β -actin. The results were expressed as mean $\pm$ SEM of 12 mice per group and represent two independent experiments. "a" , "b" and "c" ($P < 0.05$) indicates a statistically significant difference when compared to the Sham and SNI Naïve groups, respectively.

Figure 6: Effect of AP-1 inhibitor on the ERK expression in the spinal cord of animals submitted to SNI. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naïve). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g}.\text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l}.\text{site}^{-1}$) or no injection (Naïve). After 3h the injection, the spinal cord (L4-L5 segment) was collected for analysis of ERK expression by western blotting. (A) Representative figure of phosphorylated ERK1 and ERK2 (pERK1 and pERK2, respectively), and total ERK1 and ERK2 and β -actin expression. The expression of phosphorylated ERK1 and ERK2 (B and C, respectively), total ERK1 and ERK2 (D and E, respectively) were given proteins expression relative to β -actin. The results were expressed as mean $\pm$ SEM 12 mice per group and represent two independent experiments. "a", "b" and "c" ($P < 0.05$) indicates a statistically significant difference when compared to the Sham and SNI Naïve groups, respectively.

Figure 7: Effect of AP-1 inhibitor on mRNA expression of p38 in the spinal cord of SNI-induced hypernociception in mice. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naive). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{site}^{-1}$) or no injection (Naïve). Three hours after injection, spinal cord (L4-L5 segment) was collected for analysis of mRNA expression by RT - PCR of p38. The gene expression was normalized to GAPDH expression. The results were expressed as mean $\pm$ SEM of 8 mice per group and represent two independent experiments. "a", "b" and "c" ($P < 0.05$) indicates a statistically significant difference when compared to the Sham, SNI or Naive group, respectively.

Figure 8: Effect of AP-1 inhibitor on mRNA expression of pro-inflammatory mediators and NO concentration in the spinal cord of SNI-induced hypernociception in mice. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naive). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{site}^{-1}$) or no injection (Naïve). Three hours after injection, spinal cord (L4 - L5 segment) was collected for analysis of mRNA expression of TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 β (C), IL-17A (D), KC (E), MCP-1 (F) and iNOS (G), by RT - PCR and estimate the concentration of nitric oxide by Griess reaction (H). The gene expression was normalized to GAPDH expression (A-G). The results were expressed as mean $\pm$ SEM of 8 mice per group and represent two independent experiments. "a", "b" and "c" ($P < 0.05$) indicates a statistically significant difference when compared to the Sham, SNI or Naive group, respectively.

Figure 9: Effect of inhibitor of AP- 1 in gelatinases expression in the spinal cord of SNI-induced hypernociception in mice. C57BL/6 mice were submitted to an experimental model of neuropathic pain (SNI or SNI + SR), false-operated (Sham) or not submitted to any surgical procedure (Naive). On the seventh day after SNI, the animals were injected i.t. with SR11302 (SNI + SR; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{site}^{-1}$), vehicle (sham or SNI; 5 $\mu\text{l} \cdot \text{site}^{-1}$) or no injection (Naive). Three hours after injection, spinal cord (L4-L5 segment) was collected for analysis of MMP-2 (A and B) and MMP-9 (C and D)

expression by zymography gel. Representative image of a gelatin zymogram SDS-PAGE of the spinal cord of MMP-2 (A) and -9 (C). Zymography representative figure of MMP-2 (B) and MMP-9 (D). The molecular weights of the bands of MMP-2 (72 kDa) and MMP-9 (84 or 92 kDa) were identified after electrophoresis on 7% SDS-PAGE by zymography pattern (Standard, 10 μ l). The results were expressed as mean $\pm$ SEM of 12 mice per group and represent two independent experiments. "a" and "b" ($P < 0.05$) indicate statistically significant difference compared with the sham and SNI group, respectively.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9