UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

*Novo método de avaliação da incapacidade articular na artrite
experimental: investigação do papel das células da glia*

ANDREZA URBA DE QUADROS

Ribeirão Preto

2013

ANDREZA URBA DE QUADROS

*Novo método de avaliação da incapacidade articular na artrite
experimental: investigação do papel das células da glia*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Quadros, Andreza Urba

Novo método de avaliação da incapacidade articular na artrite experimental: investigação do papel das células da glia. Ribeirão Preto, 2013.

122 p.

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

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Palavras-chave: artrite reumatoide, hipernocicepção, teste de incapacitação dinâmico, células da glia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andreza Urba de Quadros

Novo método de avaliação da incapacidade articular na artrite experimental: investigação do papel das células da glia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: 05 de Fevereiro de 2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Waldiceu Verri Junior

Instituição: UEL 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).

Dedicatória

*Aos meus avós José e Maria Urba, que
nunca mediram esforços para que eu
chegasse até aqui... Obrigada por estarem
sempre presentes, me fazendo acreditar que
tudo é possível...*

Amo vocês!

Agradecimientos

À Deus, pela vida, oportunidade e força de seguir em frente, mas principalmente pelo amor, amizade e companhia incondicionais... Mais que palavras, ofereço a Ele uma vida de gratidão...

À minha família, sempre presente, pelo amor, cuidado, apoio, por me mostrarem que sonhos são possíveis. Aos meus pais Valter e Sandra, professores, que me inspiraram nesse caminho. À Elienai e ao Davi, pelo amor, paciência e exemplo de vida. Aos meus irmãos queridos: Adrielly, Samara e Lucas, meus “xodós”, pelos momentos de diversão e carinho. Ao meu cunhado Gabriel e ao meu sobrinho Daniel, minha paixão: seu sorrisinho me alegra todos os dias. À minha avó Angelina, pelas orações, amor e agridinhos quando estava em casa. Aos meus primos e tios, especialmente à tia Dirlei, cuja força e determinação me encorajam sempre.

Em especial aos meus avós José e Maria, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui e dos quais tenho muito orgulho em dizer que sou filha. Sua coragem, luta e fé em Deus quero seguir por todos os meus dias. À Dionizia, minha mãe do coração, que me guiou à presença de Deus e me ensinou tantas coisas. Não há palavras para expressar o que você significa pra mim. Ao meu tio Edelmar, de quem tenho muito orgulho e cuja trajetória me inspira. Obrigada por tudo! Certamente essa conquista não seria possível sem você! À Isabel, querida, por estar em nossas vidas e por ter trazido de volta tantas coisas boas. Você também é parte de tudo isso e tem meu imenso carinho e admiração.

Ao meu querido Leandro. Sua amizade e amor me trouxeram até aqui. Sua presença me deu forças para estar tão longe de casa. Obrigada pela compreensão e companhia, inclusive nos finais de semana de experimento. Seu jeitinho de ser me ensina muito. Que juntos, cheguemos além dos nossos sonhos!

À Marta Chagas Monteiro, minha amiga, orientadora (de iniciação científica) e exemplo. Devo muito a você. Sua ética, responsabilidade e competência são valores que quero

seguir. Obrigada por ter me mostrado esse caminho e ter aberto as portas pra mim. Você terá sempre minha admiração, amor e gratidão.

As minhas irmãs de república: Greice, Priscilla, Marcela e Juliana. Obrigada pela amizade sincera e por todos os momentos especiais que vivemos juntas. Vocês são minha família aqui. Não teria conseguido sem vocês! Priscilla, sua bondade e doação quando choro aqui serão impossíveis de esquecer. Obrigada!

Ao professor Dr. Thiago Mattar Cunha, pela dedicação e competência como orientador deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e mostrar que posso ser mais do que penso. Você será sempre um exemplo.

Aos professores Dr. Sérgio Henrique Ferreira, Dr. Fernando de Queiroz Cunha e Dr. José Carlos Alves Filho, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela honra de contar com sua amizade e orientação.

Aos professores Dr. Paulo Louzada Júnior e Waldiceu Verri Júnior, pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente, engrandecendo as discussões deste trabalho.

As minhas amigas Larissa, Miriam e Flávia, que tanto me ajudaram a executar este trabalho. Obrigada pelo esforço, amizade e dedicação. Esse trabalho também é de vocês.

Aos melhores técnicos do mundo: Ieda, Serginho, Diva, Katinha, Marquinho, Giu, Bruno e Tadeu. Vocês são sensacionais!

Aos bioteristas Orlando, Eliana e Marquinho pelo cuidado com os animais e principalmente pelo carinho comigo.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia: Soninha, Ramón e Fátima. Nada disso seria possível sem a dedicação de vocês.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP pelos ensinamentos e pelo convívio. É uma honra tê-los como mestres.

Aos amigos e colegas de pós-graduação do Departamento de Farmacologia, pelo convívio e amizade.

Aos amigos do programa de Imunologia, pelos momentos de descontração.

Aos amigos do DOL, pelas produtivas discussões e amizade.

A Paulinha Czaikoski, pela amizade sincera e por ter aberto as portas pra mim.

Aos amigos do laboratório de dor e inflamação: David, Alexandre Lopes, Giovane, Morena, Marcelo, Jozi, Rafael Poloni, Guilherme, Daniel, Andressa Zaparolli, Cristina, Rangel, Andressa Duarte, Paula Barbim, Fabiane, Fabrício, Gabriela, Adriana, Daniele Nascimento, Fernanda, Alexandre Kanashiro, Paulo, Silvia, Walter, Jaqueline, Flávio (Potássio), Raphael (Panda), André (Capaz), Andressa Freitas, Rafael Ferreira, Jhimmy e Rafael França.

Aos meus amigos da UNICENTRO, em Guarapuava, Paraná. Thaysa e Lori, sua amizade e companheirismo são muito importantes pra mim! Obrigada aos professores do departamento de Farmácia, em especial aos professores Dr. Najeh Maissar Khalil, Dr. Emerson Carraro e à professora Dra. Rubiana Mara Mainardes, pelo incentivo e por acreditarem tanto em mim.

À Daniela Zanon e sua família. Obrigada por me acolherem e estarem presentes em toda esta jornada. Vocês são muito especiais!

À minha amiga Cláudia e sua família. Obrigada por sempre estarem comigo, por me amarem tanto, pelos muitos momentos de descontração e por serem parte tão importante da minha vida.

À família do pastor Antônio Domingos dos Santos, que desde pequena me deram forças para chegar muito mais longe do que eu esperava. Obrigada pela dedicação, ensinamentos e amizade. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me ajudarem a vencer minhas limitações. Contem comigo sempre...

Aos meus líderes e amigos da Igreja em Guarapuava, Paraná, pelo carinho e apoio mesmo a distância. Em especial, ao pastor Ezequiel Batista, cujas palavras me edificaram e exemplo permanecerá em meu coração.

Aos meus líderes e amigos da Igreja em Ribeirão Preto. Vocês fizeram essa jornada mais fácil. Zuleide e Marcelo, vocês merecem o melhor de Deus.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro e à Universidade de São Paulo pelo apoio e valorização do aluno.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

*“Uma paixão forte assegurará o sucesso,
porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.”*

William Hazlitt

Resumo

QUADROS, A. U. **Novo método de avaliação da incapacidade articular na artrite experimental: investigação do papel das células da glia.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Um bom modelo experimental deve contar com métodos de avaliação eficazes de seus parâmetros. Esta é uma observação importante quando se faz necessária a avaliação da nocicepção e da incapacitação articular em animais experimentais. O estabelecimento de novos critérios aos testes animais é fundamental para que processos inflamatórios articulares possam continuar sendo estudados, entendidos e resolvidos. Buscando contribuir neste sentido, este trabalho realizou a padronização do teste de incapacitação dinâmico (TID) para avaliação da incapacitação articular em modelos experimentais de artrite. Os resultados obtidos mostram que o TID é sensível na avaliação da incapacitação articular em modelos de artrite induzida por antígeno (AIA) ou por zimosana. Além disso é preditivo para o estudo do efeito farmacológico de drogas que interfiram na incapacitação articular como anti-inflamatórias ou analgésicas.

Desde o início da década de 90, quando participação das células da glia na dor foi descrita, diversos trabalhos surgiram mostrando seu papel em diferentes modelos animais. A participação das células da glia espinais na dor e incapacitação em modelos experimentais de artrite e artrite reumatoide têm sido relatada, mas não há descrição desta participação em função do tempo de indução do processo inflamatório articular. Por meio de ferramentas farmacológicas e moleculares, este trabalho mostra que as células da glia, tanto espinais como do gânglio da raiz dorsal estão participando na gênese e manutenção da incapacitação inflamatória articular em modelo de AIA. A participação destas células ocorre por meio da liberação de IL-1 β e TNF α em nível medular e pela primeira vez é mostrado que a ativação astrocítica parece preceder a ativação microglial neste modelo.

Palavras-chave: artrite, artrite reumatoide, teste de incapacitação dinâmico, células da glia.

Abstract

QUADROS, A. U. New method for assessing articular disability in experimental arthritis: investigation the role of glial cells. Master Thesis - Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

A good experimental model must rely on effective methods of evaluation of its parameters. This is an important observation when it is necessary to evaluate the articular nociception and disability in experimental animals. Establishing new criteria to test animals is essential for inflammatory joint can continue being studied, understood and resolved. Seeking help in this sense, this work constitutes a test dynamic weight bearing (DWB) standardization for assessment of articular incapacitation in experimental models of arthritis. The results show that the DWB is sensitive in assessing the impairment models articular antigen-induced arthritis (AIA) or zimosana. Furthermore is predictive for studying the pharmacological effects of drugs that interfere with articular incapacitation as anti-inflammatory or analgesic.

Since the early 90s, when participation of glial cells in pain was described, several studies have emerged showing its role in different animal models. The involvement of glial cells in the spinal pain and disability in experimental models of arthritis and rheumatoid arthritis have been reported, but no description of this contribution versus time of induction of joint inflammation. Through molecular and pharmacological tools, this work shows that the glial cells, both as the spinal dorsal root ganglio are participating in the genesis and maintenance of inflammatory joint incapacitation in AIA model. The participation of these cells occurs through the release of IL-1 β and TNF α in the spinal cord and the first time it is shown that astrocytic activation appears to precede the microglial activation in this model.

Keywords: arthritis, rheumatoid arthritis, dynamic weight bearing, glial cells.

Lista de figuras e tabelas

Figuras

Figura 1. Representação do DWB com todos seus componentes.....	43
Figura 2. Detalhe da caixa acrílica (B) e do assoalho sensor (A) onde o animal se movimenta.....	43
Figura 3. Representação do protocolo experimental do modelo de AIA	54
Figura 4. Avaliação da incapacitação articular induzida por zimosana pelo método TID: efeito de um anti-inflamatório não-esteroidal	66
Figura 5. Avaliação da incapacitação articular induzida pelo modelo de AIA pelo TID: Curva dose e tempo resposta do mBSA i.a.	68
Figura 6. Efeito da indometacina sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID	70
Figura 7. Efeito do etoricoxibe sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID	72
Figura 8. Efeito da dexametasona sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID	74
Figura 9. Efeito do metotrexato sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID	76
Figura 10. Efeito do infliximab sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID	78
Figura 11. Efeito da inibição farmacológica das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA	81
Figura 12. Avaliação da expressão gênica de marcadores de ativação glial por qRT-PCR em amostras de animais submetidos ao modelo de AIA	83
Figura 13. Avaliação da expressão proteica de GFAP por Western Blotting em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA	85
Figura 14. Avaliação da expressão proteica de Iba1 por Western Blotting em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA	86

Figura 15. Avaliação da expressão proteica de GFAP por Western Blotting em amostras de gânglio de animais submetidos ao modelo de AIA	87
Figura 16. Efeito da inibição farmacológica de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular induzida por modelo de AIA	90
Figura 17. Avaliação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias por qRT-PCR em amostras de animais submetidos ao modelo de AIA	92

Tabelas

Tabela 1. Representação do protocolo experimental utilizado para avaliar a preditividade do método de TID.....	56
Tabela 2. Protocolo experimental utilizado para avaliar a participação das células da glia espinais no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA	57
Tabela 3. Protocolo experimental utilizado para avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA	58
Tabela 4. Sequência dos pares de primers utilizados no ensaio de qRT-PCR	61

Lista de Abreviaturas

AIA: artrite induzida por antígeno

AIE: anti-inflamatórios esteroidais

Aif1: fator inflamatório de aloenxerto 1 (allograft inflammatory factor 1)

AhR: receptor para hidrocarbonetos arílicos (aryl hydrocarbon receptor)

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

AIZ: artrite induzida por zimosana

ANOVA: análise de variância

AMPA: receptor para o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AP-1: ativador da proteína 1 (activator protein 1)

AR: artrite reumatoide

ATP: adenosina trifosfato (adenosine tri-phosphate)

CD: cluster de diferenciação

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar (complementar deoxyribonucleic acid)

CFA: adjuvante completo de Freud (complete Freud's adjuvant)

CIA: artrite induzida por colágeno (collagen induced arthritis)

COX: ciclooxigenase

cm: centímetro (s)

cm²: centímetros quadrados

CT: cycle threshold

Dexa: dexametasona

DMARD: droga antirreumática modificadora da doença (disease modifying antirheumatic drugs)

DNA: ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

E.P.M.: erro padrão da média

Etori: etoricoxibe

FI: falso-imunizado

g: grama (s)

G: força centrífuga

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GFAP: proteína fibrilar ácida da glia (glial fibrillary acidic protein)

GR: receptor de glicocorticoide

GRD: gânglio da raiz dorsal

HCl: ácido clorídrico

HLA: antígeno leucocitário humano (human leukocyte antigen)

i.a.: intra-articular

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for Study of Pain)

Iba1: molécula adaptadora da ligação ao cálcio ionizado 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)

IgG: imunoglobulina G

I κ B: inibidor de kappa B

IL: interleucina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IM: imunização

Indo: indometacina

Inflix: infliximab

INF γ : interferon gama

i.p.: intraperitoneal

i.t.: intra-tecal

kg: quilograma (s)

L: litro (s)

L4-L6: vértebra lombar 4 a 6

LPS: lipopolissacarídeo

m: metro (s)

M: molar

µg: micrograma (s)

mg: miligrama (s)

µL: microlitro (s)

µm: micrômetro (s)

µmol: micromol (s)

MHC: complexo maior de histocompatibilidade (major histocompatibility complex)

min: minuto (s)

mL: mililitro (s)

mBSA: albumina bovina sérica metilada (methylated bovine serum albumin)

MTX: metotrexato

MyD88: gene 88 para resposta primária a diferenciação mieloide [myeloid differentiation primary response gene (88)]

n: nano

nm: nanômetro (s)

NaCl: cloreto de sódio

NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)

NMDA: receptor para N-metil-D-aspartato

nmol: nanomol (s)

PGE₂: prostaglandina E₂

pH: potencial hidrogeniônico

PTD: pata traseira direita

PTE: pata traseira esquerda

p/v: peso/volume

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo (real time reverse transcription polymerase chain reaction)

RANKL: receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

RNA: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

s: segundo

s.c.: subcutâneo

SDS: dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)

SNC: sistema nervoso central

TBS-T: tampão Tris-salina com tween (tris buffered saline with tween)

TCA: ácido tricloroacético (trichloro acetic acid)

TEP: tempo de elevação da pata

TID: teste de incapacitação dinâmico

TIE: teste de incapacitação estático

Th: linfócito T auxiliar (helper)

TNF: fator de necrose tumoral alfa (tumor necrose factor)

v.o.: via oral

Zim: zimosana

Sumário

1. INTRODUÇÃO	29
1.1 Artrite	30
1.2 Artrite reumatóide	27
1.2.1 Dor e incapacitação na artrite reumatóide	33
1.2.2 Tratamento farmacológico	36
1.3 Modelos experimentais de artrite	38
1.4 Métodos de avaliação da hipernocicepção articular	40
1.5 Teste de incapacitação dinâmico (TID)	42
1.6 Células da glia	44
1.6.1 Glia e dor	46
4. OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Animais	52
3.2 Drogas e reagentes	52
3.3 Indução de artrite experimental	
3.3.1 Artrite induzida por zymosan (AIZ)	53
3.3.2 Artrite induzida por antígeno (AIA)	53
3.4 Teste de incapacitação dinâmico (TID)	54

3.5 Protocolos experimentais dos tratamentos farmacológicos	55
3.5.1 Preditividade farmacológica do TID em modelo de AIA	55
3.5.2 Análise farmacológica da participação das células da glia espinais no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA	57
3.5.3 Análise farmacológica de participação de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular em modelo de AIA	58
3.6 Coleta de amostras para ensaios moleculares	59
3.7 Avaliação da expressão gênica: qRT-PCR	59
3.8 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting	61
3.9 Análise Estatística	63
 4. RESULTADOS	 64
4.1 O TID mostra-se sensível na detecção da incapacitação articular induzida por zimosana, e ao efeito farmacológico de um anti-inflamatório não-esteroidal	65
4.2 O TID mostra-se sensível na detecção da incapacitação articular induzida pelo modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)	67
4.3 O TID apresenta predictividade farmacológica no modelo de AIA	69
4.3.1 Efeito da indometacina sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID	69
4.3.2 Efeito do etoricoxibe sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID	71
4.3.3 Efeito da dexametasona sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID	73
4.3.4 Efeito do metotrexato sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID	75

4.3.5 Efeito do infliximab sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID	77
4.4 As células da glia espinais participam da incapacitação articular induzida por modelo de AIA	79
4.4.1 Efeito da inibição farmacológica das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA	79
4.4.2 Avaliação da expressão gênica de marcadores de ativação glial em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA	82
4.4.3 Avaliação da expressão proteica de marcadores de ativação glial em amostras de medula e DRG de animais submetidos ao modelo de AIA	84
4.5 A inibição de citocinas pró-inflamatórias espinais reverte a incapacitação articular induzida por modelo de AIA	88
4.5.1 Efeito da inibição farmacológica de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular induzida por modelo de AIA	88
4.5.2 Avaliação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em amostras de medula e DRG de animais submetidos ao modelo de AIA	91
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÃO	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. Introdução

1.1 Artrite

Artrite é um termo amplo que define um conjunto de sinais e sintomas, mediados por um processo inflamatório presente nas articulações. Caracteriza-se pela presença de um infiltrado de células do sistema imune e de mediadores solúveis nos locais acometidos. Os principais sinais clínicos na artrite são dor, edema e rigidez articular.

De acordo com os parâmetros associados à localização, intensidade e etiopatogenia da inflamação articular, a artrite é subdividida em mais de 100 subgrupos. Os principais tipos de artrite são a artrite gotosa, piogênica aguda, psoriática, e as mais incidentes, a osteoartrite e a artrite reumatoide, doenças articulares responsáveis por incapacitação e substanciais perdas econômicas para o paciente e para o Estado.

1.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e progressiva, de caráter autoimune, que apresenta manifestações articulares e sistêmicas (FIRESTEIN, 2003). Acomete principalmente as pequenas articulações das mãos e pés, bem como os joelhos, de maneira simétrica. Está associada com elevada morbidade e mortalidade em relação à população equivalente em faixa etária não portadora da doença, acometendo cerca de 1% da população mundial (McINNES & SCHETT, 2011). Na população acima de 55 anos de idade, a incidência sobe para 4,5%, sendo que 70% dos pacientes são do sexo feminino (VOLTARELLI, 2009). Apesar de acometer principalmente pessoas em idade avançada, ela não é exclusiva a esta faixa etária. Um dos principais impactos da AR é que ela acomete a população economicamente ativa. Cerca de 2,5 milhões de canadenses e 27,8 milhões de

americanos portadores da doença estão entre 18 e 64 anos (BADLEY *et al.*, 2004; CDC, 1999). Um estudo conduzido por LOUZADA-JUNIOR e colaboradores, em 2007, no Estado de São Paulo, revela que, em um grupo de 1.381 pacientes, apenas um terço exerce suas atividades profissionais. Pacientes com AR deixam de trabalhar 20 anos antes da média da população (CORBACHO & DAPUETO, 2010), o que torna a doença um importante problema de saúde pública. Além disso, uma vez que é crônica, exige acompanhamento regular, bem como tratamento farmacológico e não farmacológico por toda vida do paciente, onerando custos ao Estado. O conjunto de sintomas e das condições socioeconômicas que se agrupam à doença, leva a uma prevalência de quase 34% de transtornos psicológicos nestes pacientes (COSTA *et al.*, 2008) e cerca de 30% da incapacitação resultante da AR é causada por eles (HALL *et al.*, 2011). Assim, o impacto social da artrite é claro. Infelizmente, sua etiologia e os mecanismos associados ao desenvolvimento da doença não estão totalmente estabelecidos.

Diversos fatores têm sido apontados como causadores da AR. Ao que parece dois ou mais deles estão associados contribuindo para a gênese da doença. Acredita-se que cerca de 15% dos casos sejam hereditários e há uma maior incidência entre gêmeos monozigóticos que entre dizigóticos (MACGREGOR *et al.*, 2000). A presença do HLA-DR, um receptor de superfície da classe II do MHC, aparece em grande parte dos pacientes artríticos e está relacionado de maneira direta ao desenvolvimento e gravidade da doença (WEYAND *et al.*, 1992). Polimorfismos no receptor para hidrocarbonetos arila (AhR) foram recentemente identificados por nosso grupo de pesquisa e estão relacionados ao desenvolvimento da AR, especialmente em pacientes tabagistas, sugerindo uma relação entre os fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento da doença (TALBOT *et al.*, dados não publicados). Infecções bacterianas, fúngicas ou virais podem também desencadear AR. Esses organismos, seus fragmentos ou seus produtos podem levar a citrulinação de proteínas. Não apenas decorrente de microorganismos, essa alteração pode acontecer devido a

outros fatores e está ligada à patogênese da doença. A citrulinização é uma modificação pós-translacional em que peptidil arginina desaminases, em presença de cálcio, convertem uma arginina em citrulina, alterando a carga e a conformação estrutural da proteína (GYORGY *et al.*, 2006) e fazendo com que sejam reconhecidas pelo sistema imune como antígenos. A presença de anticorpos anti-proteína citrulinada em pacientes com AR está correlacionada à maior severidade da doença (KLARESKOG *et al.*, 2008).

Participam da gênese da AR tanto componentes do sistema imune inato como adaptativo. Além de linfócitos T e B (SCHRODER *et al.*, 1996), a sinóvia abriga também células dendríticas, importantes apresentadoras de antígeno (JANG *et al.*, 2011). Por razões ainda não estabelecidas, antígenos articulares próprios passam a ser reconhecidos pelas células dendríticas, que ativam o linfócito T CD4⁺ ou T *helper* (Th). Através de sinais co-estimulatórios e de citocinas, a célula Th se diferencia em Th1 ou Th17, padrões pró-inflamatórios que liberam especialmente IFN γ , TNF α , IL-1 β e IL-17, e que juntas ativam fibroblastos, condrócitos e osteoclastos (FIRESTEIN, 2003). A instauração de um processo inflamatório na articulação ativa macrófagos residentes, que participam como apresentadores de antígeno, além de neutrófilos. Estas células que migram, juntamente com a sinóvia hiperplasiada, formam o chamado *pannus*, tecido granulomatoso, na região de contato entre a sinóvia, a cartilagem e o osso, com características tumorais, capaz de invadir e destruir os tecidos cartilaginoso e ósseo. A produção de enzimas proteolíticas como metaloproteinases, agrecanases e serino proteases, além de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, contribuem para esta degradação (FIRESTEIN, 2003; HARRIS *et al.*, 1990). Os danos estruturais, juntamente com as citocinas e com prostaglandinas, levam ao surgimento do principal sintoma da AR: a dor.

1.2.1 Dor e incapacitação na AR

A dor é o sintoma mais prevalente da AR (FIRESTEIN, 2003) e a razão de procura pelo atendimento médico. É considerada grave em cerca de 60% dos pacientes (CORBACHO & DAPUETO, 2010). Juntamente com fatores mecânicos, como a degradação da cartilagem, e aspectos psicológicos associados, causa incapacitação moderada ou severa em 70% dos indivíduos acometidos (CORBACHO & DAPUETO, 2010). É descrita pelos pacientes como dor “em facada”, “latejante”, “forte” e geralmente é mais intensa pela manhã.

Dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é a sensação desagradável associada a um estímulo tecidual nocivo ou potencial. Esse conceito abrange dois aspectos, um físico e um emocional. O dano tecidual evoca um estímulo que será sentido de acordo com o histórico de vida do paciente, segundo seus princípios culturais, religiosos e de experiências prévias. O estímulo físico é chamado nocicepção e é o termo utilizado ao se referir ao comportamento animal, uma vez que, neste caso, o componente emocional não pode ser avaliado.

Excetuando-se a cartilagem, o tecido articular é innervado por 3 tipos de fibras aferentes: fibras mielinizadas, do tipo A β , de limiar de ativação baixo e transmissão rápida (cerca de 30 m/s), responsáveis por estímulos mecânicos de pressão e movimento; fibras mielinizadas do tipo A δ , de pequeno diâmetro, limiar de ativação mais alto e velocidade de transmissão mais baixa (entre 2,5 e 30 m/s) (JANKOWSKA *et al.*, 1993), além ainda de fibras não mielinizadas de diâmetro muito pequeno, do tipo C, com alto limiar de ativação e transmissão lenta (menos que 2,5 m/s). Nas articulações, 90% das fibras sensoriais são do tipo C e innervam principalmente a sinóvia, os ligamentos, os tendões, o menisco e o periósteo (MAPP *et al.*, 1990).

Durante a lesão ou inflamação tecidual que ocorre no desencadear da AR, mediadores são liberados, podendo ativar a extremidade livre das fibras A δ e C,

chamada de nociceptor, desencadeando um potencial de ação, ou podem apenas sensibilizá-las, reduzindo seu limiar de ativação. Ambos os mecanismos geram no paciente, a dor característica da AR: ao movimentar a articulação, com episódios de dor espontânea. A transmissão do impulso nervoso de primeira ordem segue até o gânglio da raiz dorsal (GRD), o corpo celular deste neurônio, onde o processamento metabólico acontece. Após a conexão ganglionar, vai até o corno dorsal da medula espinal, onde transfere o impulso ao neurônio de segunda ordem, que através do trato espinotalâmico, transmite a informação ao cérebro. O trato espinotalâmico conta com feixes de neurônios laterais e mediais. Enquanto que os laterais levam a informação ao córtex somatossensorial e promovem a sensação física da dor, os mediais possuem terminações no tálamo e fazem conexões com o córtex límbico e pré frontal, sendo responsáveis pelo componente emocional da dor (JONES *et al.*, 1996).

Segundo os principais autores na área, como SCHAIABLE e FIRESTEIN, há dois passos essenciais no estabelecimento do processo doloroso no paciente de AR. O primeiro passo é a sensibilização periférica, quando fibras de pequeno diâmetro tem o limiar de ativação reduzido e passam a responder a estímulos até então inócuos ou fracamente dolorosos, caracterizando a hiperalgesia (SCHAIABLE & GRUBB *et al.*, 1993), que acontece quando o paciente movimenta a articulação ao caminhar, sentar-se e até mesmo quando uma suave pressão é aplicada (SCHAIABLE *et al.*, 1998; SCHAIABLE *et al.*, 2000). Esse processo se inicia a partir da liberação de mediadores inflamatórios na cavidade articular. Estão presentes especialmente IL-1 β e TNF α , que podem sensibilizar diretamente o nociceptor, embora seu efeito hiperalgésico deva-se principalmente à sua capacidade de induzir a liberação ou a produção de prostaglandinas (PG). As PGs são os principais mediadores que sensibilizam os nociceptores, reduzindo o limiar de ativação neuronal (FERREIRA *et al.*, 1978). Também a bradicinina que tanto ativa o nociceptor, como promove a liberação de PGs e está diretamente relacionada à incapacitação presente na doença (TONUSSI & FERREIRA, 1997). Neste sentido, a incapacitação observada em pacientes com AR

está relacionada ao processo inflamatório e à hiperalgesia decorrente. Uma das evidências é que, a indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, reduz a incapacitação em modelos experimentais de artrite (TONUSSI & FERREIRA, 1992).

O segundo passo no estabelecimento da dor e da incapacitação na AR é a sensibilização central. O principal neurotransmissor central responsável pela condução do estímulo nociceptivo é o glutamato. Uma vez liberado pelo neurônio de primeira ordem na sinapse medular, ativa receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, bem como metabotrópicos. Durante um processo inflamatório, há um aumento na expressão de receptores NMDA nos neurônios de segunda ordem e o aumento da concentração intracelular de cálcio nestas células, reduzindo seu limiar de ativação. Além disso, há ainda a liberação de neuropeptídeos, como a substância P, que também alteram o limiar de ativação do neurônio de segunda ordem (OHTORI *et al.*, 2001). PGs e citocinas são liberadas na sinapse medular, potencializando o processo de sensibilização central (VANEGAS & SCHAIBLE *et al.*, 2001). Estas alterações em conjunto, promovem modificações metabólicas e estruturais na fibra nervosa que levam à cronificação da dor.

Tanto a sensibilização periférica como central, alteram o comportamento biomecânico do paciente, fazendo com que redistribua a força entre os membros inferiores, ao caminhar ou se levantar. Pacientes com AR exercem de 60 a 80% menos pressão na região plantar que indivíduos saudáveis (HODGE *et al.*, 2009), resultado direto da dor e da limitação mecânica da articulação. Essa redistribuição de peso traz ao paciente restrição nas atividades diárias e pode ser interpretada como o principal reflexo da incapacitação na doença (NEUGEBAUER *et al.*, 2007). Tanto a incapacitação como a dor podem ser melhoradas com o tratamento farmacológico.

1.2.2 Tratamento farmacológico da AR

As estratégias farmacológicas convencionais para o tratamento da AR utilizam combinações de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticoides e de drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs). Mais recentemente os imunobiológicos, que bloqueiam a ação de citocinas e de moléculas co-estimulatórias, trouxeram novas perspectivas para o tratamento da AR.

Os AINEs foram os primeiros fármacos usados para amenizar os sintomas da artrite. Reduzem a dor, o edema e a rigidez articular, embora não impeçam a progressão da doença, pois não atacam suas causas. Além disso, são úteis nas primeiras semanas de tratamento, até que os DMARDs iniciem seu efeito (AARONS *et al.*, 1983) e durante crises agudas de dor. Os AINEs inibem a ação das enzimas ciclooxigenases (COX) 1 e 2, que metabolizam o ácido araquidônico, formando prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios. Competem com o sítio catalítico da enzima, fazendo pontes de hidrogênio com um resíduo de arginina na posição 120 e desta forma impedem a ligação do ácido araquidônico (PICOT *et al.*, 1994). Normalmente o fazem de maneira reversível e não seletiva. Mas uma diferença de uma isoleucina por uma valina na posição 523 na COX-2 faz com que sua conformação estrutural seja diferente da COX-1 e permita a seletividade de ação de algumas moléculas (WONG *et al.*, 1997). De uma maneira geral, a COX-1 é uma enzima constitutiva e a COX-2 é induzida em processos inflamatórios, por exemplo, por IL-1 β e TNF α (VANE & BOTTING, 2001). A inibição seletiva da isoforma 2 reduz a incidência de efeitos colaterais relacionados à inibição da isoforma 1 e melhora a ação anti-inflamatória, mas pode causar problemas cardiovasculares importantes, motivo pelo qual a maioria foi retirada do mercado.

Os glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são bem mais efetivos que os AINEs e tem duração de ação maior. São os anti-inflamatórios por excelência e inibem as fases iniciais (como os AINEs) e tardias da inflamação.

Apresentam diversos mecanismos de ação, e eficácia tanto quando administrados por via oral como intra-articular. Assim como os AINEs, não são usados cronicamente, pois seus efeitos colaterais são graves, embora sejam muito úteis em fases iniciais e de reagudização da doença. Agem principalmente em receptores citoplasmáticos $GR\alpha$, que após se ligar ao fármaco, migram para o núcleo, onde interagem com sequências de DNA específicas, inibindo a transcrição gênica de produtos pró-inflamatórios e inibindo fatores de transcrição como $NF\kappa B$ e AP-1, além de ativar a transcrição de substâncias anti-inflamatórias, especialmente $I\kappa B$ e anexina-1 (BARNES, 2006). Os principais glicocorticoides usados na AR são a prednisolona e a dexametasona.

Mas a primeira linha no tratamento da AR são os DMARDs, fármacos que além de tratarem os sintomas, impedem a progressão da doença. Incluem a sulfassalazina, compostos de ouro, penicilamina e cloroquina, assim como alguns imunossupressores como a azatioprina e a leflunomida. Esses fármacos já deixaram de ser usados ou o são em casos particulares, uma vez que seus riscos podem ser maiores que os benefícios. O principal DMARD no tratamento da artrite é o metotrexato (MTX) em baixas doses. É o fármaco escolhido assim que o paciente é diagnosticado, tem baixo custo e eficácia satisfatória. Na fase inicial é associado aos AINEs, pois tem início de ação dentro de semanas ou meses. Em fases posteriores pode ser associado aos imunobiológicos, caso o paciente não responda bem ao MTX isoladamente. É um clássico antagonista do ácido fólico, utilizado como citostático. Na AR, no entanto, seu mecanismo de ação é diferente. Ele age como inibidor da proliferação celular, especialmente de células T ativadas, e indutor de apoptose (HERMANN *et al.*, 2003; HERMANN *et al.*, 2005). Ambos os efeitos dependem de sua ação sobre múltiplos alvos, mas se dá especialmente por aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (PHILLIPS *et al.*, 2003). Além disso, o MTX é responsável por aumentar a liberação endógena de adenosina (CRONSTEIN, 2005), que quando ligada ao receptor A2a (HASKO & CRONSTEIN, 2004), exerce funções anti-inflamatórias,

reduzindo a migração de leucócitos para a cavidade articular, bem como a concentração local de TNF α (MONTESINOS *et al.*, 2003). Age ainda como inibidor da produção de citocinas por linfócitos T (GERARDS *et al.*, 2003) ou inibindo a expressão de moléculas de adesão (SZEKANECZ & KOCH, 2000). Alguns estudos sugerem que possa reduzir a progressão da degeneração óssea suprimindo a expressão de RANKL, um fator de diferenciação de osteoclastos e aumentando a concentração de osteoprotegerina, um fator inibitório da osteoclastogênese (LEE *et al.* 2004).

Entretanto, há uma parcela de pacientes que não respondem bem ao MTX e para estes, os imunobiológicos são uma opção. Geralmente são anticorpos monoclonais ou análogos de produtos anti-inflamatórios endógenos e são de uso clínico recente. O primeiro deles a ser aprovado para uso na AR foi o anakinra, um análogo do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) (CAMPION *et al.*, 1996), mas por ter baixa eficácia foi logo substituído pelos antagonistas de TNF α (FLEISHMANN, 2003). O primeiro deles, o infliximab, é um anticorpo monoclonal parcialmente humanizado, que se liga a molécula liberada de TNF, impedindo sua associação a qualquer um de seus receptores. É um fármaco de alto custo, mas fornecido pelo governo federal brasileiro a pacientes refratários ao MTX, para ser usado em associação a este. Há também o adalimumab, anticorpo totalmente humanizado anti-TNF α e o etanercept, um análogo do receptor solúvel de TNF.

1.3 Modelos experimentais de artrite

O estudo laboratorial da AR inicia-se com a escolha de um bom modelo em animais experimentais. Neste sentido, vários modelos foram desenvolvidos ao longo dos anos, buscando reproduzir as características clínicas da doença. Dentre os mais utilizados pode-se destacar aquele em que um processo inflamatório inespecífico pode

ser induzido na articulação por meio da injeção do adjuvante completo de Freud (CFA) ou da zimosana.

O CFA é uma suspensão de micobactéria, inativada pelo calor, em óleo mineral. É geralmente usado para potencializar a antigenicidade de compostos coadministrados, mas pode por si induzir um intenso processo inflamatório. Há mais de 50 anos serve como modelo de artrite. A zimosana foi primeiramente utilizado por KEYSTONE e colaboradores em 1977. É um glicano derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de induzir artrite inflamatória crônica, com infiltrado de células mononucleares, hipertrofia sinovial e formação de *pannus* (KEYSTONE *et al.* 1977). É o método mais utilizado para induzir artrite inespecífica e é útil tanto em estudos de mecanismos inflamatórios como nociceptivos. Ativa receptores *toll-like 2* e, via molécula adaptadora MyD88, sinaliza a liberação de citocinas pró-inflamatórias (GUERRERO *et al.*, 2012). No entanto, como já mencionado, estes dois modelos não apresentam, ou apresentam pouco o componente da imunidade adaptativa, que é característica da AR.

Os dois modelos experimentais que mais apresentam características fisiopatológicas em comum com a AR humana seriam: a) o modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), que utiliza camundongos geneticamente suscetíveis e o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). No primeiro, a linhagem de animais DBA/1J desenvolve artrite espontaneamente após ser imunizada com colágeno do tipo II. É uma artrite poliarticular, simétrica, progressiva e irreversível, oscilando entre períodos de remissão e reagudização, conforme acontece na clínica (KAKIMOTO, 1991), com importante participação de IL-1 β e TNF α (MARINOVA-MUTAFCHIEVA *et al.*, 1997).

O modelo de AIA é um dos mais frequentes da literatura. Consiste em imunizar o animal com uma emulsão água-óleo de CFA e um antígeno solúvel, por via subcutânea, promovendo uma lenta e constante liberação de antígeno. Após 21 dias da primeira imunização, o animal é desafiado em uma das articulações e responde de maneira semelhante à AR. É uma artrite mono-articular (ocorre apenas onde o

antígeno é injetado) e parcialmente reversível, com alguns sintomas e alterações desaparecendo ao longo do tempo. Nosso grupo de pesquisa já identificou alguns mecanismos importantes envolvidos na gênese da dor neste modelo. Por exemplo, a administração intraplantar ou tíbio-tarsal de albumina do soro bovino metilada (mBSA), em camundongos previamente imunizados com este antígeno, produz diminuição do limiar nociceptivo de forma dose e tempo dependente (CUNHA *et al.*, 2008; VERRI *et al.*, 2008), além de promover o aumento de IL-1 β e TNF α na articulação desafiada. PINTO *et al.*, 2010, também mostrou que, quando injetada em articulação tíbio-femoral, o mBSA induz hipernocicepção por até 72 horas.

Mas um bom modelo deve contar com métodos de avaliação eficazes de seus parâmetros. Prova disso é que muitos candidatos a fármacos falham antes de chegarem aos testes clínicos e 80% dos que chegam a ser testados em humanos, falham em fase III (BASBAUM *et al.*, 2006), principalmente porque os resultados de eficácia foram baseados em testes pré-clínicos inadequados (TÉTREAULT *et al.*, 2011). O estabelecimento de novos critérios aos testes animais é fundamental para que processos dolorosos possam continuar sendo estudados, entendidos e resolvidos. E um dos maiores desafios neste contexto é a medida da dor e incapacitação articulares.

1.4 Métodos de avaliação da incapacitação articular

O acesso à resposta nociceptiva articular em animais traz alguns desafios. É preciso estimular a articulação sensibilizada pelo processo inflamatório sem que se atinja o limiar de ativação dos neurônios da pata. Alguns trabalhos na literatura utilizam os filamentos de von Frey para tal (PLAAS *et al.*, 2011; IWAKURA *et al.*, 2010), mas este método, apesar de muito útil na avaliação de hipersensibilidade plantar, nem sempre avalia corretamente o processo articular, uma vez que pode estar

acessando a hiperalgesia secundária. Uma modificação deste método foi realizada por nosso laboratório em 2004, por CUNHA e colaboradores, no qual uma haste metálica com uma ponteira fina na extremidade foi conectada a um transdutor eletrônico. Através de pressão crescente exercida na região plantar pelo experimentador, é possível quantificar de maneira muito mais sensível que o filamento, a pressão em que o animal retira a pata. Quanto menor essa pressão, maior a hipersensibilidade presente. Foi um grande avanço, mas ainda era útil somente para o tecido plantar e não para articulação. Neste sentido, GUERRERO e colaboradores em 2006, propuseram uma alteração deste método, que hoje apresenta-se como a melhor maneira de avaliar a hipersensibilidade mecânica articular em ratos e camundongos. A fim de exercer uma pressão crescente sobre a articulação, sem estimular a pata, os autores modificaram a extremidade fina da ponteira por uma romba. A modificação mostrou-se eficiente e sensível em avaliar o processo doloroso inflamatório articular por diversos estímulos, inclusive no modelo de AIA (PINTO *et al.*, 2010). Apesar de avaliar corretamente a hipersensibilidade, este método não avalia a incapacitação decorrente. Em 1992, TONUSSI & FERREIRA, desenvolveram o método de avaliação da incapacitação articular em cilindro, muito citado na literatura científica. Neste teste, foram colocados ratos sobre um cilindro metálico com 30 cm de diâmetro girando a 3 rpm. O cilindro recoberto por uma tela metálica foi conectado a um dispositivo eletrônico e este a um computador, que avaliou o tempo total em que a pata lesionada permanecia em elevação (TEP - tempo de elevação da pata), através de botas metálicas idênticas encaixadas nas patas posteriores do animal. Embora ambas as patas posteriores fossem calçadas, apenas a bota metálica direita repassava informações ao computador (BORATO *et al.*, 2008). Depois disso, surgiram métodos mais sensíveis, como o teste de incapacitação estático - TIE (ou *static weight bearing*). Neste método, o animal é colocado em uma pequena caixa acrílica, em forma de rampa, em que apenas as patas traseiras tocam o chão, onde existem transdutores de pressão que, conectados a um computador, informam ao experimentador qual a

distribuição de peso entre as patas. É um método eficaz, mas de difícil execução, pois o animal deve estar ambientado à caixa acrílica e imóvel no momento da medida. Buscando melhorar essas limitações, surgiu há pouco tempo, uma modificação do método de TIE, o teste de incapacitação dinâmico – TID (ou *dynamic weight bearing*).

1.5 Teste de incapacitação dinâmico (TID)

O TID é realizado por meio de um aparelho eletrônico que avalia diretamente a distribuição de carga entre os membros do animal. Diferentemente do TIE, o animal não precisa estar imóvel, podendo movimentar-se livremente, o que oferece a oportunidade de medida muito mais precisa da incapacitação durante a execução do movimento, como acontece na clínica, e sem qualquer interferência do experimentador.

O aparelho, como pode ser visto nas figuras 1 e 2, consiste em um assoalho com sensores (A), afixado ao fundo de uma caixa acrílica de 11,5 x 19,7 x 11,5 cm (B). O sistema é conectado (C) a um software (D) onde fica registrada, em gramas, a média do peso que cada pata exerce sobre o assoalho, a cada aquisição. Todos os movimentos são filmados (E) e juntamente com o registro do software, validados pelo experimentador, de acordo com a posição do camundongo no aparelho.

Figura 1. Representação do DWB com todos seus componentes. A – assoalho com sensores fixado ao fundo da caixa acrílica (B). C – transdutor de dados, D – software e E – câmera filmadora.

Figura 2. Detalhe da caixa acrílica (B) e do assoalho sensor (A) onde o animal se movimenta.

Até a data de execução deste trabalho apenas dois autores realizaram a padronização deste teste. Um deles foi TÉTREAULT e colaboradores em 2011, cujo trabalho mostrou a eficiência do teste em avaliar modelos de dor inflamatória crônica induzida pela administração intraplantar de CFA, dor neuropática e resultante de câncer ósseo, em ratos. Outro foi conduzido por ROBINSON, em 2012, que padronizou o TID para avaliação da hiperalgesia inflamatória na pata de camundongos. Não existe nenhum trabalho utilizando o teste para avaliação de

processos inflamatórios articulares, mas a incapacitação presente na AR, indica que este pode ser um método diferencial no estudo da doença.

1.6 Células da glia

A glia é um conjunto de células não neuronais do sistema nervoso, de 10 a 50 vezes mais numerosas que os neurônios. São 4 principais grupos: astrócitos, oligodendrócitos e microglia, no sistema nervoso central (cérebro e medula espinal) e as células satélite, no sistema nervoso periférico.

Os astrócitos são em número e volume as células mais abundantes, e correspondem a quase 50% de toda a glia (ALDSKOGLIUS & KOSLOVA, 1998). São células de formato estrelado e apresentam feixes de filamentos intermediários constituídos pela proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), que reforça a estrutura celular. Estão em contato direto com os neurônios, vasos sanguíneos e entre si, por meio de junções comunicantes, tornando-os uma importante rede de comunicação entre neurônio e sistema extraneuronal (GAO & JI, 2010). Estima-se que um único astrócito esteja em contato com até 6 corpos celulares neuronais e com até 600 dendritos (HALASSA *et al.*, 2007). São responsáveis pelo fornecimento de fontes de energia e precursores de neurotransmissores para o neurônio (TSACOPOLUS, 2002), oferecem suporte trófico por meio da liberação de fatores de crescimento, promovem a regulação de íons extracelulares, a diferenciação neuronal e a formação de sinapses (CERVERO & JENSEN, 2006), bem como o *clearance* de glutamato da fenda sináptica e do espaço extracelular (HUANG *et al.*, 2004; TAWFIK *et al.*, 2006).

A microglia corresponde a quase 10% das células da glia (ALDSKOGLIUS & KOSLOVA, 1998). São macrófagos residentes e diferenciados para funções específicas no sistema nervoso central, pequenos e alongados, com prolongamentos curtos e irregulares. Têm origem mielóide e podem proliferar por meio da mitose ou da

migração de monócitos sanguíneos para o tecido nervoso (CERVERO & JENSEN, 2006). São células fagocíticas de reconhecimento e apresentação de antígenos, realizam a remoção de restos celulares, tanto fisiológicos como de patógenos, favorecem o crescimento das células nervosas e seu reparo em caso de lesão (GEHRMANN *et al.*, 1995; GEHRMANN, 1996).

As células satélite são pequenas, arredondadas e achatadas. Circundam o corpo celular dos neurônios periféricos, ou seja, localizam-se tanto no gânglio da raiz dorsal (GRD) quanto nos gânglios simpáticos, em uma camada única, unida por junções comunicantes e separada do neurônio por uma membrana basal. Em torno do gânglio e das células satélites, há ainda uma cápsula de tecido conjuntivo e perineuro, que os mantém fora de contato com o meio extraneuronal. Apesar disso, as células satélite são a principal barreira entre o exterior e o corpo celular do neurônio. Exercem basicamente as mesmas funções do astrócito, no sistema nervoso central, mas tem morfologia e origem diferentes (HANANI, 2005).

Em condições fisiológicas, os astrócitos e as células satélite exercem suas funções ativamente, enquanto que a microglia permanece em estado de repouso. Mas algumas situações podem promover ativação destas células, como uma inflamação periférica (FU *et al.*, 1999), infecções fúngicas, bacterianas e virais (SWEITZER *et al.*, 1999; WATKINS & MAIER, 2000), neuropatia periférica ou central (COLBURN *et al.*, 1999) e outras. Essa ativação é promovida por mediadores que sinalizam o aumento da concentração de cálcio intracelular, a mobilização de segundos mensageiros e a liberação de mediadores inflamatórios e de neurotransmissores, bem como a expressão de diferentes receptores e moléculas de membrana (WATKINS *et al.*, 2001). Morfologicamente, ocorre hiperplasia e hipertrofia destas células.

Uma vez ativadas, modificam a expressão de proteínas específicas, que permitem o estudo de sua participação em processos patológicos. O astrócito tem uma expressão basal da proteína citoplasmática fibrilar ácida da glia (GFAP), que é aumentada proporcionalmente à ativação da célula (SWEITZER *et al.*, 1999; GAO &

JI, 2010). O mesmo acontece com as células satélite, embora em condições basais expressem pouco ou nenhum GFAP (OHARA *et al.*, 2009). Iba1 (molécula adaptadora da ligação ao cálcio ionizado 1 é uma proteína de canal iônico especificamente expressa em macrófagos e microglia, produto do gene Aif1 (fator inflamatório de aloenxerto 1), que está localizado no segmento do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe III (AHMED *et al.*, 2007). No SNC está seletivamente presente na microglia e também tem sua expressão aumentada mediante ativação.

1.6.1 Glia e dor

A glia, não apenas como suporte ao sistema nervoso, só passou a atrair a atenção de pesquisadores no início da década de 90. A contribuição da glia para a dor patológica foi sugerida em 1991 por GARRISON e colaboradores e em 1997, COLBURN começou a fazer a distinção entre o papel de astrócitos e microglia.

Até que esteja ativada, a glia tem papel pequeno ou nulo na dor, mas sua ativação é suficiente para gerar e manter a hipersensibilidade dolorosa durante processos patológicos (MELLER *et al.*, 1994, WATKINS *et al.*, 1997; WATKINS *et al.*, 2001). Ainda não está totalmente claro como a ativação das células da glia acontece, ou mesmo de que maneira estas células contribuem para a indução e/ou a manutenção da dor.

Dentre os possíveis mecanismos de ativação glial durante os processos dolorosos crônicos, pode-se citar que a ativação da fibra nociceptiva periférica, promove a liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinal, que além de sensibilizarem o neurônio secundário também promovem ativação das células da glia. Dentre outros, são liberados ATP (ARAQUE *et al.*, 1999), glutamato (TSUDA *et al.*, 2003) e substância P (MARRIOTT *et al.*, 2004). Ativada, a glia libera

principalmente citocinas pró-inflamatórias. As principais são a IL-1 β e o TNF α . De fato, o gene da IL-1 β está mais expresso em astrócitos durante processos inflamatórios (ZHANG *et al.*, 2008; WEYERBACHER *et al.*, 2010), neuropáticos (WEI *et al.*, 2007) e durante o câncer ósseo (ZHANG *et al.*, 2005). Estímulos inflamatórios periféricos ativam astrócitos, que liberam IL-1 β em nível medular, além de aumentar as correntes excitatórias de NMDA, potencializando a sensibilização do neurônio secundário (GERARD & HANSSON, 2012). A microglia, especialmente quando ativada por ATP, também libera IL-1 β em nível central (TAKENOUCHI *et al.*, 2009). O TNF α é liberado pela glia em nível medular em modelos de dor neuropática (ZHOU *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2011; LEUNG & CAHILL, 2010) e inflamatória (SAITO *et al.*, 2010). Estas citocinas sinergizam entre si para produzir importantes efeitos, como por exemplo, induzir a liberação de PGE₂ (BERENBAUM *et al.*, 1996) e de quimiocinas (OZAKI *et al.*, 1996) em nível espinal. Os neurônios, tanto primários como secundários, expressam receptores para estes mediadores (VITKOVIC *et al.*, 2000). Depois de liberados pela glia, na medula ou no GRD, eles sensibilizam a fibra, tanto a nível central como periférico, potencializando e cronificando o processo doloroso. Isso acontece em associação à alteração da expressão de receptores de glutamato. A IL-1 β aumenta a condutância dos receptores NMDA (VIVIANI *et al.*, 2003) e TNF α aumenta a expressão de AMPA (STELLWAGEN *et al.*, 2005).

Pouco se sabe sobre a participação da glia na gênese da dor e especialmente na incapacitação inflamatória articular. É descrito que em modelo de artrite induzida por colágeno - CIA (PATRO *et al.*, 2011; CLARK *et al.*, 2012), no modelo de AIA (SORKIN *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2008; MI *et al.* 2011) e em modelo de artrite induzido por LPS (BRESSAN *et al.*, 2012; BAS *et al.*, 2012) há ativação tanto de astrócitos como de microglia a nível espinal, e a inibição farmacológica destas células reverte a hipersensibilidade observada. Em todos os modelos há liberação de IL-1 β e de TNF α pela glia ativada (BAO *et al.*, 2001; CONSTANDIL *et al.*, 2009; MI *et al.* 2011). Em modelo de artrite induzida por LPS, a inibição intratecal de TNF α reverte não apenas a

hipersensibilidade como a incapacitação articular presente no modelo (BRESSAN et al., 2010; BRESSAN et al., 2012). O mesmo acontece em modelo de AIA (INGLIS et al., 2007) e CIA (PATRO et al., 2011), revelando que a glia ativada em modelos de artrite está liberando TNF α e que esta citocina está relacionada à incapacitação articular. Embora estes dados sejam relevantes no estudo da gênese e manutenção da hipersensibilidade e incapacitação em modelo experimental de artrite, ainda não se sabe em que momento após a indução do processo inflamatório a glia está sendo ativada, nem tampouco, liberando citocinas. Os estudos neste sentido são importantes tanto para que a fisiopatologia da doença seja melhor compreendida, como estratégias terapêuticas possam ser desenvolvidas e otimizadas, buscando intervir no início da sensibilização central e impedir a cronificação da dor e da incapacitação na doença.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Diante da necessidade de testes pré-clínicos mais abrangentes, este trabalho avalia a possibilidade de utilização do teste de incapacitação dinâmico (TID) para estudo da disfunção articular em modelo experimental de artrite reumatóide. Além disto, busca também investigar a participação das células da glia neste modelo, utilizando o TID.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a sensibilidade do aparelho em mensurar a incapacidade articular causada por uma inflamação inata e adaptativa;
2. Determinar a preditividade do método por meio da utilização de fármacos com utilização clínica na AR;
3. Promover inibição farmacológica das células da glia e avaliar sua contribuição na incapacitação articular durante a artrite experimental por meio do TID;
4. Avaliar a ativação de astrócitos, micróglia e células satélites por meio de abordagens moleculares;
5. Investigar um possível mecanismo de participação da glia na AR, focando no papel de citocinas como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Todos os procedimentos foram realizados em camundongos isogênicos Balb/C machos de 5 ou 6 semanas com aproximadamente 25 gramas fornecidos pelo biotério central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Em todo o tempo os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e alimento e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Tanto a manipulação dos animais como os experimentos foram realizados de acordo com as normas da International Association for Study of Pain (IASP) e do Comitê de Ética Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, com protocolo de autorização de número 115/2011.

3.2 Drogas e reagentes

Foram utilizados da Sigma Aldrich: zimosana (Z4250), albumina sérica bovina metilada (mBSA) (A1009), adjuvante completo de Freud (CFA) (F5881), indometacina (I7378), dexametasona (D1159), fluorocitrato (F9634) e minociclina (M9511). O infliximab foi gentilmente cedido pelo Prof. Paulo Louzada Júnior do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto sob a apresentação de pó liofilizado Remicade®, Schering Plough, lote L0RMKA85301. O etoricoxibe foi utilizado a partir do comprimido comercial Arcoxia®, Merck Sharp & Dohme, lote JA021, comprado em drogaria. O metotrexato foi preparado a partir da trituração do comprimido comercial Metrexato®, Blausiegel, lote 1004051. O IL-1Ra utilizado foi gentilmente cedido pelo Dr. Stephen Poole do National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Hertfordshire, UK.

3.3 Indução de artrite experimental

3.3.1 Artrite induzida por zimosana (AIZ)

O modelo de mono-artrite induzida por zimosana consiste na administração intra-articular (i.a.) de 10 µL de solução de zimosana, preparada em solução salina (NaCl 0,9%), na articulação tíbio-femoral direita de camundongos. Para a realização da curva dose e tempo resposta, foram preparadas as concentrações de 17, 50 e 150 µg de zimosana/10 µL. Os animais controle receberam apenas a administração de 10 µL de solução salina por articulação.

A avaliação da incapacitação articular neste modelo foi realizada após 3, 5, 7 e 24 horas da administração de zimosana i.a..

3.3.2 Artrite induzida por antígeno (AIA)

O modelo experimental de AIA consiste na imunização (IM) dos animais experimentais com a injeção subcutânea (s.c) de uma emulsão contendo 200 µL de volumes iguais de NaCl 0,9% e CFA, na qual foram dissolvidos 500 µg de mBSA. No sétimo dia após a primeira imunização é administrado um reforço com a mesma preparação (figura 3). O grupo falso-imunizado recebe o mesmo tratamento aplicado aos demais, porém sem a administração de mBSA. No vigésimo primeiro dia após a primeira imunização, os animais são desafiados com 10 µL de solução de mBSA, preparada em salina, na articulação tíbio-femoral direita. O grupo controle é desafiado apenas com 10 µL de solução salina i.a..

Para avaliação da incapacitação induzida pelo modelo, os animais foram desafiados com doses de 10, 30, 100 ou 300 µg/10 µL de mBSA. Os demais

experimentos se seguiram com a dose de 100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$. A incapacitação decorrente do modelo foi avaliada segundo os protocolos descritos em cada experimento.

Figura 3. Representação do protocolo experimental do modelo de AIA.

Imagem de PINTO, L.G., 2010.

3.4 Teste de incapacitação dinâmico (TID)

O aparelho, como pode ser visto nas figuras 1 e 2, consiste em um assoalho com sensores (A), afixado ao fundo de uma caixa acrílica de 11,5 x 19,7 x 11,5 cm (B). O sistema é conectado (C) a um software (D) onde fica registrada, em gramas, a média do peso que cada pata exerce sobre o assoalho, a cada aquisição. Todos os movimentos são filmados (E) e juntamente com o registro do software, validados pelo experimentador, de acordo com a posição do camundongo no aparelho.

Os animais foram submetidos ao teste sem ambientação prévia à caixa acrílica, uma vez que movimentos exploratórios melhoram a captação dos dados. Cada animal foi avaliado por 5 minutos, em cada tempo de leitura, podendo movimentar-se livremente durante este período, num espaço de 23 cm^2 . Os dados coletados foram analisados pelo experimentador no software do aparelho. A análise consiste em marcar, através das imagens filmadas, a pata correspondente ao conjunto de pixels reconhecido pelos sensores: pata direita ou esquerda. Foram excluídos da análise

testículos e cauda. Os resultados foram expressos em percentagem de peso entre a pata traseira ipsilateral (direita) e contralateral (esquerda), levando-se em conta o peso corporal do indivíduo testado.

3.5 Protocolos experimentais dos tratamentos farmacológicos

3.5.1 Preditividade farmacológica do TID em modelo de AIA

A fim de determinar a predictividade farmacológica do método de TID em detectar a incapacitação durante a artrite experimental, ou seja, a reprodução de efeitos farmacológicos observados na clínica foram usadas as seguintes drogas: anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor não seletivo de cicloxigenase (COX) 1 e 2, indometacina; inibidor seletivo de COX-2, etoricoxibe; anti-inflamatório esteroidal (AIE), dexametasona, droga antirreumática modificadora da doença (DMARD) metotrexato e anticorpo monoclonal anti- $\text{TNF}\alpha$, infliximab.

O protocolo experimental adotado está descrito na tabela 1. As drogas foram diluídas em solução de NaCl 0,9% estéril, exceto a indometacina, que foi preparada em tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,8. Os animais, pré tratados, foram avaliados no TID após 3, 5, 7, 24, 48 e 72 horas do desafio i.a. com mBSA.

Classificação farmacológica	Droga	Doses	Via de administração	Esquema posológico
AINE não seletivo	Indometacina	0,6/1,8/5 mg/kg	s.c.	30 minutos antes do desafio
AINE seletivo para COX-2	Etoricoxibe	5/15/45 mg/kg	s.c.	30 minutos antes do desafio
AIE	Dexametasona	0,5/1/2 mg/kg	s.c.	60 minutos antes do desafio
DMARD	Metotrexato	0,6/2/6 mg/kg	v.o.	1 vez por semana por 5 semanas
Imunobiológico	Infliximab	5/10/20 mg/kg	i.p.	48 horas e 60 minutos antes do desafio

Tabela 1. Representação do protocolo experimental utilizado para avaliar a preditividade do método de TID. s.c. – subcutâneo, i.p. – intraperitoneal, v.o. – via oral.

3.5.2 Análise farmacológica da participação das células da glia espinais no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA

Para o estudo da participação das células da glia presentes na medula espinal e no GRD, no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo experimental de AR, foi adotado o protocolo farmacológico descrito na tabela 2. Para tal, dois inibidores do metabolismo celular de astrócitos e microglia foram escolhidos: fluorocitrato e minociclina, respectivamente. Ambas as drogas foram administradas por via i.t., previamente ou posteriormente ao desafio i.a. com mBSA. A minociclina foi preparada em solução salina estéril. O fluorocitrato foi dissolvido inicialmente em HCl 2 M e, em seguida, diluído em salina estéril até obtenção da concentração desejada, com pH 7,2 (MILLIGAN *et al.*, 2003). Os sais de bário da droga foram precipitados com Na₂SO₄.

A incapacitação articular nos grupos experimentais pré-tratados foi avaliada pelo TID após 3, 6, 9 ou 24 horas do desafio i.a. Um grupo experimental distinto, previamente imunizado, foi desafiado e avaliado no TID após 6 horas. A seguir, os inibidores foram administrados por via i.t. e a incapacitação articular acompanhada após 2, 6 e 24 horas. Da mesma maneira, um grupo experimental, 24 horas após o desafio i.a., foi avaliado no TID e, em seguida, tratado com as drogas citadas. A incapacitação articular também foi acompanhada após 2, 6 e 24 horas.

Droga	Célula alvo	Doses	Pré tratamento	Pós tratamento
Fluorocitrato	Astrócito	0,3/1 nmol/5 µL	30 minutos antes do desafio	6 ou 24 horas após o desafio
Minociclina	Microglia	0,5/1,5 µmol/5 µL		

Tabela 2. Representação do protocolo experimental utilizado para avaliar a participação das células da glia espinais no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA.

3.5.3 Análise farmacológica de participação de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular em modelo de AIA

Com o intuito de avaliar o papel das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β e TNF α , na indução e manutenção da incapacitação articular em modelo de AIA, foram administrados, por via i.t., IL-1Ra e infliximab, segundo o protocolo experimental descrito na tabela 3. Ambas as drogas foram preparadas em solução salina. Foram realizados tratamentos prévios ou posteriores ao desafio i.a..

A incapacitação articular nos grupos experimentais pré-tratados foi avaliada pelo TID após 3, 6, 9 ou 24 horas do desafio i.a.. Um grupo experimental distinto, previamente imunizado, foi desafiado e avaliado no TID após 6 horas. A seguir, os inibidores foram administrados por via i.t. e a incapacitação articular acompanhada após 2, 6 e 24 horas. Da mesma maneira, um grupo experimental, 24 horas após o desafio i.a., foi avaliado no TID e, em seguida, tratado com as drogas citadas. A incapacitação articular também foi acompanhada após 2, 6 e 24 horas.

Droga	Citocina inibida	Dose	Pré tratamento	Pós tratamento
IL-1Ra	IL-1	300 μ g/5 μ L	30 minutos antes do desafio	6 ou 24 horas após o desafio
Infliximab	TNF		60 minutos antes do desafio	

Tabela 3. Representação do protocolo experimental utilizado para avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da incapacitação articular em modelo de AIA.

3.6 Coleta de amostras para ensaios moleculares

Animais, previamente imunizados e desafiados com mBSA i.a., foram submetidos ao procedimento a seguir, para coleta de amostras teciduais de medula e GRD, a fim de serem utilizadas em ensaios de qRT-PCR e Western Blotting. As coletas foram realizadas após 3, 6, 9 e 24 horas do desafio i.a..

Os animais foram anestesiados com isoflurano 2% e sacrificados por decapitação, sendo, em seguida, colocados em uma mesa cirúrgica própria. Foi realizada a tricotomia da região dorso-lombar, seguida de assepsia e antissepsia com etanol 70% e solução de iodo. Posteriormente, fez-se uma incisão póstero-mediana no animal, seguida de abertura, por planos, até a lâmina óssea. Após laminectomia, a região medular de interesse encontrava-se exposta, permitindo a coleta dos segmentos de medula entre as vértebras lombares 4 a 6, bem como os gânglios correspondentes. A região coletada corresponde a aferência de fibras nervosas sensitivas dos membros inferiores do animal. Apenas os GRD ipsilaterais foram coletados. As amostras foram armazenadas a -70°C até seu processamento.

3.7 Avaliação da expressão gênica: qRT-PCR

A expressão de RNAm para GFAP (marcador de ativação de astrócitos e células satélite), Iba1 (marcador de ativação microglial), IL-1 β e TNF α foi avaliada por RT-PCR em tempo real, em amostras de tecido medular, coletadas conforme o protocolo descrito em 3.6 e armazenadas em reagente de Trizol® (Ambion – Invitrogen Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, USA).

Para o processamento das amostras, o volume Trizol® foi completado para 750 μ L. Os tecidos foram triturados em alta rotação em Homogeneizer, IKA® T10 basic ultra-turrax.

A extração do RNA total foi realizada como se segue: Para cada 750 µL de suspensão (tecido + Trizol®), foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck), seguido de vigorosa agitação em vórtex. Estes tubos foram então centrifugados a 22.000 G por 15 minutos a 4° C e a fase aquosa, contendo RNA, foi transferida para outro tubo, contendo 500 µL de isopropanol (Merck) gelado. Seguiu-se uma nova centrifugação a 22.000 G por 15 minutos a 4 °C. Após este procedimento, o sobrenadante resultante foi descartado cuidadosamente, ficando aderido aos tubos o precipitado de RNA. A este precipitado foi adicionado 1 mL de etanol a 75%, seguido de agitação em vórtex. Esta solução foi centrifugada a 22.000 G por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante resultante, descartado cuidadosamente. Os tubos, abertos, foram colocados de forma invertida, sobre papel toalha para a secagem do excesso de etanol. O precipitado de RNA obtido foi ressuspenso em 20 µL de água livre de RNase. A concentração de RNA foi determinada através da densidade ótica no comprimento de onda de 260 nm, por meio do aparelho GeneQuant (Amersham Biosciences Corp., Piscataway). Cada 1 µg de RNA foi transcrito para cDNA por ação da enzima transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

A reação quantitativa do RT-PCR em tempo real foi feita usando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. O RT-PCR foi executado com volume final de 6,25 µL e mantido sobre 95°C (10 min), e mais 40 ciclos de 94°C (1 min), 56°C (1 min) e 72°C (2 min). A curva de fusão foi analisada (65-95°) 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 pares de *primers* para camundongos utilizados estão na tabela 4.

IL1 β	F	5' - TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC
	R	5' - TTGGAAGCAGCCCTTCATCT - 3'
TNF α	F	5' - AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG - 3'
	R	5' - GGCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA - 3'
GFAP	F	5' - TCTAAGGGAGAGCTGGCAGGGCT - 3'
	R	5' - AGGGCGAAGAAAACCGCATCACC - 3'
Iba1	F	5' - TGAGGAGCCATGAGCCAAAG - 3'
	R	5' - GCTTCAAGTTTGGACGCCAG - 3'
GAPDH	F	5' - CATCTTCTTGTGCAGTGCCA - 3'
	R	5' - CGGCCAAATCCGTTTAC - 3'

Tabela 4. Sequência dos pares de primers utilizados no ensaio de qRT-PCR.

F – forward, R – reverse.

3.8 Quantificação da expressão proteica por Western Blotting

A análise da expressão proteica dos marcadores de ativação glial: GFAP e Iba1 foi realizada por Western Blotting em amostras de tecido medular e GRD, coletadas conforme o protocolo descrito em 3.6.

As amostras foram homogeneizadas e lisadas em tampão *Rippa Buffer* contendo inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 20.000 g durante 10 minutos a 4° C. Uma alíquota do sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford.

Amostras do homogenato foram desnaturadas a 100° C durante 4 minutos. Em seguida, foram aplicadas (50 μ g por grupo) em gel de poliacrilamida (1,5 mm de espessura), na presença de SDS (SDS-PAGE), para separação por eletroforese. O gel

de separação foi de acrilamida 12% p/v para GFAP e 15% para Iba1 acrescido de bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,375 M, pH 8.8 e SDS 0,1% p/v. O gel de concentração foi de acrilamida a 4% p/v acrescido de bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,125 M, pH = 6,8 e SDS 0,1% p/v. A corrida do gel foi realizada sob voltagem constante de 100 V, utilizando-se o tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, pH = 8.3, glicina 192 mM e SDS 0,1% p/v.

As proteínas separadas por SDS-PAGE, foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 μ m (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram incubados no tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, 20% de metanol) por 10 minutos. A transferência foi realizada em sistema TransBlot turbo Biorad. Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em TCA 3%, para certificação de que houve transferência efetiva das proteínas. Em seguida, foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação por 3 horas, à temperatura ambiente, em solução tampão salina tris (TBS-T) contendo 5% (p/v) de leite desnatado (Molico®), sob agitação contínua. Após bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, por cinco minutos. Na sequência, foram incubadas durante toda a noite (overnight) com os anticorpos primários feito em camundongo anti-GFAP (1:500-Millipore) ou feito em coelho anti-Iba1 (1:200-Wako). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com TBS-T e em seguida incubadas com anticorpo IgG secundário conjugado à peroxidase anti-camundongo 1:3.000 ou anti-coelho 1:10.000 por 3 horas, a temperatura ambiente. Após estas incubações, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBS-T, por 5 minutos. Para a revelação, as membranas foram incubadas com uma mistura de reagentes do kit de quimiluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) e expostas no aparelho Quemi-Doc TM XRS+ (With Image Lab software), durante 10 minutos, conforme instrução do fabricante.

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelos métodos de variância a um ou dois critérios (ANOVA TWO e ONE-WAY), seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo as diferenças consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Onde se lê efeito tempo dependente, saiba-se que foi confirmado por meio do teste de ANOVA TWO-WAY de medidas repetidas. Nas análises em que isto aconteceu, seguiu-se o teste de ANOVA ONE-WAY ponto a ponto e pós teste de Bonferroni.

4. Resultados

4.1 O TID mostra-se sensível na detecção da incapacitação articular induzida por zimosana, e ao efeito farmacológico de um anti-inflamatório não-esteroidal

Como já citado anteriormente, a injeção i.a. de zimosana é um modelo bastante utilizado para induzir artrite experimental em animais. É um estímulo inflamatório que ativa a imunidade inata, com intensa migração de polimorfonucleares e macrófagos (KEYSTONE et al., 1977).

O TID mostrou-se sensível à detecção da incapacitação articular produzida por diferentes doses de zimosana, revelando redução de até 41% da função articular, 3 horas após a injeção de 150 µg/articulação, quando comparado ao valor basal de distribuição de peso do animal. Após 5 horas, a redução foi de 44% e após 7 horas, de 42%. Esse efeito foi significativo mesmo após 24 horas, embora menos acentuado, com redução de apenas 27% da função articular em relação ao valor basal dos indivíduos testados (figura 4A).

Uma vez que a incapacitação articular induzida pela zimosana é mediada por prostanóides (GUERRERO *et al.*, 2006), a avaliação da função articular foi realizada também, após a administração de indometacina, um inibidor não seletivo da COX. O TID foi capaz de detectar a recuperação de até 64% da função articular basal do animal, pré tratado com indometacina, 5 horas após a administração de zimosana (figura 4B). A recuperação da função articular pelo fármaco foi tempo dependente e se mostrou significativa desde 3 até 24 horas após a injeção de estímulo i.a..

Figura 4. Avaliação da incapacitação articular induzida por zimosana pelo método TID: efeito de um anti-inflamatório não-esteroidal **A.** Curva dose e tempo resposta de incapacitação após administração i.a. de zimosana 17, 50 ou 150 µg/articulação (art) ou veículo (10 µL/art) **B.** Curva tempo resposta de incapacitação em animais pré-tratados com indometacina (5 mg/kg, s.c.) ou veículo, 30 minutos antes da injeção i.a. de zimosana (150 µg/art) ou veículo. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre PTD – pata traseira direita (ipsilateral) e PTE – pata traseira esquerda (contralateral) e correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 10 animais por grupo. # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/zimosana.

4.2 O TID mostra-se sensível na detecção da incapacitação articular induzida pelo modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)

Neste modelo, o TID foi capaz de detectar alterações significativas na distribuição da carga entre os membros, de maneira dose e tempo dependentes. O sistema distinguiu satisfatoriamente a magnitude dos efeitos articulares provocados pelas diferentes doses de mBSA: 10, 30, 100 ou 300 µg/articulação (figura 5). O grupo veículo, também imunizado, recebeu 10 µL de solução estéril de NaCl 0,9% i.a. e o grupo falso-imune, imunizado apenas com CFA, recebeu 300 µg de mBSA i.a. Não houve diferença significativa de distribuição de carga entre o grupo veículo e o grupo falso-imune. A dose de mBSA de 100 µg/articulação foi a que produziu o efeito mais pronunciado, com redução de cerca de 40% da função articular 3 e 5 horas após o desafio e de até 43% após 7 e 24 horas, quando comparado ao valor basal de distribuição de carga do grupo. A perda de função articular diminuiu após 48 horas, com 33% de redução, e após 72 horas, com 24% de redução. Houve recuperação quase total da incapacitação após 96 horas do desafio i.a., com perda de apenas 9% de função articular. Cabe mencionar que a dose de 300 µg/articulação de mBSA não produziu efeitos na incapacitação diferentes da dose de 100 µg. Sendo assim, a dose de mBSA selecionada para os próximos experimentos foi de 100 µg/articulação, com efeito incapacitante entre 3 e 72 horas, mais pronunciado entre 7 e 24 horas após o desafio i.a.. Os resultados podem ser observados na figura 5 e mostram que o teste pode ser utilizado para o estudo incapacitação articular na AR, em modelo experimental de AIA.

Figura 5. Avaliação da incapacitação articular induzida pelo modelo de AIA pelo TID: Curva dose e tempo resposta do mBSA i.a. Animais previamente imunizados ou falso-imunes receberam injeção i.a. de mBSA nas doses de 10, 30, 100 ou 300 µg/articulação (art) ou salina (10 µL/articulação). Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. O grupo falso-imune recebeu apenas a dose de 300 µg de mBSA i.a.. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média ± E.P.M. de 11 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente ao grupo veículo.

4.3 O TID apresenta preditividade farmacológica no modelo de AIA

A fim de verificar se o TID é um método útil para estudar o efeito de diferentes tratamentos farmacológicos sobre a incapacitação induzida pelo modelo de AIA, foram realizados tratamentos com diferentes fármacos, utilizados rotineiramente na clínica para tratamento da AR. Foram eles: anti-inflamatórios não-esteroidal e esteroidal, um inibidor seletivo da COX-2, um DMARD e um imunobiológico.

O protocolo experimental adotado é descrito em 3.5.1 e na tabela 1.

4.3.1 Efeito da indometacina sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID

O primeiro fármaco utilizado para testar a capacidade preditiva do TID em detectar a incapacitação articular no modelo de AIA, foi a indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal. Utilizando o TID, foi observado que o tratamento com indometacina promove significativa recuperação da função articular a partir da quinta até a vigésima quarta hora após o desafio i.a. com antígeno, possibilitando o retorno aos níveis basais de movimentação do animal. Embora todas as doses tenham apresentado efeito significativo neste intervalo de tempo, a dose de 5 mg/kg foi a mais eficaz e capaz de recuperar até 100% da função articular após 5 e 7 horas do desafio i.a. e 96% após 24 horas (figura 6).

Figura 6. Efeito da indometacina sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID. Animais previamente imunizados foram pré-tratados com indometacina (indo) (0,6-1,8-5 mg/kg) ou veículo, 30 minutos antes da injeção i.a. de mBSA na dose de 100 µg/articulação ou salina (10 µL/articulação.) Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. Os resultados estão expressos em porcentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/mBSA.

4.3.2 Efeito do etoricoxibe sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID

A avaliação da sensibilidade do método de TID ao tratamento farmacológico da incapacitação articular em modelo de AIA seguiu com o uso de um fármaco inibidor seletivo da isoforma 2 da COX, o etoricoxibe.

A eficácia do tratamento com este anti-inflamatório na disfunção inflamatória articular foi mostrada pelo TID já partir da terceira hora após o desafio i.a. com mBSA, em que a dose de 45 mg/kg de etoricoxibe foi capaz de recuperar 100% da função articular do animal, após 3 e 7 horas do desafio, quando comparado ao valor basal de distribuição de peso do grupo. O efeito do etoricoxibe se manteve até a vigésima quarta hora após o desafio, com recuperação de 98% da incapacitação articular induzida pelo mBSA. A dose de 15 mg/kg teve efeito apenas entre a quinta e a sétima hora, e a dose de 5 mg/kg apenas após 5 horas do desafio, embora com eficácias reduzidas se comparadas à dose de 45 mg/kg. Os resultados podem ser observados na figura 7.

É importante salientar que, com objetivo de uso racional, a partir deste ensaio, não realizamos mais a medida de animais veículo, uma vez que o número de indivíduos testados era grande e em nenhum deles havia alteração da distribuição de peso decorrente da imunização ou da injeção do volume de veículo, em relação a seus valores basais.

Figura 7. Efeito do etoricoxibe sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID. Animais previamente imunizados foram pré-tratados com etoricoxibe (etori) (5, 15 ou 45 mg/kg) ou veículo, 30 minutos antes da injeção i.a. de mBSA na dose de 100 µg/articulação ou salina (10 µL/articulação.) Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/mBSA.

4.3.3 Efeito da dexametasona sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID

Dando prosseguimento à avaliação da sensibilidade do TID ao efeito de fármacos anti-inflamatórios sobre a incapacitação articular induzida pelo modelo de AIA, foi testado um fármaco anti-inflamatório esteroide, ou glicocorticoide, a dexametasona.

O método mostrou sensibilidade em avaliar o efeito da dexametasona entre a quinta e a vigésima quarta hora após o desafio i.a. com mBSA, em que, a dose de 2 mg/kg foi capaz de recuperar a distribuição de peso do animal até seus níveis basais, durante todo o período. A dose de 1 mg/kg teve efeito recuperador da função articular entre a terceira e a sétima hora após o desafio, com eficácia mais discreta que a dose anteriormente citada, embora ainda significativa, com recuperação de 98% da função articular após 3 horas e 66% após 7 horas do desafio. Os resultados podem ser observados na figura 8.

Figura 8. Efeito da dexametasona sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID. Animais previamente imunizados foram pré-tratados com dexametasona (dexa) (0,5-1-2 mg/kg) ou veículo, 60 minutos antes da injeção i.a. de mBSA na dose de 100 µg/articulação ou salina (10 µL/articulação.) Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/mBSA.

4.3.4 Efeito do metotrexato sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID

Os DMARDs são os fármacos de escolha no tratamento da AR. Por isto, a avaliação da sensibilidade do TID aos tratamentos clássicos da AR, prosseguiu com o tratamento dos animais com o mais usados dos DMARDs, o metotrexato.

Conforme pode ser observado na figura 9, o tratamento com o metotrexato foi capaz de reverter a incapacitação articular induzida pelo modelo de AIA desde a terceira até a vigésima quarta hora após o desafio i.a. com mBSA. A dose de 6 mg/kg recuperou cerca de 85% da disfunção articular entre 3 e 5 horas e 100% após 7 horas do desafio. Seu efeito ainda se manteve até a vigésima quarta hora, embora reduzido, com recuperação de 74% da incapacitação articular induzida pelo mBSA. As doses menores, de 0,6 e 2 mg/kg de metotrexato, só foram eficazes após 5 horas do desafio i.a., e ainda assim, seu efeito foi mais discreto que a dose maior, uma vez que recuperaram apenas cerca de 63% da função articular.

Figura 9. Efeito do metotrexato sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID. Animais previamente imunizados foram pré-tratados com metotrexato (MTX) (0,6-2-6 mg/kg) ou veículo, 1 vez por semana por 5 semanas. Na sexta semana, foi realizada a injeção i.a. de mBSA na dose de 100 µg/articulação ou salina (10 µL/articulação.) Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/mBSA.

4.3.5 Efeito do infliximab sobre a incapacitação articular induzida por modelo de AIA e avaliado pelo TID

Para finalizar a avaliação da preditividade do TID no estudo do efeito de fármacos usados para o tratamento da AR sobre a incapacitação articular induzida pelo modelo de AIA, foi administrado o infliximab, anticorpo monoclonal parcialmente humanizado anti-TNF α .

Mais uma vez, o TID foi capaz de mostrar com sensibilidade a recuperação da incapacitação articular promovida pelo tratamento com o fármaco. A dose de 20 mg/kg foi a mais eficaz, sendo capaz de restaurar a distribuição de peso do animal a seus níveis basais, mesmo após 72 horas de desafio i.a. com mBSA. Esse foi o tratamento com efeito mais prolongado dentre os fármacos avaliados, com recuperação da função articular do animal desde 3 até 72 horas após o desafio. Foram restaurados 82% da função articular 3 horas após o desafio, 74% após 5 horas e 98% após 7 horas. O efeito do infliximab ainda se manteve com recuperação de 79% da função articular após 24 horas e 73% após 48 horas do desafio i.a. com mBSA. A dose de 10 mg/kg foi eficaz apenas após 7 horas do desafio e com eficácia reduzida em relação a dose de 20 mg/kg.

Figura 10. Efeito do infliximab sobre a incapacitação articular no modelo de AIA determinada pelo TID. Animais previamente imunizados foram pré-tratados com infliximab (infix) (5, 10 ou 20 mg/kg) ou veículo, 48 horas e 60 minutos antes da injeção i.a. de mBSA na dose de 100 µg/articulação ou salina (10 µL/articulação.) Após os tempos indicados, a incapacitação articular foi avaliada pelo TID. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre a pata traseira direita (PTD - ipsilateral) e a pata traseira esquerda (PTE - contralateral) e correspondem à média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo/mBSA.

4.4 As células da glia espinais participam da incapacitação articular induzida por modelo de AIA

4.4.1 Efeito da inibição farmacológica das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA

A avaliação da participação das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA iniciou por meio da inibição farmacológica de astrócitos e microglia por via i.t.. Para tal, foram utilizados o fluorocitrato, inibidor de astrócitos, e a minociclina, inibidora de microglia. O fluorocitrato, nas doses utilizadas, é um inibidor da enzima aconitase e promove o acúmulo de citrato na célula, bem como a paralisação do ciclo de Krebs (MILLIGAN, 2003; HAYAKAWA, 2010). Já a minociclina, uma tetraciclina de segunda geração, em ação distinta da antibacteriana, inibe o metabolismo e a proliferação da microglia (MIKA, 2008). O protocolo experimental adotado está descrito em 3.5.2 e na tabela 2.

Tanto a inibição de astrócitos, como da microglia, reverteu a incapacitação articular induzida pela injeção i.a. de mBSA em modelo de AIA, com avaliação no TID. Quando administrados 30 minutos antes do desafio i.a., fluorocitrato (figura 11A) e minociclina (figura 11B) recuperaram a função articular por até 6 horas. Fluorocitrato 1 nmol/5 µL reverteu em até 96% a incapacitação articular 6 horas após o desafio e a minociclina, na dose de 1,5 µmol/5 µL, recuperou a função articular em até 67%, também 6 horas após o desafio, quando comparados ao valor basal de distribuição de peso do grupo. Ambas as drogas tiveram efeito apenas entre 3 e 6 horas, sem qualquer efeito após este tempo, mesmo quando testado até 72 horas (fluorocitrato).

Uma vez que ambos os inibidores agiram apenas até 6 horas, um pós tratamento foi realizado neste tempo. Animais previamente imunizados foram desafiados e avaliados no TID após 6 horas do desafio. Seguindo a avaliação, fluorocitrato na concentração de 1 nmol/5 µL e minociclina na concentração de 1,5

$\mu\text{mol}/5 \mu\text{L}$, também por via i.t., foram administrados. Todos os animais apresentaram redução importante da função articular após 6 horas do desafio, segundo já observado neste trabalho. Mas após a administração das drogas, essa incapacitação foi revertida em até 36% pelo fluorocitrato, após 2 horas da sua administração, e 43% após 6 horas, quando comparados ao valor basal do grupo. A minociclina possibilitou recuperação de cerca de 39 e 47% da função articular após 2 e 6 horas, respectivamente. Nenhuma das duas drogas teve qualquer efeito após 24 horas de sua administração ou 48 horas de desafio, seguindo o mesmo perfil farmacológico observado no pré-tratamento. Os resultados podem ser observados na figura 11C.

A fim de elucidar se a glia estava participando apenas nas primeiras horas de indução do modelo ou se a farmacocinética da droga a permitia agir por apenas 24 horas, um segundo pós-tratamento foi realizado. Um terceiro grupo de animais, imunizados, foi desafiado e avaliado no TID após 24 horas. O tratamento com as drogas foi realizado da mesma maneira que o anterior, seguido à leitura dos animais no TID. Não houve qualquer efeito das drogas após 2 horas de sua administração. Mas após 6 e 24 horas, a recuperação da função articular por inibição das células gliais foi significativa. O fluorocitrato foi capaz de recuperar a distribuição de peso entre os membros do animal até seus níveis basais, 6 horas após sua administração. Mesmo após 24 horas, ainda manteve a recuperação de 86% da função articular, quando comparado ao valor basal do grupo. Já a minociclina promoveu recuperação da incapacitação articular de até 92% após 6 horas e 81% após 24 horas, também quando comparado ao valor basal do grupo, como pode ser observado na figura 11D.

Figura 11. Efeito da inibição farmacológica das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA. A e B. Curva dose e tempo resposta de incapacitação no TID em animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a.. O grupo falso imune foi desafiado com 100 µg de mBSA i.a.. 60 minutos antes do desafio, foram realizados tratamentos i.t. com fluorocitrato 0,3 ou 1 nmol/5 µL (**A**) ou minociclina 0,5 ou 1,5 µmol/5 µL (**B**). **C.** Outro grupo de animais foi avaliado após 6 horas do desafio e recebeu injeções i.t. fluorocitrato 1 nmol/5 µL ou minociclina 1,5 µmol/5 µL. **D.** Um terceiro grupo foi avaliado após 24 horas do desafio e recebeu o mesmo tratamento anterior (C). Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre PTD – pata traseira direita (ipsilateral) e PTE – pata traseira esquerda (contralateral) e correspondem à média ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo e * quando comparado ao grupo veículo/mBSA.

4.4.2 Avaliação da expressão gênica de marcadores de ativação glial em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA

A primeira abordagem molecular utilizada para a confirmação dos dados farmacológicos obtidos foi o qRT-PCR. A coleta das amostras está descrita em 3.6 e a metodologia adotada em 3.7.

A expressão gênica de GFAP, marcador de ativação astrocítica e Iba1, marcador de ativação microglial, foram verificadas após 3, 6, 9 e 24 horas do desafio i.a. com mBSA em amostras de medula submetidos ao modelo de AIA. O método de qRT-PCR revelou aumento da expressão gênica de marcadores de ativação glial tanto de astrócitos como de microglia, entre a sexta e a nona hora posteriores ao desafio i.a.. O pico de expressão de RNAm para GFAP foi em 9 horas, apesar de apresentar aumento a partir de 6 horas após o desafio (figura 12A). A microglia é ativada, neste modelo, mais tardiamente, apresentando aumento da expressão de RNAm para Iba1 somente após 9 horas do desafio i.a., como pode ser observado na figura 12B.

Figura 12. Avaliação da expressão gênica de marcadores de ativação glial por qRT-PCR em amostras de animais submetidos ao modelo de AIA. Expressão de RNAm para GFAP por qRT-PCR em medula de animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a.. O grupo falso imune foi desafiado com 100 µg de mBSA i.a.. **B.** Iba1. Os resultados estão expressos em correlação entre marcador endógeno (GAPDH) e o gene alvo e correspondem a média ± E.P.M. de 7 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo.

4.4.3 Avaliação da expressão proteica de marcadores de ativação glial em amostras de medula e DRG de animais submetidos ao modelo de AIA

Seguindo na avaliação molecular para determinar a ativação glial em amostras de animais submetidos a modelo de AIA, a expressão de GFAP e Iba1 foi verificada por meio de Western Blotting. A coleta das amostras está descrita em 3.6 e a metodologia aplicada em 3.8. Para Western Blotting foram coletados tanto a medula como os gânglios correspondentes ao segmento entre L4 e L6.

A ativação das células da glia espinais e no GRD, em modelo de AIA, foi mais uma vez evidenciada pelo aumento da expressão proteica de GFAP e Iba1 nas amostras analisadas. Segundo a quantificação dos dados obtidos por Western Blotting, a ativação astrócítica inicia-se a partir de 6 horas do desafio i.a. com mBSA e tem sua expressão máxima após 9 horas (figura 13), corroborando com os dados observados na expressão gênica por qRT-PCR. Já a microglia, por meio de seu marcador Iba1, revela ativação mais acentuada na vigésima quarta hora após o desafio i.a. com mBSA, como pode ser observado na figura 14.

Da mesma maneira que os astrócitos espinais, as células satélite também são ativadas em modelo de AIA. Houve aumento da expressão de GFAP em amostras de gânglio coletadas a partir de 6 horas e até 9 horas após o desafio i.a., como mostra a figura 15.

Figura 13. Avaliação da expressão proteica de GFAP por Western Blotting em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA. Amostras de medula de animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a. foram coletadas e analisadas por Western Blotting, com marcação para GFAP. O grupo falso imune foi desafiado com 100 µg de mBSA i.a.. Os resultados estão expressos em densidade ótica da banda da proteína alvo em relação a banda do veículo e correspondem a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo.

Figura 14. Avaliação da expressão proteica de Iba1 por Western Blotting em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA. Amostras de medula de animais previamente imunizados e desafiados com 100 μ g de mBSA i.a. foram coletadas e analisadas por Western Blotting, com marcação para Iba1. O grupo falso imune foi desafiado com 100 μ g de mBSA i.a.. Os resultados estão expressos em densidade ótica da banda da proteína alvo em relação a banda do veículo e correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 5 animais por grupo. * P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo.

Figura 15. Avaliação da expressão proteica de GFAP por Western Blotting em amostras de gânglio de animais submetidos ao modelo de AIA. Amostras de gânglio de animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a. foram coletadas e analisadas por Western Blotting, com marcação para GFAP. O grupo falso imune foi desafiado com 100 µg de mBSA i.a.. Os resultados estão expressos em densidade ótica da banda da proteína alvo em relação a banda do veículo e correspondem a média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo.

4.5 A inibição de citocinas pró-inflamatórias espinais reverte a incapacitação articular induzida por modelo de AIA

4.5.1 Efeito da inibição farmacológica de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular induzida por modelo de AIA

É descrito na literatura que, em diversos modelos experimentais de dor crônica, a glia ativada libera especialmente IL-1 β e TNF α a nível espinal (MILLIGAN *et al.*, 2005). Uma vez confirmada a ativação da glia no modelo de AIA, procedeu-se a avaliação da participação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α na incapacitação articular induzida pelo modelo e avaliada no TID. Para tal, as citocinas foram inibidas por meio da administração i.t. de IL-1Ra e infliximab, segundo o protocolo experimental descrito em 3.5.3 e na tabela 3.

Assim como a inibição farmacológica das células da glia, a inibição de IL-1 β e TNF α a nível espinal reverteu parcialmente a incapacitação articular induzida pela injeção i.a. de mBSA em modelo de AIA. O pré-tratamento com IL-1Ra foi capaz de reduzir a disfunção articular durante todo o período de avaliação, desde a terceira até a vigésima quarta hora após o desafio. Foram recuperados cerca de 50% da função articular do animal entre a terceira e a sexta hora após o desafio, 65% após 9 horas e 56% após 24 horas, quando comparados ao valor basal de distribuição de peso do grupo. Quando pré-tratado com infliximab, o animal submetido ao modelo de AIA teve sua função articular recuperada em 33% após 6 horas do desafio e cerca de 45% entre a nona e a vigésima quarta hora seguintes. Diferentemente de IL-1Ra, não houve qualquer efeito do infliximab sobre a incapacitação articular nas primeiras 3 horas após o desafio. Os resultados podem ser observados na figura 16A.

Da mesma maneira que o grupo experimental tratado com inibidores das células gliais espinais, os animais tratados com IL-1Ra e infliximab 6 horas após o desafio i.a. com mBSA tiveram sua função articular recuperada entre a segunda e a

sexta hora após a administração do fármaco, sem qualquer efeito após 24 horas. O tratamento com IL-1Ra foi capaz de recuperar a incapacitação articular dos indivíduos testados em até 91% 6 horas após sua administração, quando comparado ao valor basal de distribuição de peso do grupo. Já a administração de infliximab permitiu reversão de 75% da disfunção articular após 2 horas e 84% após 6 horas de sua administração, também quando comparado ao valor basal do grupo (figura 16B).

Quando submetidos ao tratamento 24 horas após o desafio i.a. com mBSA, os grupos experimentais que receberam IL-1Ra e infliximab também revelaram perfil farmacológico semelhante ao observado no tratamento da incapacitação articular com inibidores das células gliais. Quando administrados 24 horas após o desafio, os fármacos foram capazes de recuperar a incapacitação articular dos indivíduos testados durante todo o período de avaliação no TID, ou seja, desde a segunda até a vigésima quarta hora após sua administração. Enquanto que o tratamento com infliximab promoveu recuperação de cerca de 63% da função articular durante todo o período analisado, o IL-1Ra foi capaz de recuperar os níveis basais de movimentação do animal, mesmo após 24 horas de sua administração, como pode ser observado no figura 16C.

Figura 16. Efeito da inibição farmacológica de citocinas pró-inflamatórias a nível espinal na incapacitação articular induzida por modelo de AIA. **A.** Animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a., receberam tratamento i.t. com IL-1Ra 300 µg/5 µL 30 minutos antes do desafio i.a. ou com infliximab 300 µg/5 µL 60 minutos antes do desafio. O grupo falso imune foi desafiado com 100 µg de mBSA i.a.. 30 minutos antes do desafio **B.** Outro grupo de animais foi avaliado após 6 horas do desafio e recebeu IL-1Ra ou infliximab 300 µg/5 µL por via i.t. **C.** Um terceiro grupo foi avaliado após 24 horas do desafio e recebeu o mesmo tratamento anterior. Os resultados estão expressos em percentagem de peso exercida entre PTD – pata traseira direita (ipsilateral) e PTE – pata traseira esquerda (contralateral) e correspondem à média ± E.P.M. de 6 animais por grupo. # $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor correspondente do grupo veículo e * quando comparado ao grupo veículo/mBSA.

4.5.2 Avaliação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em amostras de medula e DRG de animais submetidos ao modelo de AIA

Para reforçar os dados obtidos nos testes farmacológicos, a expressão gênica de IL-1 β e TNF α foi avaliada em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA coletadas após 3, 6, 9 e 24 horas do desafio i.a. com mBSA segundo a descrição realizada em 3.6 e 3.7.

A expressão de RNAm tanto para IL-1 β como para TNF α está aumentada de 2 a 4 vezes nas amostras de medula analisadas. O RNAm para IL-1 β está mais expresso a partir da terceira até vigésima 24 horas após o desafio i.a. com mBSA, embora esse aumento seja mais expressivo entre 6 e 9 horas. Mais tardiamente, pode ser observado o aumento da expressão de RNAm para TNF α , especialmente a partir de 6 e até 24 horas, com maior expressão 9 horas após o desafio. Os resultados podem ser observados na figura 17.

Figura 17. Avaliação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias por qRT-PCR em amostras de animais submetidos ao modelo de AIA. A. Expressão de RNAm para IL-1β por qRT-PCR em medula de animais previamente imunizados e desafiados com 100 µg de mBSA i.a. ou salina. **B.** Idem para TNFα. Os resultados estão expressos em correlação entre marcador endógeno (GAPDH) e o gene alvo e correspondem a média ± E.P.M. de 7 animais por grupo.

5. Discussão

Um bom modelo experimental deve contar com métodos de avaliação eficazes de seus parâmetros. Esta é uma observação importante quando se faz necessária a avaliação da nocicepção e da incapacitação em animais experimentais. O desafio é ainda maior quando a avaliação é da função articular, uma vez que as respostas exibidas pelo animal são de difícil interpretação e requerem um bom treinamento do experimentador. A correlação entre a resposta comportamental observada nos testes pré-clínicos e a resposta clínica é baixa. Prova disso é que muitos candidatos a fármacos falham antes de chegarem aos testes clínicos e 80% dos que chegam a ser testados em humanos, falham em fase III (BASBAUM *et al.*, 2006), principalmente porque os resultados de eficácia foram baseados em testes pré-clínicos inadequados (TÉTREAUULT *et al.*, 2011). O estabelecimento de novos critérios aos testes animais é fundamental para que processos inflamatórios articulares possam continuar sendo estudados, entendidos e resolvidos. Buscando contribuir neste sentido, este trabalho realizou a padronização do teste de incapacitação dinâmico (TID) para avaliação da incapacitação articular em modelos experimentais de artrite.

O TID mostrou ser uma ferramenta sensível para a avaliação da incapacitação articular em modelos experimentais de artrite e AR. Enquanto o Von Frey eletrônico quantifica a hipersensibilidade articular, o TID revela a incapacitação presente. A perda de função faz parte do correto entendimento da fisiopatologia do processo inflamatório articular. Por isso, o TID surge como um método complementar ao Von Frey eletrônico e corrobora com o avanço na avaliação de parâmetros pré-clínicos. Deve-se ressaltar que não é possível comparar os dois métodos, uma vez que analisam parâmetros diferentes, e um não é substitutivo ao outro.

Em relação a outros métodos, o TID oferece como principal vantagem, a ausência de interferência do experimentador, o que faz dele um teste diferencial no estudo de funções articulares. Excetuando-se a manipulação do animal, toda a avaliação do indivíduo é realizada pelo sistema do aparelho. A análise dos dados, embora seja realizada pelo experimentador, apenas direciona o software em relação a

posição do animal na caixa acrílica, que já está gravada em imagens, e não permite qualquer alteração nos dados coletados. Além disso, o maior tempo de observação do animal no TID (5 minutos) em relação ao TIE (10 segundos) é importante para que a incapacitação seja corretamente analisada. Outra característica importante do método é que a livre movimentação reduz a possibilidade de analgesia induzida pelo stress nos indivíduos testados (BUTLER *et al.*, 2009). Mas é necessário que os processos analisados no TID sejam unilaterais, e no caso da artrite, mono-articulares, uma vez que o método avalia a redistribuição de peso entre as patas do animal, quando um dos membros está afetado. Este trabalho é de extrema relevância no contexto da avaliação articular, uma vez que só existem duas referências bibliográficas citando o método do TID e ambas para avaliação do processo nociceptivo em patas traseiras de animais experimentais (TÉTREAUULT *et al.*, 2011; ROBINSON *et al.*, 2012).

Para a avaliação da sensibilidade do método de TID em detectar a perda de função articular, foi escolhido inicialmente um estímulo inflamatório clássico: a zimosana. Ela tem sido usada como modelo de inflamação articular desde 1977. É capaz de induzir artrite inflamatória crônica, com infiltrado de células mononucleares, hipertrofia sinovial e formação de *pannus* (KEYSTONE *et al.*, 1997). A literatura já havia demonstrado a capacidade da zimosana em induzir hipersensibilidade articular (GUERRERO *et al.*, 2006), mas poucos trabalhos mostram a incapacitação decorrente dela. Utilizando o TID, a perda de função articular, induzida por zimosana, em articulação tíbio-femoral de animais experimentais, pôde ser analisada. Houve redução significativa da função articular entre a terceira e a sétima hora após a injeção do estímulo inflamatório, e ainda na vigésima quarta hora, embora menos acentuada do que o observado nas primeiras horas após a indução do modelo. Este mesmo perfil é mostrado por GUERRERO *et al.* 2006, em relação a hipersensibilidade em modelo de AIZ. Quando os animais foram pré-tratados com indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, houve recuperação da incapacitação articular desde a terceira até a vigésima quarta hora após a

administração i.a. de zimosana. De fato, a indometacina reduz a síntese de prostanóides, principais mediadores da hipersensibilidade decorrente do modelo, bem como a migração leucocitária (NIELSEN & BENNEDSEN, 1983), que juntamente com o edema, dificulta a movimentação da articulação. Assim sendo, o método do TID foi capaz de mostrar sensivelmente a perda de função articular induzida por zimosana e a recuperação promovida por fármaco anti-inflamatório, demonstrando que pode ser útil no estudo da incapacitação decorrente de processos inflamatórios articulares.

Dentre as doenças inflamatórias articulares, a AR, juntamente com a osteoartrite, são as doenças mais incidentes e as principais causadoras de dor crônica e incapacitação (VOLTARELLI, 2009). Os resultados apresentados demonstraram que o TID é um método útil para o estudo da incapacitação em modelo experimental de AR, e da eficácia de tratamentos farmacológicos que intervenham neste importante sinal clínico, seja alterando o desenvolvimento e progressão da doença, como os DMARDs e imunobiológicos, ou reduzindo a produção de mediadores decorrentes do processo inflamatório e responsáveis pela sensibilização das fibras nociceptivas articulares, como os anti-inflamatórios.

O modelo de AIA reproduz as características de uma artrite autoimune, com intenso infiltrado celular, formação de *pannus* e liberação de diversos mediadores inflamatórios (GRIFFITHS *et al.*, 1992). Além disto, apresenta um perfil de resposta imunológica adaptativa, com participação principalmente de linfócitos Th17 (BOISSIER *et al.*, 2008). Neste trabalho, é mostrada a sensibilidade do TID na detecção da incapacitação articular neste modelo. A administração i.a. de 100 µg/articulação de mBSA promoveu redução da função articular desde 3 até 72 horas após o desafio, com efeito máximo entre a terceira e a vigésima quarta hora. O mesmo perfil inflamatório já foi observado por PINTO, *et al.*, 2010, em que 30 µg de mBSA por articulação promoveram redução do limiar nociceptivo avaliado em Von Frey eletrônico. Diferentes doses de mBSA foram avaliadas. Quando o animal foi desafiado com doses menores, de 10 ou 30 µg/articulação, o TID não foi capaz de revelar

incapacitação articular significativa. Talvez estas doses não provoquem um processo inflamatório intenso o suficiente para induzir incapacitação ou a sensibilidade do método exija um estímulo inflamatório mais intenso. De fato, quando animais submetidos a modelos experimentais de osteoartrite, doença na qual o processo inflamatório é crônico e menos acentuado que durante a AR, não se observa qualquer alteração na distribuição de peso dos animais (QUADROS *et al.*, dados não publicados). Já com as doses maiores de mBSA, de 100 ou 300 µg/articulação, houve redução acentuada da função articular. Embora a dose de 300 µg tenha acompanhado parcialmente a incapacitação observada com a dose de 100 µg, seu efeito foi menor. Isto pode estar relacionado à difícil diluição de altas doses de mBSA em solução salina ou a algum mecanismo intrínseco do animal. É possível também que a dose de 100 µg já promova o máximo de resposta inflamatória do tecido, tornando semelhante qualquer efeito de doses maiores.

A incapacitação observada em ambos os modelos: AIZ ou AIA é possivelmente decorrente dos seguintes fatores: inflamação, hipersensibilidade e dor espontânea. O processo inflamatório gera edema e dificuldade de movimentação da articulação e a hipersensibilidade altera a força com que o membro afetado toca a superfície de apoio, pois ocorre ativação da fibra nociceptiva decorrente da simples movimentação da articulação. Somado a isso, alguns mediadores inflamatórios liberados, além de sensibilizar, podem também ativar diretamente os nociceptores, causando dor espontânea. Neste contexto, um dos mais importantes é a bradicinina. De fato, resultados não apresentados nesta dissertação mostram que animais deficientes para os receptores B1 e B2 apresentam incapacitação articular reduzida quando submetidos ao modelo de AIA (QUADROS *et al.*, dados não publicados).

A pesquisa de base utiliza ferramentas farmacológicas que modificam o perfil da doença, assim como, testa novos fármacos, candidatos ao tratamento da patologia alvo. No sentido de contribuir para o aperfeiçoamento dos estudos de base e pré-clínicos da fisiopatologia e tratamento da AR, o TID foi avaliado quanto à sua

sensibilidade em detectar o efeito farmacológico de drogas usualmente utilizadas para o tratamento da doença. O método foi considerado eficaz em avaliar a recuperação da incapacitação articular em animais experimentais tratados com indometacina, etoricoxibe, dexametasona, metotrexato e infliximab. Todos os fármacos testados foram capazes de recuperar a função articular dos indivíduos analisados até seu valor basal de distribuição de peso, mostrando que a incapacitação gerada em modelo de AIA é decorrente majoritariamente do processo inflamatório instaurado. Os tratamentos foram eficazes desde a terceira até a vigésima quarta hora após o desafio i.a. com mBSA, exceto o infliximab, com o qual, a função articular foi recuperada durante todo o período avaliado (3 a 72 horas). Esse efeito é explicado pelo fato de que o TNF α é um mediador central no desenvolvimento da AR (VINAY & KWON, 2012). Animais nocaute para esta citocina não desenvolvem a doença (MORI *et al.*, 1996). Uma vez que inibe a ação do TNF α , o infliximab impede o desenvolvimento do processo inflamatório no modelo e a incapacitação decorrente dele. Além de eficácia clínica, todos os fármacos avaliados têm ação analgésica e anti-inflamatória em modelo de AIA, descrita na literatura. PENG *et al.*, 2012 mostra uma redução da hipersensibilidade articular induzida pelo modelo de AIA em camundongos tratados com indometacina. IMHOF *et al.*, 2011 mostra que a dexametasona reduz a hipersensibilidade térmica e mecânica induzida pelo modelo de AIA, bem como o edema articular. O infliximab também já é descrito reduzindo o processo inflamatório no modelo (BOETTGER *et al.*, 2008), bem como o metotrexato (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Desde 1991, quando GARRISON descreveu a participação das células da glia na dor, diversos trabalhos surgiram mostrando seu papel em vários modelos, como na dor inflamatória, pós cirúrgica e especialmente na neuropatia (MELLER *et al.*, 1994, WATKINS *et al.*, 1997; WATKINS *et al.*, 2001). Mas em modelos de AR, poucos estudos foram feitos, especialmente avaliando a relação da glia com a incapacitação articular, e nenhum deles mostra a ativação destas células em função do tempo. Por

meio do TID, buscou-se a investigação da participação das células da glia espinais na incapacitação articular induzida por modelo de AIA. Para tal, foram utilizados dois inibidores clássicos da função glial: fluorocitrato e minociclina. O fluorocitrato, nas doses utilizadas, é um inibidor da enzima aconitase, que exerce papel fundamental no metabolismo do astrócito, e uma vez inibida, promove o acúmulo de citrato na célula, bem como a paralisação do ciclo de Krebs (MILLIGAN, 2003; HAYAKAWA, 2010). Já a minociclina, uma tetraciclina de segunda geração, em ação distinta da antibacteriana, inibe o metabolismo e a proliferação da microglia (MIKA, 2008). Tanto a inibição de astrócitos, como da microglia, reverteu a incapacitação articular induzida pela injeção i.a. de mBSA.

Quando o tratamento com fluorocitrato e minociclina foi realizado previamente ao desafio com mBSA, houve redução da incapacitação articular durante as seis primeiras horas após injeção i.a. de mBSA. Isso mostra que a glia está participando da incapacitação no modelo, já nas fases iniciais do processo inflamatório. Mas o resultado obtido gera também duas questões. A partir de 6 horas após o desafio, não há mais participação da glia e esta se restringe apenas as primeiras horas após a indução do processo inflamatório ou a efetividade das drogas administradas está limitada a aproximadamente 6 horas? A fim de responder estas questões, os inibidores foram administrados 6 horas após o desafio i.a. com mBSA. Houve redução da incapacitação articular por até 6 horas após a administração das drogas e 12 horas após o desafio i.a., mostrando que não apenas em fases iniciais, mas pelo menos por 12 horas, as células gliais estão participando da incapacitação inflamatória articular. Entretanto, uma vez que não houve efeito dos inibidores 24 horas após a administração das drogas ou 30 horas após a indução do modelo, permaneceram as mesmas questões: a glia ainda participa nos períodos mais tardios da inflamação ou a droga está perdendo seu efeito após 6 horas de sua administração? Para responder estes questionamentos, os inibidores foram administrados após 24 horas de desafio i.a. com mBSA. Não houve redução da incapacitação articular 2 horas após o

tratamento com os inibidores, embora a redução da disfunção articular tenha sido significativa após 6 e por até 24 horas após a administração das drogas. Este resultado permite a conclusão de que a glia participa da incapacitação em modelo de AIA tanto em fases iniciais como tardias do processo inflamatório articular e que de fato, o efeito do tratamento com fluorocitrato e minociclina neste contexto dura aproximadamente 6 horas. Os últimos dados, no entanto, trazem algumas contradições. Não houve redução da incapacitação articular nas duas primeiras horas após a administração das drogas, como observado nos tratamentos anteriores. É possível que neste ponto, haja uma ação intensa de mediadores inflamatórios liberados em nível central, mesmo que a participação da glia esteja reduzida. Neste período a sensibilização dos neurônios primários e secundários já está estabelecida e a glia já liberou seus produtos pró-inflamatórios, que potencializam o processo doloroso articular. Contrapondo com este dado, a incapacitação articular foi significativamente reduzida após 6 e 24 horas da administração das drogas ou 30 e 48 horas após a indução do processo inflamatório articular. O perfil observado pode, entretanto, não se dever à inibição da ativação glial e sim ao fato de que, após este período, o processo inflamatório comece a ser resolvido e a incapacitação articular esteja reduzida, como observado anteriormente em praticamente todos os ensaios deste trabalho. Além disso, embora os inibidores escolhidos tenham maior seletividade ao tipo celular relatado e ajam prioritariamente pelos mecanismos de ação descritos, eles não são totalmente seletivos e podem ter efeito também sobre outros tipos celulares e/ou vias inespecíficas.

A participação das células gliais na incapacitação articular implica que estejam ativadas, pois deste modo, liberam produtos pró-inflamatórios. Até que esteja ativada, a glia tem papel pequeno ou nulo na dor, mas sua ativação é suficiente para gerar e manter a hipersensibilidade dolorosa durante processos patológicos (MELLER *et al.*, 1994, WATKINS *et al.*, 1997; WATKINS *et al.*, 2001). A ativação glial pode ser avaliada por meio de alguns marcadores, dentre eles o GFAP em astrócitos e células

satélite e Iba1 na microglia. O astrócito expressa GFAP mesmo em condições basais, mas esta expressão é aumentada proporcionalmente à ativação da célula (SWEITZER *et al.*, 1999; GAO & JI, 2010). O mesmo acontece com as células satélite, embora em condições basais expressem pouco ou nenhum GFAP (OHARA *et al.*, 2009). Da mesma maneira, a microglia expressa Iba1 proporcionalmente à sua ativação (RAGHAVENDRA *et al.*, 2003). São marcadores clássicos, amplamente citados na literatura. Tanto a técnica de qRT-PCR como o Western Blotting confirmaram que as células da glia estão sendo ativadas durante o processo inflamatório articular em modelo de AIA. O aumento da expressão gênica ou proteica de GFAP e Iba1 pôde ser observado por meio de ambos os métodos. A participação da glia na gênese e manutenção da hipersensibilidade articular em modelo de AIA e o aumento da expressão medular de Iba1 e GFAP já foi demonstrada por SORKIN *et al.*, 2003 e XU *et al.*, 2010. Mas diferentemente dos estudos já realizados, este trabalho mostra a participação da glial na incapacitação articular em função do tempo. Os resultados obtidos revelaram que a expressão de RNAm para GFAP precede a expressão de RNAm para Iba1 e, enquanto a expressão proteica de GFAP acontece após 9 horas do desafio i.a., a de Iba1 é observada somente após 24 horas. Este perfil difere do que é observado nos dados obtidos por nosso grupo de pesquisa e por RAGHAVENDRA *et al.*, 2003, em modelos de dor neuropática, nos quais a ativação microglial precede a astrocítica. Estes dados mostram que o perfil da ativação glial pode ser dependente do estímulo desencadeador. Mas embora os dados moleculares tenham revelado a ativação astrocítica precedendo a ativação microglial, os dados farmacológicos não mostraram o mesmo perfil. Por meio da inibição farmacológica pôde-se observar que tanto astrócitos como microglia participam desde as primeiras horas após a indução do estímulo inflamatório. Isto talvez porque a expressão de marcadores de ativação glial pode ainda ser baixa, mas as células já estão ativadas e liberando produtos pró-inflamatórios.

Outro ponto importante a ser considerado nesta discussão é que a via de administração intratecal, pela qual fluorocitrato e a minociclina foram administrados, permite a distribuição da droga tanto a nível espinal, como no GRD (BUTLER *et al.*, 2005). Ou seja, a participação das células satélite nos efeitos observados deve ser considerada, especialmente porque o fluorocitrato inibe também o metabolismo das células satélite (LIU *et al.*, 2012). De fato, a avaliação da expressão de proteínas por Western Blotting comprovou a participação das células satélite. Não apenas em amostras de medula de animais submetidos ao modelo de AIA, como também em amostras de GRD, a expressão de GFAP estava aumentada. A participação das células gliais do GRD em modelos experimentais de artrite já foi relatada por CLARK *et al.*, 2012 e BRESSAN *et al.*, 2010 e PATRO *et al.*, 2011 a relacionam com a incapacitação articular em modelos de artrite induzida por LPS e CIA, respectivamente. Os resultados obtidos revelaram também que a ativação das células satélite acontece aproximadamente 3 horas antes da ativação astrocítica medular. Neste sentido, as células satélite podem estar comunicando com as células da glia espinal e sinalizando para que estas sejam ativadas. Poucos trabalhos foram feitos neste sentido, mas especula-se que sejam sinais liberados pelo GRD que ativam da glia espinal (COLBURN *et al.*, 1999).

Mas como um estímulo periférico poderia estar ativando células gliais a nível ganglionar e espinal? Estímulos químicos, mecânicos ou térmicos, bem como mediadores liberados durante o processo inflamatório no tecido ativam ou sensibilizam o nociceptor. Uma vez ativado, o impulso nervoso é transmitido até o GRD e posteriormente ao corno dorsal da medula espinal, de onde segue até o SNC. Essa transmissão do impulso nervoso é mediada por sucessivas liberações de cálcio, que promovem, por consequência, a liberação de alguns mediadores em nível ganglionar e espinal (USACHEV & THAYER, 1999). Uma vez liberados pelo neurônio, encontram receptores expressos nas células gliais próximas, ativando-as. Vários trabalhos têm sido feitos a fim de elucidar quais mediadores e mecanismos estão envolvidos neste

processo. Na periferia, pode-se citar a bradicinina, a serotonina, as prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias e ainda o ATP agindo no nociceptor. Produtos como a substância P (MARRIOTT *et al.*, 2004), o ATP (ARAQUE *et al.*, 1999) e o glutamato (TSUDA *et al.*, 2003) são liberados pelo neurônio de primeira ordem no GRD e na medula. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que a quimiocina fractalcina (CX3CL1), liberada pelo neurônio primário no GRD, ativa as células satélites adjacentes e promove a liberação de IL-1 β e TNF α , que potencializam a hipersensibilidade inflamatória em pata de animal experimental (SOUZA *et al.*, dados não publicados).

A liberação de IL-1 β e TNF α pela glia ativada é comum em vários modelos experimentais (ZHOU *et al.*, 2010; GERARD & HANSSON, 2012). Uma vez liberadas no GRD ou na medula espinal, IL-1 β e TNF α encontram receptores no corpo celular dos neurônios primário e secundário (DEVOR, 1999), sensibilizando-os. Além disso, podem levar à produção de prostanóides pelo neurônio (FEHRENBACHER *et al.*, 2005), potencializando e prolongando a hipersensibilidade tanto periférica como central.

Sabendo que as células da glia estão ativadas em modelo de AIA e participam da incapacitação inflamatória articular, o papel das citocinas IL-1 β e TNF α foi investigado neste contexto. De fato, o ensaio de qRT-PCR mostrou que, da mesma forma que o aumento da expressão de RNAm para GFAP e Iba1 ocorreu entre 6 e 9 horas após o desafio i.a., a expressão de RNAm para IL-1 β e TNF α aumentou no mesmo período, relacionando a ativação glial com a liberação das citocinas. Além disso, quando IL-1Ra (antagonista endógeno do receptor de IL-1 β) e infliximab foram administrados por via i.t. 6 ou 24 horas após o desafio i.a. com mBSA, o perfil farmacológico observado foi muito semelhante ao obtido quando a glia foi inibida. Quando administrados previamente ao desafio, os fármacos reduziram a incapacitação articular desde 3 até 24 horas após o desafio i.a., Esta observação confirmou o fato de que, embora os efeitos do fluorocitrato e da minociclina estejam

reduzidos após 6 horas, a glia continua participando da incapacitação no modelo, liberando IL-1 β e TNF α . Entretanto, enquanto o efeito de IL-1Ra pôde ser observado durante todo o período avaliado, o do infliximab só foi evidente após a sexta hora do desafio i.a., sugerindo a participação prévia da IL-1 β em relação ao TNF α , o que foi confirmado pelo ensaio de qRT-PCR.

Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, MI *et al.*, 2011 mostra que as células gliais ativadas liberam IL-1 β e TNF α em nível espinal e CONSTANDIL *et al.*, 2009, além de demonstrar a liberação de IL-1 β , ainda mostra que esta citocina está sensibilizando fibras C a nível espinal. LI *et al.*, 2005 demonstra a ativação glial de células do GRD em modelo de AIA, e mostra que as células satélite ativadas liberam IL-1 β e participam tanto da hipersensibilidade como da incapacitação articular no modelo. INGLIS *et al.*, 2007 mostra que as células da glia espinais estão ativadas, promovendo hipersensibilidade por meio da liberação de TNF α . BRESSAN *et al.*, 2010 e 2012 mostra que, em modelo de artrite induzida pela administração i.a. de LPS, tanto células gliais espinais, como do GRD estão sendo ativadas pela inflamação articular e estão liberando TNF α , especialmente 6 horas após a administração do estímulo. SOUZA *et al.*, 2011 (dados não publicados) mostra que células satélite ativadas por fractacina liberam IL-1 β e TNF α , que sensibilizam as fibras nociceptivas primárias e secundárias.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que as células gliais na medula espinal e no GRD têm papel crucial na gênese e manutenção da incapacitação articular em modelo de AIA. Isso permite que novas possibilidades terapêuticas possam ser avaliadas, como a inibição i.t. destas células. Em estudos clínicos de controle da dor, ainda não existem avaliações neste sentido e em doenças neurodegenerativas ou psiquiátricas, escassas avaliações foram feitas, com pouca consistência. Entretanto, a busca por novas opções terapêuticas não cessa e, frente a importância das células da glia em processos dolorosos, é possível que em breve, novas drogas estejam sendo estudadas.

6. Conclusão

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que o método de TID é sensível em avaliar a incapacitação articular em modelos experimentais de artrite e artrite reumatoide e é preditivo para o estudo da doença. Além disso, pode ser usado para avaliação da eficácia de fármacos que interfiram na incapacitação articular decorrente de processos inflamatórios, sendo então de fundamental utilidade no desenvolvimento pré-clínico de novas drogas analgésicas. Por fim, este estudo evidenciou um papel crucial das células da glia espinais e no GRD no desenvolvimento e manutenção da incapacitação inflamatória articular em modelo de AIA, bem como dos produtos liberados por esta células: as citocinas pró-nociceptivas IL-1 β e TNF α .

7. Referências Bibliográficas

1. Aarons L., Grennan D.M., Rajapakse C., Brinkley J., Siddiqui M., Taylor L., Higham C. Anti-inflammatory (ibuprofen) drug therapy in rheumatoid arthritis rate of response and lack of time dependency of plasma pharmacokinetics. *British Journal Pharmacology* 1983; 15(3):387-8
2. Ahmed Z., Shaw G., Sharma V.P., Yang C., McGowan E., Dickson D.W. Actin-binding proteins coronin-1a and Iba-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 2007; 55(7):687-700
3. Aldskogius H.K., Koslova E.N. Central Neuron-Glia and Glia-Glia interactions following axon injury. *Progress in Neurobiology* 1998; 55:1-26
4. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neuroscience* 1999; 22: 208–215
5. Badley E.M., Kasman N.M. The impact of arthritis on canadian women. *BMC Womens Health* 2004; 25:4
6. Bao L, Zhu Y, Elhassan AM, Wu Q, Xiao B, Zhu J, Lindgren JU. Adjuvant-induced arthritis: IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha are up-regulated in the spinal cord. *Neuroreport*. 2001, 12(18):3905-8
7. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 2006, 148(3):245-54
8. Bas DB, Su J, Sandor K, Agalave NM, Lundberg J, Codeluppi S, Baharpoor A, Nandakumar KS, Holmdahl R, Svensson CI. Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency. *Arthritis Rheum*. 2012, 64(12):3886-96
9. Basbaum A.I. Reviews: Topical, systematic and once again, comprehensive. *Pain* 2006; 124:237
10. Berenbaum F., Jacques C., Thomas G., Corvol M.T., Béréziat G., Masliah J. Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on PGE₂ production by articular chondrocytes does not involve PLA₂ stimulation. *Exp Cell Res*. 1996; 222(2):379-84

11. Boettger M.K., Hensellek S., Richter F., Gajda M., Stöckigt R., von Banchet G.S., Bräuer R., Schaible H.G. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(8):2368-78
12. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine.* 2008, 75(4):373-5
13. Borato E., Oliveira J.J.J., Ciena A.P., Bertolini G.R.F. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. *Rev Bras Med Esporte* 2008; 14(5)
14. Bressan E, Mitkovski M, Tonussi CR. LPS-induced knee-joint reactive arthritis and spinal cord glial activation were reduced after intrathecal thalidomide injection in rats. *Life Sci.* 2010, 87(15-16):481-9
15. Bressan E, Peres KC, Tonussi CR. Evidence that LPS-reactive arthritis in rats depends on the glial activity and the fractalkine-TNF- α signaling in the spinal cord. *Neuropharmacology.* 2012, 62(2):947-58
16. Butler M, Hayes CS, Chappell A, Murray SF, Yaksh TL, Hua XY. Spinal distribution and metabolism of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide after intrathecal administration in rats. *Neuroscience.* 2005, 131(3):705-15
17. Butler R.K., Finn D.P. Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology* 2009; 88:184–202
18. Champion GV, Lebsack ME, Lookabaugh J, Gordon G, Catalano M. Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum.* 1996, 39(7):1092-101
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999

20. Cervero & Jensen. Handbook of Clinical Neurology. 3 ed. Amsterdam. Elsevier, 2006
21. Clark AK, Grist J, Al-Kashi A, Perretti M, Malcangio M. Spinal cathepsin S and fractalkine contribute to chronic pain in the collagen-induced arthritis model. *Arthritis Rheum.* 2012, 64(6):2038-47
22. Colburn R.W., DeLeo J.A., Rickman A.J., Yeager M.P., Kwon P., Hickey W.F. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *Journal of Neuroimmunology* 1997; 79:163–175
23. Colburn R.W., Rickman A.J., DeLeo J.A. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain. *Behavior Experimental Neurology* 1999; 157:289–304
24. Constandil L, Hernández A, Pelissier T, Arriagada O, Espinoza K, Burgos H, Laurido C. Effect of interleukin-1beta on spinal cord nociceptive transmission of normal and monoarthritic rats after disruption of glial function. *Arthritis Res Ther.* 2009, 11(4):R105
25. Corbacho M.I., Dapuetto J.J. Assessing the functional status and quality of life of patients with rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(1):31-43
26. Costa AFC, Brasil MAA, Papi JA, Azevedo MNL Depression, anxiety and disease activity in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatologia* 2008, 48(1):7-11
27. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2005;57:163–72
28. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005, 57(2):163-72
29. Cunha T.M., Verri-Jr W.A., Vivancos G.G., Moreira I.F., Reis S., Parada C.A., Cunha F.Q., Ferreira S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(3):401-7

30. Cunha T.M., Verri-Jr W.A., Valério D.A., Guerrero A.T., Nogueira L.G., Vieira S.M., Souza D.G., Teixeira M.M., Poole S., Ferreira S.H., Cunha F.Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain*. 2008; 12(8):1059-68
31. Devor, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain* 1999, S27-S35
32. Fehrenbacher, JC, Burkey, TH, Nicol, GD & Vasko, MR. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E2 receptor mRNA levels in cultured dorsal root ganglia cells. *Pain* 2005, 113:113-122
33. Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*. 1978, 16(1):31-7
34. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423(6937):356-61.
35. Fleischmann R. Premise: traditional disease-modifying antirheumatic drugs are less effective and safe than targeted therapy with biologic response modifiers in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003
36. Fu K.Y., Light A.R., Matsushima G.K., Maixner W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind. *Paw Brain Research* 1999; 825:59-67
37. Gao Y.J., Ji R.R. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 2010; 7(4):482-93
38. Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM . Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following sciatic nerve constriction injury. *Brain Res*. 1999, 565(1):1-7
39. Gehrmann J., Matsumoto Y., Kreutzberg G.W. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Research Reviews* 1995; 20:269-287

40. Gehrmann J. Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol.* 1996; 147(2-3):79-88
41. Gérard F, Hansson E. Inflammatory activation enhances NMDA-triggered Ca²⁺ signalling and IL-1 β secretion in primary cultures of rat astrocytes. *Brain Res.* 2012, 1473:1-8
42. Gerards AH, de Lathouder S, de Groot ER, Dijkmans BA, Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003, 42:1189–96
43. Griffiths RJ. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions.* 1992, 35(1-2):88-95
44. Guerrero A.T., Verri-Jr. W.A., Cunha T.M., Silva T.A., Rocha F.A.C., Ferreira S.H., Cunha F.Q., Parada C.A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006; 86:244–251
45. Guerrero A.T., Cunha T.M., Verri-Jr. W.A., Gazzinelli R.T., Teixeira M.M., Cunha F.Q., Ferreira S.H. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. *European Journal of Pharmacology* 2012; 674:51–57
46. Gyorgy, B., Toth, E., Tarcsa, E., Falus, A. et al., Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006, 38:1662–1677
47. Halassa M.M., Fellin T., Takano H., Dong J.H., Haydon P.G. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* 2007; 27(24):6473-7
48. Hall A.M., Kamper S.J., Maher C.G., Latimer J., Ferreira M.L., Nicholas M.K. Symptoms of depression and stress mediate the effect of pain on disability. *Pain* 2011 152(5):1044-51

49. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005, 48(3):457-76
50. Harris, E. D. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322(18):1277-1289
51. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004, 25:33–9
52. Hayakawa K., Nakano T., Irie K., Higuchi S., Fujioka M., Orito K., Iwasaki K., Jin G., Lo E.H., Mishima K., Fujiwara M. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30(4):871-82
53. Herman S, Zurgil N, Langevitz P, Ehrenfeld M, Deutsch M. The induction of apoptosis by methotrexate in activated lymphocytes as indicated by fluorescence hyperpolarization: a possible model for predicting methotrexate therapy for rheumatoid arthritis patients. *Cell Struct Funct* 2003, 28:113–22
54. Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res* 2005, 54:273–80
55. Hodge MC, Nathan D, Bach TM. Plantar pressure pain thresholds and touch sensitivity in rheumatoid arthritis. *Foot Ankle Int.* 2009; 30(1):1-9
56. Huang Y.H., Sinha S.R., Tanaka K., Rothstein J.D., Bergles D.E. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediate excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci.* 2004; 24(19):4551-9
57. Inglis JJ, Notley CA, Essex D, Wilson AW, Feldmann M, Anand P, Williams R. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. *Arthritis Rheum.* 2007, 56(12):4015-23

58. Imhof A.K., Glück L., Gajda M., Lupp A., Bräuer R., Schaible H.G., Schulz S. Differential antiinflammatory and antinociceptive effects of the somatostatin analogs octreotide and pasireotide in a mouse model of immune-mediated arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2011; 63(8):2352–2362
59. Iwakura N., Ohtori S., Orita S., Yamashita M., Takahashi K., Kuniyoshi K. Role of low-affinity nerve growth factor receptor inhibitory antibody in reducing pain behavior and calcitonin gene-related peptide expression in a rat model of wrist joint inflammatory. *J Hand Surg Am.* 2010; 35(2):267-73
60. Jang E, Cho ML, Oh HJ, Youn J. Deficiency of foxp3 regulatory T cells exacerbates autoimmune arthritis by altering the synovial proportions of CD4 T cells and dendritic cells. *Immune Netw.* 2011, 11(5):299-306
61. Jankowska E, Riddell JS, McCrea DA. Primary afferent depolarization of myelinated fibres in the joint and interosseous nerves of the cat. *J Physiol.* 1993, 466:115-31
62. Jones A.K.P., Derbyshire S.W.G. Cerebral mechanisms operating in the presence and absence of inflammatory pain. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1996; 55:411-420
63. Kakimoto K. Collagen-induced arthritis--characteristics of the animal model and implications for the treatment of autoimmune disease. *Chin Med Sci J.* 1991 Jun;6(2):78-83.
64. Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 1977, 20: 1396-1401
65. Klareskog, L., Ronnelid, J., Lundberg, K., Padyukov, L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 2008, 26: 651–675
66. Lee CK, Lee EY, Chung SM, Mun SH, Yoo B, Moon HB. Effects of disease-modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor

kappaB, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Arthritis Rheum* 2004, 50:3831–43

67. Leung L, Cahill CM. TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation*. 2010, 7:27
68. Liu FY, Sun YN, Wang FT, Li Q, Su L, Zhao ZF, Meng XL, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing GG, Wan Y. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res*. 2012, 1427:65-77
69. Louzada-Junior P., Souza B.D.B., Toledo R.A., Ciconelli R.M. Descriptive analysis of the demographical and clinical characteristics of the patients with rheumatoid arthritis in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Reumatol*. 2007; 47:2
70. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000, 43(1):30-7
71. Marinova-Mutafchieva L., Williams R.O., Mason L.J., Mauri C., Feldmann M., Maini R.N. Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*. 1997; 107(3):507-12
72. Marriott I. The role of tachykinins in central nervous system inflammatory responses. *Front Biosci*. 2004, 9:2153-65
73. Mapp P.I., Kidd B.L., Gibson S.J., Terry J.M., Revell P.A., Ibrahim N.B.N. Substance P, calcitonin gene-related peptide and C flanking peptide of neuropeptide Y immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 1990; 37(1):143-53

74. McInnes I.B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365:2205-19
75. Meller S.T., Dykstra C., Grzybycki D., Murphy S., Gebhart G.F. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 1994; 33(11):1471-8
76. Mi WL, Mao-Ying QL, Wang XW, Li X, Yang CJ, Jiang JW, Yu J, Wang J, Liu Q, Wang YQ, Wu GC. Involvement of spinal neurotrophin-3 in electroacupuncture analgesia and inhibition of spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *J Pain*. 2011, 12(9):974-84
77. Mika J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep*. 2008; 60(3):297-307
78. Milligan E.D., Twining C., Chacur M., Biedenkapp J., O'Connor K., Poole S., Tracey S., Martin D., Maier S.F., Watkins L.R. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(3):1026 –1040
79. Milligan, E, Zapata, V, Schoeniger, D, Chacur, M, Green, P, Poole, S, Martin, D, Maier, SF & Watkins, LR. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci* 2005, 22:2775-2782
80. Montesinos MC, Desai A, Delano D et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 2003, 48:240–7
81. Mori L, Iselin S, De Libero G, Lesslauer W. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol*. 1996, 157(7):3178-82
82. Neugebauer V., Han J.S., Adwanikar H., Fu Y., Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Molecular Pain* 2007; 3:8

83. Nielsen H, Bennedsen J. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on human monocyte chemotaxis in vitro. *Immunopharmacology*. 1983, 5(4):259-65
84. Ohara P.T., Vit J.P., Bhargava A., Romero M., Sundberg C., Charles A.C., Jasmin L. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist*. 2009; 15(5):450–463
85. Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Phenotypic inflammation switch in rats shown by calcitonin gene-related peptide immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar facet joints. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001, 26(9):1009-13
86. Ozaki K., Hanazawa S., Takeshita A., Chen Y., Watanabe A., Nishida K., Miyata Y., Kitano S. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Oral Microbiol Immunol*. 1996; 11(2):109-14
87. Patro N, Sharma A, Kariaya K, Patro I. *Spirulina platensis* protects neurons via suppression of glial activation and peripheral sensitization leading to restoration of motor function in collagen-induced arthritic rats. *Indian J Exp Biol*. 2011 Oct;49(10):739-48.
88. Peng F, Wang G, Li X, Cao D, Yang Z, Ma L, Ye H, Liang X, Ran Y, Chen J, Qiu J, Xie C, Deng C, Xiang M, Peng A, Wei Y, Chen L. Rational design, synthesis, and pharmacological properties of pyranochalcone derivatives as potent anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem*. 2012, 54:272-80
89. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* 2003; 138:501–11
90. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994, 367(6460):243-9

91. Pinto L.G., Cunha T.M., Vieira S.M., Lemos H.P., Verri-Jr. W.A., Cunha F.Q., Ferreira S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 2010; 148:247–256 (A)
92. Pinto, L.G. Papel da IL-17 na gênese da hipernocicepção inflamatória em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos. Ribeirão Preto, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (B)
93. Plaas A., Li J., Riesco J., Das R., Sandy J.D., Harrison A. Intraarticular injection of hyaluronan prevents cartilage erosion, periarticular fibrosis and mechanical allodynia and normalizes stance time in murine knee osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13(2):46
94. Raghavendra, V., Tanga, F., DeLeo, J.A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 306(2), 624-30
95. Robinson I., Sargent B., Hatcher J.P. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of Freund's Complete Adjuvant induced hypersensitivity in mice. *Neuroscience Letters* 2012; 524:107– 110
96. Saito O, Svensson CI, Buczynski MW, Wegner K, Hua XY, Codeluppi S, Schaloske RH, Deems RA, Dennis EA, Yaksh TL. Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E(2) and TNF. *Br J Pharmacol.* 2010, 160(7):1754-64
97. Schaible H.G., Grubb B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 1993; 55:5-54
98. Schaible H.G., Neugenbauer V., Geisslinger G., Beck U. The effects of S- and R-flurbiprofen on the inflammation-evoked intraspinal release of immunoreactive substance P—a study with antibody microprobes. *Brain Research* 1998; 798:287–293

99. Schaible H.G., Vanegas H. How do we manage chronic pain? Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol. 2000; 14(4):797-811
100. Schroder A.E., Greiner A., Seyfert C., Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93:221-225
101. Sorkin L.S., Maruyamaa K., Boyleb D.L., Yang L., Marsalaa M., Firestein G.S. Spinal adenosine agonist reduces c-fos and astrocyte activation in dorsal horn of rats with adjuvant-induced arthritis. Neuroscience Letters 2003; 340:119–122
102. Stellwagen D., Beattie E.C., Seo J.Y., Malenka R.C. Differential Regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor. The Journal of Neuroscience 2005; 25(12):3219–3228
103. Sun S, Cao H, Han M, Li TT, Zhao ZQ, Zhang YQ. Evidence for suppression of electroacupuncture on spinal glial activation and behavioral hypersensitivity in a rat model of monoarthritis. Brain Res Bull. 2008, 75(1):83-93
104. Sweitzer S.W., Colburn R.W., Rutkowski M., DeLeo J.A. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1b expression that correlates with pain behavior in the rat. Brain Research 1999; 829:209–221
105. Szekanecz Z, Koch AE. Cell-cell interactions in synovitis. Endothelial cells and immune cell migration. Arthritis Res. 2000, 2(5):368-73
106. Takenouchi T, Sugama S, Iwamaru Y, Hashimoto M, Kitani H. Modulation of the ATP-Induced release and processing of IL-1beta in microglial cells. Crit Rev Immunol. 2009, 29(4):335-45
107. Tawfik V.L., Lacroix M.L., Bercury K.K., McMenem N.N., Harris B.T., DeLeo J.A. Induction of astrocyte differentiation by propentofylline increases glutamate transporter expression in vitro: heterogeneity of the quiescent phenotype. Glia 2006; 54:193–203

108. Tétrault P., Dansereau M.A., Doré-Savard L., Beaudet N., Sarret P. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav.* 2011; 104(3):495-502
109. Tonussi C.R., Ferreira S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 1992; 48(3):421-7
110. Tonussi C.R., Ferreira S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B receptor-mediated 1 nociception. *European Journal of Pharmacology* 1997; 326:61–65
111. Tsacopoulos M. Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review *Journal of Physiology* 2002; 96:283–288
112. Tsuda M., Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Mizokoshi A., Kohsaka S., Salter M.W., Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; 424(6950):778-83
113. Usachev, YM & Thayer, SA. Ca²⁺ influx in resting rat sensory neurones that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores. *J Physiol* 1999, 519:115-130
114. Vanegas H., Schaible H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology* 2001; 64:327–363
115. Vane J.R., Botting R.M. The mode of action of anti-inflammatory drugs. *Postgrad Med J.* 1990; 66:17.
116. Verri-Jr. W.A., Guerrero A.T., Fukada S.Y., Valerio D.A., Cunha T.M., Xu D., Ferreira S.H., Liew F.Y., Cunha F.Q IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105(7):2723–2728
117. Vinay DS, Kwon BS. Targeting TNF superfamily members for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2012, 57(3):305-12

118. Vitkovic L, Bockaert J., Jacque C. Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain? *J. Neurochem.* 2000; 74:457–471
119. Viviani B., Bartesaghi S., Gardoni F., Vezzani A., Behrens M.M., Bartfai T., Binaglia M., Corsini E., Di Luca M., Galli C.L., Marinovich M. Interleukin-1 enhances NMDA receptor mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(25):8692– 8700
120. Voltarelli, J.C. *Imunologia Clínica e Reumatologia*. 1 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008; 623-636
121. Xu B, Zhang WS, Yang JL, Lû N, Deng XM, Xu H, Zhang YQ. Evidence for suppression of spinal glial activation by dexmedetomidine in a rat model of monoarthritis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010, 37(10):e158-66
122. Watkins L.R., Martin D., Ulrich P., Tracey K.J., Maier S.F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 1997; 71:225–235
123. Watkins L.R., Maier S.F. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu. Rev. Psychol.* 2000; 51:29–57
124. Watkins L.R., Milligan E.D., Maier S.F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends in Neurosciences* 2001; 24(8):450-5
125. Wei X., Chen X., Fontanilla C., Zhao L., Liang Z., Dodel R., Hampel H., Farlow M., Du Y. C/T conversion alters interleukin-1 promoter function in a human astrocyte cell line. *Life Sci.* 2007; 80(12):1152–1156
126. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 1992, 117(10):801-6

127. Weyerbacher A.R., Xu Q., Tamasdan C., Shin S.J., Inturrisi C.E. N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) independent maintenance of inflammatory pain. *Pain* 2010; 148(2): 237–246
128. Williams AS, Topley N, Dojcinov S, Richards PJ, Williams BD. Amelioration of rat antigen-induced arthritis by liposomally conjugated methotrexate is accompanied by down-regulation of cytokine mRNA expression. *Rheumatology (Oxford)*. 2001, 40(4):375-83
129. Wong E, Bayly C, Waterman HL, Riendeau D, Mancini JA. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation. *J Biol Chem*. 1997, 272(14):9280-6
130. Zhang R., Liua B., Wanga L., Renb K. Qiaoc J.T., Bermana B.M., Lao L. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain* 2005; 118:125–136
131. Zhang R., Lia A. Liua B., Wanga L., Renb K., Zhanga H., Bermana M.B., Laoa L. IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain* 2008; 135(3):232–239
132. Zheng W, Ouyang H, Zheng X, Liu S, Mata M, Fink DJ, Hao S. Glial TNF α in the spinal cord regulates neuropathic pain induced by HIV gp120 application in rats. *Mol Pain*. 2011, 7:40
133. Zhou Z, Peng X, Hagshenas J, Insolera R, Fink DJ, Mata M. A novel cell-cell signaling by microglial transmembrane TNF α with implications for neuropathic pain. *Pain*. 2010, 151(2):296-306