UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Maria Cláudia Magalhães Cavallini

**Papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada
por lesão de nervos periféricos**

Ribeirão Preto – SP

2019

MARIA CLÁUDIA MAGALHÃES CAVALLINI

**Papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada
por lesão de nervos periféricos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Ribeirão Preto – SP

2019

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.

Cavallini, Maria Cláudia Magalhães

Papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada por lesão de nervos periféricos.

Ribeirão Preto, 2019.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Cunha, Thiago Mattar.

1. Receptor Toll-like 9. 2. Dor neuropática.

3. Nervo periférico. 4. Neutrófilos

Nome: CAVALLINI, Maria Cláudia Magalhães

Título: Papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada por lesão de nervos periféricos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado (a) em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O trabalho recebeu auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias, FAPESP, CAPES e CNPq.

Dedicatória

*Aos meus amados País, Edna e Carlos,
pelo amor incondicional, apoio diário,
mesmo que a distância e por não medirem
esforços para que chegasse até aqui...*

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso teria sido possível.

Aos meus pais e avó, Edna, Carlos e Deolinda, por me amar, apoiar e acompanhar minhas jornadas. Agradeço a vocês por compreenderem minha ausência e seguirem ao meu lado independente do caminho. A vocês decido todo meu sucesso!

Ao amor da minha vida, Guilhermy, pelo amor, companheirismo e por compreender os finais de semana e noites que passamos juntos no laboratório. Sem você aqui esse caminho teria sido difícil e você o tornou leve e agradável. Obrigada e Te amo!

Aos meus filhos de quatro patas, Laura e Bruce, por sempre me receberem após um dia cansativo de trabalho com amor e animação de sobra. Vocês tornam meus dias mais felizes, mamãe ama muito vocês!

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, por permitir que fizesse parte do seu grupo de pesquisa, pelos momentos de ensinamentos e discussões científicas, pelo constante incentivo, apoio e pelo exemplo de dedicação.

Aos professores Dr. José Carlos Alves-Filho e Dr. Fernando Cunha, pela atenção, discussões científicas e grande disponibilidade nos momentos necessários.

Aos meus colaboradores de trabalho e também amigos: Andreza Urba, Rafaela Guimarães e Isaac Fernandes. Obrigada pela paciência, disposição, ensinamentos, boa vontade e dedicação às longas horas de experimento, que se tornavam mais agradáveis ao lado de vocês! Sem vocês, com certeza, nada disso seria possível!

A todos os demais alunos do grupo da “Dor”: Alexandre Maganin, Rangel, Tatiana, Elidianne, Atlante e Alexandre Lopes, pelas discussões científicas e por manterem um clima agradável de trabalho.

Aos demais amigos do LID, em especial: Ana Letícia Souza, Timna Varela, Camila Meirelles, Bruno Marcel, Eduardo Damasceno, Carlos Hiroki, Guilherme, Ayda, Wagner, Juliana, Letícia Arruda e Douglas. Obrigada por esses dois anos de convivência e aprendizado. Pela companhia nos experimentos, mas também nos momentos de descontração. Obrigada por terem me ajudado sempre que necessário e por terem tornado minha jornada dentro do laboratório mais leve, proveitosa e divertida.

Aos professores e discentes da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (IBA), pelas contribuições científicas.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Farmacologia e Departamento de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Ana Cristine, secretária do IBA, pelo apoio e solicitude.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliar e contribuir para melhoria do meu trabalho.

À FAPESP, CAPES, CNPq e FAEPA pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa, bem como pelo apoio para a participação em eventos científicos.

*Os meus mais sinceros
agradecimentos!*

*“A maior recompensa pelo nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele, mas aquilo
em que ele nos transforma.”*

John Ruskin

Resumo

CAVALLINI, M.C.M. **Papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada por lesão de nervos periféricos.** 2019. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A dor crônica representa um crescente problema de saúde pública a nível mundial, afeta cerca de 30% dos adultos em todo o mundo. É frequentemente debilitante, intensa, constante e muitas vezes resistente à maioria das terapias disponíveis no mercado atual. Dentre os tipos de dor crônica que apresentam grande importância clínica, está a dor neuropática, foco do nosso estudo.

Interações neuro-imunes são essenciais para o desenvolvimento e a manutenção da dor neuropática. Nesse contexto, destacam-se células do sistema imune inato, como neutrófilos, primeiras células a responderem a uma lesão no nervo periférico. Uma vez ativadas, desempenham um importante papel na sensibilização do neurônio aferente primário. Para sua ativação são necessários receptores de reconhecimento padrão (PRRs), importantes sensores inatos, que distinguem estruturas microbianas conservadas, referidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e substâncias endógenas liberadas durante processos de lesão celular, denominadas padrões moleculares associados à lesão (DAMPs). Dentre esses receptores, destacam-se os TLRs (receptores do tipo Toll). Em um cenário de lesão neuronal, DAMPs mitocondriais são liberados na circulação, como exemplo, temos o DNA mitocondrial, que é amplamente liberado por células nervosas lesionadas e ativa receptores Toll-like 9 (TLR9) por conter em seu genoma repetições de ODN-CpG.

Foi demonstrado neste trabalho que, o receptor TLR9 tem envolvimento na hipersensibilidade nociceptiva neuropática, causada por lesão mecânica do nervo periférico, induzida pelo modelo experimental de PNL. Há aumento da expressão de TLR9 no local da lesão no primeiro dia após indução do modelo, principalmente em neutrófilos. A sinalização do receptor TLR9 resulta tanto no recrutamento de leucócitos, majoritariamente neutrófilos e macrófagos, quanto na liberação de citocinas pró inflamatórias, capazes de sensibilizar o neurônio aferente primário. Essa sensibilização periférica contínua pode acarretar em plasticidade neuronal na via nociceptiva, levando à amplificação do sinal doloroso e cronificação da dor.

Os dados obtidos demonstram que a sinalização de TLR9 é crucial para o desenvolvimento da dor crônica neuropática, tendo seu papel demonstrado no sistema nervoso periférico, caracterizando um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor.

Palavras Chave: Dor neuropática; Receptores Toll-like 9; Neutrófilos; Nervo periférico.

Abstract

CAVALLINI, M.C.M. **Role of toll-like receptor 9 (TLR9) in the development of neuropathic pain caused by peripheral nerve injury.** 2019. Master's dissertation –Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019.

Chronic pain represents a growing public health problem worldwide, affecting about 30% of adults. It is often debilitating, intense, constant and frequently resistant to most of the therapies available today. Among the types of chronic pain that present great clinical importance is neuropathic pain, focus of our study.

Neuroimmune interactions are essential for the development and maintenance of neuropathic pain. In this context, cells of the innate immune system, such as neutrophils, are the first cells to respond to a peripheral nerve lesion. Once activated, they play an important role in sensitizing the primary afferent neuron. Pattern recognition receptors (PRRs) are required for this cells activation. PRRs are important innate sensors, that distinguish conserved microbial structures, referred as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and endogenous substances released during cellular injury processes, called molecular patterns associated with injury (DAMPs). Among these receptors, the TLRs (Toll-like receptors) stand out. In a scenario of neuronal injury, mitochondrial DAMPs are released into the circulation, for example, mitochondrial DNA which is widely released by injured nerve cells and activates Toll-like receptors 9 (TLR9) by containing in its genome repeats of ODN-CpG.

It has been demonstrated here that TLR9 is involved in neuropathic nociceptive hypersensitivity, caused by mechanical injury of peripheral nerve, induced by the experimental model of PSNL. There is increased TLR9 expression at the lesion site on the first day after induction of the model, mainly on neutrophils. TLR9 signaling results in both the recruitment of leukocytes, mostly neutrophils and macrophages, and the release of proinflammatory cytokines capable of sensitizing the primary afferent neuron. This continuous peripheral sensitization can lead to neuronal plasticity in the nociceptive pathway, leading to amplification of the pain signal and chronification of pain.

The data obtained demonstrate that TLR9 signaling is crucial for the development of chronic neuropathic pain, and its role is demonstrated in the peripheral nervous system, characterizing a potential therapeutic target for the treatment of pain.

Key words: Neuropathic pain; Toll-like 9 receptor; Neutrophils; Peripheral nerve.

Lista de Figuras

Figura 1 – Desenho representativo do modelo experimental de PSNL.....	38
Figura 2 – Passos da realização do modelo experimental de PSNL.....	38
Figura 3 – Avaliação da hipersensibilidade nociceptiva mecânica em animais WT ou TLR9-/- submetidos ao modelo de PSNL por von Frey filamento.....	48
Figura 4 – Avaliação da hipersensibilidade nociceptiva térmica ao frio em animais WT ou TLR9-/- submetidos ao modelo de PSNL por teste da acetona.....	48
Figura 5 – Avaliação da expressão gênica do receptor TLR9 no nervo ciático após lesão por PSNL.....	49
Figura 6 – TLR9 está expresso em neutrófilos no local da lesão.....	51
Figura 7 – A ausência de TLR9 altera a migração de leucócitos para o local da lesão.....	53
Figura 8 – A ausência de TLR9 modula a liberação de citocinas no local da lesão.....	55

*Lista de abreviaturas,
siglas e símbolos*

° - graus

α – alfa

β – beta

μg – micrograma

μl – microlitro

AINES – anti-inflamatórios não esteroidais

CCL- Chemokine (C-C motif) ligand

CXCL- Chemokine (CXC motif) ligand

CCI – chronic constriction injury

CLR – receptor de lectina do tipo C

CGRP – peptídeo relacionado ao gene de calcitonina

DAMP – damage-associated molecular patterns

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

g – gramas

GABA - ácido gama-aminobutírico

GRD – gânglio da raiz dorsal

GFAP – proteína ácida fibular glial 1

IASP - international association for the study of pain

Iba1 – molécula adaptadora de cálcio ionizado 1

IL1- β – interleucina 1beta

IL-6 – interleucina 6

KO – knockout

LTB4 -leucotrieno B4

mL – mililitro

mg – miligrama

MYD88 - myeloid differentiation primary response 88

NLR – nod-like receptor

NF- κ B – nuclear fator κ B

NGF - nerve growth factor

OMS – organização mundial da saúde

ODN-CpG - oligodesoxinucleotídio CpG

PAMP - pathogen-associated molecular pattern

PSNL – partial sciatic nerve ligation

RLR – rig1-like receptor

SBED – sociedade brasileira para o estudo da dor

SUS – sistema único de saúde

SNC – sistema nervoso central

TLR – toll-like receptor

TNF- α – tumor necrosis factor alfa

WT – wild type

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Dor.....	23
1.2 Transmissão do sinal doloroso.....	23
1.3 Dor crônica neuropática.....	26
1.4 Interações neuro-imunes na neuropatia.....	29
1.5 Receptores de reconhecimento padrão (PRRs).....	31
1.5.1 Receptores do tipo Toll (TLRs).....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Animais.....	37
3.2 Modelo experimental de neuropatia (PSNL, partial sciatic nerve ligation).....	37
3.3 Avaliação nociceptiva.....	39
3.3.1 Avaliação nociceptiva mecânica - teste de von Frey filamento.....	39
3.3.2 Hipersensibilidade nociceptiva térmica ao frio – teste da acetona.....	39
3.4 Ensaio de imunofluorescência.....	40
3.5 Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR em tempo real).....	41
3.6 Citometria de fluxo.....	43
3.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	44
3.8 Estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 A ausência do receptor TLR9 resulta em menor desenvolvimento de hipersensibilidade nociceptiva neuropática mecânica e térmica.....	47
4.2 O receptor TLR9 tem expressão gênica aumentada inicialmente após lesão de nervo periférico.....	49
4.3 Após lesão de nervo periférico, o receptor TLR9 está inicialmente expresso em neutrófilos no local da lesão.....	50
4.4 A ausência do receptor TLR9 reduz a migração leucocitária de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão.....	52
4.5 A ausência do receptor TLR9 modula a liberação de citocinas e quimiocinas pró- inflamatórias no local da lesão.....	54
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	64

1. Introdução

1.1. Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é uma sensação desagradável diante de um dano real ou potencial aos tecidos. A percepção da dor inclui não apenas o reconhecimento consciente de um evento sensorial, mas também a análise cognitiva e a resposta emocional associadas à experiência vivenciada, sendo subjetiva para cada indivíduo (Julius e Basbaum, 2001; Wieseler-Frank e Maier, 2005; Loeser e Treede, 2008). A dor sempre será percebida de maneira diferente em cada indivíduo, mesmo que iniciada por um estímulo de mesma intensidade. Os contextos social, econômico, cultural e psicológico estão diretamente relacionados a como a informação de dor é compreendida (Foulkes e Wood, 2009; LaCroix-Fralish e Mogil, 2009).

A sensação de dor pode ser causada por um estímulo de fato nocivo ou ainda por uma sensibilidade aumentada do tecido, que passa a responder a estímulos inócuos. Denomina-se alodinia a resposta dolorosa a um estímulo inócuo. À sensação dolorosa aumentada diante de um estímulo nocivo, dá-se o nome de hiperalgesia. Por ser difícil a avaliação do componente afetivo em animais experimentais, denomina-se nocicepção a resposta comportamental reflexa de animais frente a diferentes estímulos inócuos e nocivos. O mesmo termo é usado para definir em humanos, o reconhecimento físico do dano, sem envolver outros componentes que caracterizariam dor (Wieseler-Frank e Maier, 2005).

1.2. Transmissão do sinal doloroso

As vias de transmissão da dor formam um sistema complexo, dinâmico, sensorial, cognitivo e comportamental que evoluiu para detectar, integrar e coordenar uma resposta protetora aos estímulos nocivos que ameaçam a sobrevivência do organismo (Bourne *et al.*, 2014). Resumidamente, extremidades livres dos neurônios sensoriais na pele, os nociceptores, são capazes de reconhecer um estímulo nocivo, transmitir essa informação dolorosa da fibra

axônica até o corno dorsal da medula espinal, onde faz sinapse com um neurônio de segunda ordem, que encaminha a informação elétrica até o cérebro, onde acontece o processamento da informação dolorosa.

Os nociceptores são as estruturas iniciais que reconhecerem um estímulo nocivo ou potencialmente nocivo. São terminações nervosas livres na pele e vísceras, capazes de identificar uma ampla variedade de estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Woolf & Ma, 2007; Hucho & Levine, 2007; Dubin & Patapoutian, 2010). A ativação de nociceptores exige que estímulos adequados despolarizem os terminais periféricos (produzindo um potencial de ação) com amplitude e duração suficientes. A maioria dos receptores sensoriais responde a uma única modalidade de estímulo, embora alguns possam responder a duas ou mais modalidades (Emery *et al.*, 2016). A partir da ativação do nociceptor e da geração de potenciais de ação, a mensagem de alerta deve ser transmitida até estruturas superiores espinais e cerebrais.

O percurso entre a extremidade livre na pele e a medula espinal pode ser feito por diferentes fibras axonais. Sendo essas de 3 tipos, 1) fibras C: de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 mm), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2 m/s), responsáveis pela dor de longa duração e difusa e pelo reconhecimento de estímulos mecânicos, térmicos e químicos; 2) fibras A δ : de médio diâmetro (2 a 6 mm), pouco mielinizadas, de condução intermediária (2 a 30 m/s) e responsáveis pela dor de curta duração e aguda, sentida após uma estimulação nociva e responsivas apenas a estímulos mecânicos e térmicos; e 3) fibras A β , de maior diâmetro e muito mielinizadas, responsáveis pela identificação de estímulos inócuos (ex. táteis) e que podem passar a responder como nociceptores durante certos processos patológicos, como nas neuropatias, onde ocorre uma plasticidade neuronal (Basbaum *et al.*, 2009).

Os corpos celulares dos neurônios sensitivos periféricos estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD). No corpo celular encontra-se o núcleo dessa longa célula, onde são

sintetizadas moléculas necessárias para o funcionamento do neurônio, assim como moléculas essenciais para a transmissão sináptica, além de receptores e canais iônicos (Devor 1999; Bourne *et al.*, 2014). Ao redor de cada corpo celular estão as células satélite, células gliais que dão suporte e facilitam a comunicação celular no GRD (Hanani, 2005). Em geral, cada neurônio tem sua própria camada de células satélite, e esse conjunto neurônio- glia é separado dos demais por tecido conjuntivo. As células satélite podem ser caracterizadas por algumas proteínas marcadoras, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Essas não participam apenas da homeostase do tecido ganglionar, mas também, respondem a estímulos inflamatórios e à lesão no axônio periférico (Hanani, 2005; Ohara *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2016). Também estão presentes no GRD alguns macrófagos residentes, esses expressam a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Iba1) (Scholz e Woolf, 2007).

Provindas do GRD, as fibras sensoriais primárias adentram ao sistema nervoso central pelo trato de Lissauer, no corno dorsal da medula espinal (Rexed, 1954; Bourne, 2014) onde, por sua vez, o neurônio aferente primário faz sua primeira sinapse com neurônios espinais de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem então cruzam para o lado oposto da medula espinal, na decussação ventral do canal central (Earle, 1952; Bourne, 2014), a partir de onde ascendem através de diferentes tratos nervosos, incluindo o trato espinotalâmico, para estruturas supra- espinais. No tálamo essa informação converge para o córtex somatossensorial, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso, enquanto que nos córtex insular e cingulado, há o reconhecimento do componente afetivo emocional da dor (Hunt e Mantyh, 2001; Basbaum *et al.*, 2009).

Além das células neuronais, no sistema nervoso central, é possível encontrar três tipos de células da glia: os oligodendrócitos, responsáveis pela síntese da bainha de mielina; os astrócitos e a micróglia.

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC e foram historicamente considerados como células de suporte. Trabalhos da última década, no entanto, mostram que essas células vão muito além de terem apenas esse papel, tendo importância ativa em doenças neuronais agudas e crônicas. Um contato próximo com neurônios e sinapses torna possível para os astrócitos não apenas apoiar e nutrir os neurônios, mas também regular o ambiente químico externo durante a transmissão sináptica (Huang *et al.*, 2004; Tawfik *et al.*, 2006).

Já as células micrógliais correspondem a apenas 10% das células da glia (Aldskogius e Kozlova, 1998). Estas, por sua vez, atuam como macrófagos residentes no sistema nervoso central. 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).

Essas células uma vez ativadas, em situações diversas, como em casos de inflamação periférica, infecções e também neuropatias periféricas e centrais passam a expressar moléculas como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Iba1), em astrócitos e micróglia, respectivamente (Fu *et al.*, 1999; Sweitzer *et al.*, 1999; Colburn *et al.*, 1999 e Watkins e Maier, 2000).

1.3. Dor crônica neuropática

De acordo com a IASP a dor que persiste por três meses ou mais é classificada como crônica. A dor crônica é um problema de saúde pública crescente, que afeta cerca de 30% dos adultos em todo o mundo (Johannes *et al.*, 2010). No Brasil, cerca de 30 a 40% da população reporta dor crônica em atendimentos no sistema único de saúde (SUS), segundo SBED (Sociedade Brasileira para o estudo da dor).

Dores crônicas tem como característica a dificuldade no seu alívio, por não respondem a maioria dos tratamentos padrões utilizados. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima

que, em 14 países, apenas 49% dos pacientes apresentam resolução da dor ao longo de um período de 12 meses (Gureje *et al.*, 2001). A dor crônica representa um crescente problema de saúde pública a nível mundial, uma vez que é frequentemente debilitante, intensa, constante e muitas vezes resistente à maioria das terapias disponíveis no mercado (Cohen e Mao, 2014). De fato, o tratamento da dor crônica é hoje um dos maiores desafios clínicos.

A dor crônica pode ser dividida em diferentes subclasses de acordo com sua origem: inflamatória, a dor do câncer, disfuncional e a dor neuropática (Ji *et al.*, 2014). Embora a dor inflamatória tenha sua própria etiologia, tanto a dor do câncer como a dor neuropática compartilham componentes inflamatórios, o que faz da dor inflamatória o tipo mais amplo de dor. As dores crônicas de origem inflamatória são determinadas por injúria tecidual periférica e ativação persistente de nociceptores, resultando em plasticidade funcional do sistema nervoso (alterações na sensibilidade nociceptiva e expressão de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e enzimas) contribuindo para a persistência do quadro doloroso, independentemente da resolução do processo inflamatório (Coutaux *et al.*, 2005; Kandel *et al.*, 2000).

Outro tipo de dor crônica que apresenta uma grande importância clínica é a neuropática. A dor neuropática, foco de estudo desse trabalho, é definida pela IASP como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central ou periférico (Loeser e Treede, 2008). Essa patologia afeta em média de 7-10% da população mundial, sendo que no Brasil a frequência de dor crônica com predominância de componentes neuropáticos é de aproximadamente 4,2% na população (Bouhassira *et al.*, 2008; Colloca *et al.*, 2017). A dor neuropática periférica pode resultar de lesões no sistema nervoso periférico provocadas por trauma mecânico, doenças metabólicas, como o diabetes, substâncias químicas neurotóxicas, neuralgia pós-herpética e invasão tumoral. Já a dor neuropática central pode ser consequência de acidente vascular cerebral, lesão na medula espinhal e esclerose múltipla (Bouhassira *et al.*,

2008; Colloca *et al.*, 2017; Costigan *et al.*, 2009; Nishikawa e Nomoto, 2017; Scholz e Woolf, 2002).

A caracterização da dor neuropática é complexa e heterogênea, pois os sintomas podem oscilar no tipo, na intensidade e no tempo. No entanto, as principais características da dor neuropática são: alodinia (dor resultante de estímulos normalmente não dolorosos, como por exemplo o contato com as roupas e o frio), hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo previamente doloroso), parestesia (sensação anormal dos sentidos ou uma sensibilidade geral que se traduz em uma sensação de dormência ou formigamento), disestesia (perda de sentido, em especial o tato) e dor espontânea (dor na ausência de estímulo) (Austin e Moalem-Taylor, 2010; Woolf e Mannion *et al.*, 1999). Assim sendo, o dano ao tecido nervoso resulta em amplificação da resposta nociceptiva frente a estímulos tanto nocivos como inócuos, que passam a ser percebidos como dolorosos (Baron & Binder, 2010).

Essa amplificação, tanto periférica como central, ocorre devido à alteração da expressão de receptores, canais iônicos e neurotransmissores, aumento da excitabilidade neuronal e geração ectópica de potenciais de ação (independentes de qualquer estímulo periférico), alterações atróficas nos neurônios lesionados (como redução do calibre do axônio e do tamanho do corpo celular), perda do contato dos terminais dos neurônios aferentes com os neurônios da medula espinal, até a morte das células neuronais, facilitação e desinibição da transmissão sináptica, além de mudanças na conectividade sináptica e reorganização dos circuitos nociceptivos centrais (Austin e Moalem-Taylor, 2010).

O tratamento farmacológico para a dor neuropática é bastante limitado e geralmente se concentra no tratamento dos sintomas, pois a causa da dor, dificilmente consegue ser tratada. Pacientes com dor neuropática geralmente não respondem aos analgésicos como acetaminofeno, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou opioides fracos, como a codeína. Finnerup e colaboradores (2016) sugerem algumas drogas como de primeira linha para o

tratamento da dor neuropática periférica e central: pregabalina (similar ao GABA), gabapentina (inibidor de GABA), duloxetina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina) e antidepressivos triciclos. Outras drogas, com evidências mais fracas de efeito sobre a dor neuropática periférica, podem ser recomendadas como de segunda linha como: adesivos contendo capsaicina, lidocaína e tramadol (opióide com efeitos de inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina). Além dessas duas classes, há uma terceira linha de medicamentos que são utilizadas em últimos casos: opióides, como a morfina e toxina botulínica. Embora alguns indivíduos possam inicialmente responder a esses tratamentos, a terapia medicamentosa se torna falha ou perde a sua eficácia, além de causar diversos efeitos colaterais ao longo do tempo (Attal *et al.*, 2006; Colloca *et al.*, 2017; Mika *et al.*, 2013; Moulin *et al.*, 2014; White *et al.*, 2005).

1.4. Interações neuro-imunes na neuropatia

Alterações neuro-imunes importantes acontecem imediatamente após a lesão do sistema nervoso. Observa-se uma fase inflamatória, durante a qual, o sistema imune inato é ativado e participa na tentativa de restaurar o tecido danificado (Calvo *et al.*, 2012). A liberação de mediadores vasoativos pelo axônio lesado, como CGRP (peptídeo relacionado ao gene de calcitonina), substância P, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas, favorecem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular próxima à lesão, favorecendo o infiltrado leucocitário (Scholz e Woolf, 2007).

Os neutrófilos são as primeiras células a responderem a uma lesão no nervo periférico (Ainsworth *et al.*, 1996; Zuo *et al.*, 2003; Faurschou e Borregaard, 2003; Witko-Sarsat *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011), esses são recrutados por moléculas liberadas pelo tecido lesado, como CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, NGF e LTB4. Embora seu papel seja de curta duração e limitado ao local da lesão, os produtos liberados pelos neutrófilos, uma vez ativados, desempenham um

importante papel na sensibilização do neurônio aferente primário, além de recrutar macrófagos, particularmente durante as primeiras 24 horas após a lesão (Perkins e Tracey, 2000).

Além das células do sistema imunológico apresentarem papel na indução do sinal doloroso, já é bem descrito pela literatura a importância de citocinas e quimiocinas na indução da hiperalgesia aguda e seu envolvimento na geração da dor crônica neuropática (Cunha et al., 1992; Wagner e Myers, 1996; DeLeo et al., 1997; Arruda et al., 1998). Trabalhos citam as citocinas como elo entre a ativação e recrutamento de células imunes para local lesionado e o desenvolvimento do processo doloroso agudo e crônico (Tracey e Walker, 1995; Watkins et al., 1995).

É possível observar um significativo infiltrado de neutrófilos para o local da lesão em diferentes modelos de neuropatia, como na lesão parcial do nervo ciático/isquiático (PSNL – *partial sciatic nerve ligation*) (Zuo et al., 2003), esmagamento do ciático/isquiático (Perry et al., 1987) e lesão constritiva crônica (CCI – *chronic constriction injury*) (Clatworthy et al., 1985). Perkins e Tracey (2000) mostraram que a depleção de neutrófilos em animais submetidos a lesão de nervo periférico leva à redução da hiperalgesia térmica. Assim como trabalhos de nosso grupo descreveram a importância dessas células na geração da hipernocicepção em modelos de dor inflamatória (Cunha et al., 2008).

O decurso temporal da ativação destas células assim como o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias está intimamente relacionado ao desenvolvimento da dor crônica inflamatória e neuropática. (Cunha et al, 2005; Manjavachi et al, 2014). Trabalhos publicados na literatura indicam que receptores de reconhecimento padrão (PRRs) desempenham um papel crucial na ativação de células da imunidade inata, como os neutrófilos e consequentemente participam dos processos de indução e manutenção da dor neuropática (Hayashi et al., 2003; Zhang et al., 2010; Prince et al., 2014).

1.5. Receptores de reconhecimento padrão (PRRs)

Durante a última década, houve um rápido progresso na compreensão do reconhecimento imune inato de componentes microbianos e seu papel crítico na defesa do hospedeiro contra a infecção (Akira *et al.*, 2001; Janeway e Medzhitov, 2002). O principal avanço conceitual da imunidade inata foi a descoberta dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que distinguem estruturas microbianas conservadas, comumente referidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e substâncias endógenas liberadas durante processos de lesão celular, denominadas padrões moleculares associados à lesão (DAMPs) (Janeway e Medzhitov, 2002). Os PRRs compreendem um conjunto de sensores presentes no plasma, na membrana plasmática e no citosol das células do hospedeiro. Sua ativação promove a estimulação de várias vias de sinalização intracelulares, que levam a indução de respostas pró inflamatórias e antimicrobianas (AKIRA *et al.* 2006). Quatro classes principais de PRRs foram identificadas: receptores Toll-like (TLRs), receptores NOD-like (NLRs), receptores RIG-1-like (RLRs) e receptores de lectina tipo C (CLRs) (Chen *et al.*, 2009; Takeuchi e Akira, 2010).

1.5.1 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Os TLRs são amplamente divididos em dois subgrupos dependendo de sua localização celular e respectivos PAMPs/ DAMPs ligantes. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, expressos na superfície celular e reconhecedores de componentes da membrana microbiana, tais como lípidos, lipoproteínas e proteínas e TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, como retículo endoplasmático, endossomas, lisossomas e endolisossomas, onde reconhecem ácidos nucleicos microbianos (Kawai e Akira, 2010).

Um trabalho realizado por Tanga e colaboradores (2005) demonstrou pela primeira vez que TLR4 contribui para indução da hipersensibilidade mecânica e térmica, bem como na ativação glial após lesão do nervo periférico. Similarmente, TLR2 também desempenha um papel chave no desenvolvimento da dor neuropática (Kim *et al.*, 2007). Logo, dada a ausência de infecção, pode-se sugerir que ligantes endógenos liberados localmente durante a lesão celular poderiam ser os responsáveis por mediar o processo doloroso crônico, via ativação dos TLRs. Neste sentido, outros receptores do tipo Toll-like poderiam reconhecer produtos da lesão celular e desta forma estar envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção do processo doloroso crônico, como por exemplo, os receptores Toll-like 9.

Os receptores TLR9 reconhecem sequências específicas de oligodeoxinucleotídeo contendo o dinucleotídeo CpG não-metilado (ODN-CpG), um PAMP presente em bactérias e vírus, mas são raros em células de mamíferos (Kawai e Akira, 2010). Porém, durante lesão celular, DAMPs mitocondriais são liberados na circulação com importantes consequências imunológicas. Um DAMP mitocondrial inclui DNA mitocondrial, que ativa receptores Toll-like 9 (TLR9) por conter neste genoma repetições de ODN-CpG, uma vez que as mitocôndrias são endossimbiontes evolutivas derivadas de bactérias (Zhang *et al.*, 2010). Para evitar o reconhecimento de auto-nucleotídeos por TLRs nos endolisossomas, os mesmos são degradados por nucleases presentes no soro. Além disso, a localização intracelular de TLR9 é importante para evitar o contato com auto-nucleotídeos extracelulares (Kawai e Akira, 2010; Takeuchi e Akira, 2010).

A ativação de TLR9 induz a produção de interferon tipo I (alfa e beta), além de outras citocinas dependentes de NF- κ B via molécula de sinalização MyD88. A resposta inflamatória é orquestrada por citocinas pró-inflamatórias pleiotrópicas, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Takeuchi e Akira, 2010).

Alguns trabalhos na literatura caracterizam a expressão de receptores TLR9 em células neuronais e não neuronais (células gliais) presentes no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal (Dalpke *et al.*, 2002; Bowman *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2011). Entretanto, evidências nos levaram a hipotetizar que durante processos de dor crônica neuropática, a lesão celular resultante, assim como a consequente liberação local de DNA mitocondrial, leva a ativação do receptor TLR9 presente em células imunes infiltrantes, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da dor crônica neuropática.

Neste contexto, o presente trabalho buscou investigar o papel da ativação dos receptores TLR9 na fisiopatologia da dor neuropática.

2. *Objetivos*

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel do receptor Toll-like 9 (TLR9) no desenvolvimento da dor neuropática causada por lesão de nervos periféricos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a participação do TLR9 no desenvolvimento da dor neuropática.

2.2.2. Avaliar a expressão diferencial do TLR9 durante a dor neuropática.

2.2.3. Avaliar em quais subtipos celulares a molécula TLR9 pode estar expressa durante a dor neuropática.

2.2.4. Avaliar o papel de TLR9 sobre a migração leucocitária no sistema nervoso durante a dor neuropática.

2.2.5. Investigar o papel do TLR9 na expressão e produção de mediadores pró-inflamatórios importantes no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

3. *Material e métodos*

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens (WT) ou deficientes ($^{-/-}$) para TLR9. Camundongos foram criados no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) (ZIMMERMANN, 1983).

3.2. Modelo experimental de neuropatia (PSNL, Partial sciatic nerve ligation)

O modelo experimental de PSNL, *partial sciatic nerve ligation* ou ligadura parcial do nervo ciático/isquiático, busca reproduzir as características clínicas de uma neuropatia causada por lesão mecânica no nervo. Sob anestesia com isoflurano a 2%, o animal foi incisionado e o músculo divulsionado até que fosse possível a visualização do nervo ciático antes de sua ramificação em três segmentos, conforme pode ser visualizado no desenho representativo na figura 1. O nervo foi então isolado com uma pipeta de vidro (figura 2A), transposto por um fio de sutura de seda trançada 7.0 (agulha de 3/8 6,5 mm, Cat. 7733 – Ethicon, Johnson & Johnson) de maneira que abrangesse, aproximadamente, a metade da espessura do nervo (figura 2B), e amarrado fortemente (figura 2C). A sutura da pele foi realizada com fio de seda 4.0 (agulha de 1/2 17 mm D2764 – Ethicon, Johnson & Johnson) e o controle negativo (sham) envolveu a exposição e isolamento do nervo ciático/isquiático, sem a ligação parcial (Seltzer *et al.*, 1990).

Figura 1. Desenho representativo do modelo experimental de PSNL

(Fonte: elaborado pela autora)

Figura 2. Passos da realização do modelo experimental de PSNL. A pipeta de vidro utilizada para isolar o segmento único do nervo ciático (A), que é transposto por um fio de sutura de seda trançada 7.0 (B) de maneira que abranja aproximadamente, a metade da espessura do nervo e amarrado fortemente (C).

3.3. Avaliação nociceptiva

3.3.1. Avaliação nociceptiva mecânica - teste de von Frey filamento

A avaliação da hipersensibilidade nociceptiva mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito por Cunha e colaboradores (Cunha *et al.*, 2004), utilizando filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA). Em síntese, os animais foram acondicionados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, durante 30 minutos antes do experimento, para ambientação. Essa técnica utiliza uma série de monofilamentos de náilon para medir limiares de força dentro de um conjunto de 20 monofilamentos com aumento da rigidez (0,008g a 300g de força). Para avaliação em camundongos foram utilizados filamentos de 0,008 à 2g, os quais foram aplicados perpendicularmente, sobre a região plantar da pata traseira operada dos animais, por um período aproximado de 3 segundos ou até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por flexão seguida de retirada da pata (*flinch*). O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico de retirada.

3.3.2 Hipersensibilidade nociceptiva térmica ao frio – teste da acetona

Assim como previamente descrito para o teste de Von Frey, os camundongos também foram colocados em caixas de acrílico para ambientação por no mínimo 30 minutos. O teste nociceptivo consistiu na aplicação de 50 µl de acetona com uma seringa (sem agulha) na superfície plantar das patas traseiras lesionadas. O comportamento nociceptivo, caracterizado pelo tempo de lambida e *flinch*, foi cronometrado durante os primeiros 60 segundos após aplicação da acetona.

3.4 Ensaio de imunofluorescência

Primeiramente, animais neuropáticos ou naive foram anestesiados e perfundidos intracardicamente com PBS 1X por 2 minutos e, subsequentemente, com solução contendo paraformaldeído (PFA 4%, pH 7.3-7.4) por 4 minutos. Posteriormente, o nervo ciático extraído foi mantido em solução de PFA 4% por mais 2 horas e em seguida transferidos para solução contendo 30% de sacarose, na qual foram mantidos por 48h. Após este processo de pós-fixação/desidratação, o tecido foi incluído em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura Finetek), rapidamente congelado em gelo seco e estocado a -70°C. Os cortes (secções) foram realizados no criostato (Leica CM1850, Alemanha), sendo que os nervos ciáticos foram cortados diretamente nas lâminas com espessura de 16µm.

Para execução da imunofluorescência dos nervos ciáticos, as lâminas contendo as secções foram inicialmente lavadas 3 vezes em PBS 1X por 5 minutos cada lavagem e em seguida, incubadas em solução de glicina 0,1M por 30 minutos, para retirada completa de grupos aldeídos. Novamente, as lâminas foram lavadas em PBS 1X (3 vezes 5 minutos) e em seguida incubadas com solução contendo 2% de BSA e 0,2% Triton-X, para bloqueio de ligações inespecíficas e permeabilização dos tecidos. Após 1 hora de bloqueio/permealização, os cortes de nervo ciático foram incubados com anticorpos primários (a relação dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 1).

Todos os anticorpos foram diluídos na solução de bloqueio e mantidos a 4°C em câmara úmida, *overnight*. Após mais um ciclo de 3 lavagens, as secções foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado (tabela 1) durante 2 horas a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e montadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Laboratories). Todas as lâminas foram posteriormente visualizadas e fotografadas em microscópio confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

Primário			
Mouse anti-mouse Ly6G	1:400	BD	551459
Secundário			
Goat anti-mouse AlexaFluor594	1:800	Invitrogen	A11007
Conjugado			
Rat anti-mouse TLR9 conjugado a FITC	1:500	Invitrogen	11909382

Tabela 1. *Anticorpos utilizados para Imunofluorescência.* Da esquerda para a direita, a descrição do alvo e a espécie onde foi produzido; a diluição utilizada; a empresa produtora e a referência do produto.

3.5 Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR em tempo real)

3.5.1 Avaliação da expressão gênica: Extração de RNAm e RT-PCR em tempo real

As expressões do RNA mensageiro (RNAm) foram avaliadas por RT-PCR, que consiste na síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA), a partir da ação da enzima transcriptase reversa (RT) sobre o RNAm de cadeia simples. Em seguida, fez-se a reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real), a qual consiste em sintetizar grandes números de cópias de uma região específica da região gênica de interesse, utilizando, sequência de *primers* específicas, diferentes temperaturas e a enzima DNA polimerase.

3.5.2 Coleta das amostras

Amostras de nervo ciático foram coletadas de animais neuropáticos ou naive/sham previamente perfundidos intracardicamente e estocadas em 500 µl de solução de Trizol (Sigma-Aldrich) à -70°.

3.5.3 Processamento das amostras e extração do RNAm

Os tecidos juntamente com o Trizol foram homogeneizados, utilizando o homogenizador (IKAT 10 basic ultra-turrax). A extração do RNAm total foi realizada como se segue: para cada 500 µL de suspensão (tecido + Trizol), foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e 100 µL de água (Sigma-Aldrich). Após agitação em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa, contendo RNA, foi transferida para outro tubo, que já continha 400 µL de isopropanol (Merck) gelado. Em seguida as amostras foram agitadas no vórtex e incubadas *overnig* a -20°C. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após este procedimento, o líquido sobrenadante foi descartado cuidadosamente, ficando aderido aos tubos o precipitado de RNA. Esse precipitado foi lavado duas vezes de forma sucessiva, com 500 µL álcool etílico 80% e 500 µL álcool etílico absoluto. Em cada lavagem as amostras foram agitadas no vórtex e posteriormente centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi ressuspensão em água ultra-pura (Sigma-Aldrich). A concentração de RNA foi determinada por meio da densidade ótica no comprimento de onda de 260nm, utilizando o aparelho nanoVue plus GE®.

3.5.4 Síntese do cDNA e RT-PCR em Tempo Real

A transcrição de RNAm para cDNA, foi feita por meio da atividade da enzima transcriptase reversa MultiScribe®, utilizando-se 300-500 ng de RNAm total, e os demais reagentes fornecidos pelo kit de transcrição reversa de RNAm em cDNA - High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Para essa reação foram utilizados tempos e temperaturas estabelecidos pelo fornecedor do Kit. A reação quantitativa do PCR em tempo real foi feita no aparelho stepOne Plus Real-Time PCR System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA). O PCR em tempo real

foi executado com volume final de 6,25 μ L usando SYBR-green (3,125 μ L SYBR-green® + 0,25 μ L de *primer* sequência sense + 0,25 μ L *primer* sequência anti-sense + 1,625 μ L de água) e 1 μ L de amostra de cDNA. A placa na qual esses reagentes e amostras foram pipetados foi mantida a 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 dissociação, para as amplificações com SYBR®, foram analisadas a 65-95°C, para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Os níveis de expressão relativa dos genes alvos foram normalizados com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. As sequências dos pares de primers (camundongo) utilizados estão demonstradas na tabela abaixo.

Alvo	Sequência sense	Sequência anti-sense
GAPDH	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'
TLR9	5'-AACCGCCACTTCTATAACCAG-3'	5'-GTAAGACAGAGCAAGGCAGG-3'

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

3.6 Citometria de Fluxo

Suspensões celulares provenientes do nervo ciático de camundongos lesionados e seu respectivo controle (animais sham) foram analisadas por citometria de fluxo. Primeiramente, o tecido em questão foi coletado de animais previamente perfundidos transcardialmente com tampão fosfato salino (PBS 1M, essa concentração foi utilizada durante todos os procedimentos). Para isolamento das células do nervo ciático, o tecido coletado foi cortado em pequenos pedaços e, posteriormente, incubados em solução contendo 2% de colagenase do tipo II (Sigma- -Co, Saint Louis, EUA) por 1 hora a 37°C. A reação da enzima foi bloqueada com PBS 1X contendo 10% de soro fetal bovino. Em seguida, os órgãos foram macerados em *cell strainer* de 40 μ m, centrifugado a 500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em PBS 1X para a quantificação e análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer. Uma vez obtida as

suspensões celulares do tecido em questão, as células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e sob abrigo da luz, com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície a serem analisadas. Após incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e então adquiridas no aparelho BD FACSVerse (BD Biosciences). Os anticorpos utilizados para as marcações extracelulares foram: anti-CD45 (clone), anti-CD11b (clone) e anti-Ly6G (clone) (todos adquiridos das empresas BioLegend ou BD Bioscience, CA, EUA). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo X (Tree Star, Ashland, OR).

3.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Amostras de nervo ciático foram coletadas de animais neuropáticos ou naive previamente perfundidos intracardialmente com PBS 1X por 2 minutos. As amostras, uma vez coletadas, foram imediatamente armazenadas em gelo seco e posteriormente em freezer a -70°C. Para o processamento, foram diluídas em tampão fosfato, contendo coquetel de inibidores de protease (Complete® 1x) e 0,2% de Triton X (Famakin *et al.*, 2012). A quantidade de proteína total de cada amostra foi feita pelo método de BCA. As concentrações de quimiocinas e citocinas foram determinadas de acordo com protocolo previamente descrito (Taktak *et al.*, 1991), utilizando kits DuoSet de ensaio imunoenzimático da R&D Systems. Brevemente, após trituração, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante incubado em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo de interesse. As ligações inespecíficas foram bloqueadas por meio da incubação com BSA 1%. Posteriormente, foram colocadas as amostras para ligação ao anticorpo da placa, *overnight*, seguidos da incubação com anticorpos policlonais biotinilados contra a quimiocina/citocina de interesse. Em seguida, esses anticorpos foram marcados com avidina- HRP e a ligação entre proteína-anticorpo-avidina/HRP revelada por reação colorimétrica com TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – SureBlue™ – KPL, Cat.

95059). A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1 M e as absorbâncias determinadas em 450 nm em espectrofotômetro de placa SpectraMax 190 (Molecular Devices).

3.8 Estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) por grupo de quatro a oito animais. Conforme indicado, a análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via (*one way*), seguindo do teste (*post-hoc*) de Bonferroni, para comparação entre os diferentes grupos. Para se comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t de *student*. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0.05$. A realização das análises estatísticas citadas e confecção dos gráficos foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism 7.0*.

4. *Resultados*

4.1. A ausência do receptor TLR9 resulta em menor desenvolvimento de hipersensibilidade nociceptiva neuropática mecânica e térmica.

O primeiro passo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento da hipersensibilidade resultante da lesão mecânica no nervo ciático, em animais geneticamente deficientes para o receptor TLR9. Para isso animais C57BL/6 (aqui referenciado como *wild type* ou WT) e animais deficientes para o receptor TLR9 (aqui também referenciado como *Knockout* ou KO) foram submetidos ao modelo traumático de indução de neuropatia (PSNL) e subsequentemente e avaliados por testes comportamentais por 21 dias após a cirurgia. Com isso, foi possível observar que a hipersensibilidade nociceptiva mecânica e térmica ao frio desenvolvidas durante a neuropatia, foram reduzidas na ausência do receptor de TLR9.

A partir do sétimo dia após indução do modelo de neuropatia animais TLR9-/- apresentaram redução estatisticamente significativa do log do limiar mecânico (hipersensibilidade mecânica) em relação aos animais WT, estendendo-se até o vigésimo primeiro dia de avaliação. Ambos os grupos desenvolveram hipersensibilidade em relação ao grupo sham (figura 3).

De maneira semelhante, animais deficientes para o receptor TLR9 apresentaram redução do tempo de resposta a estímulo térmico frio (hipersensibilidade nociceptiva térmica ao frio) em relação ao grupo WT, observada a partir do sétimo dia após indução do modelo, estendendo-se até o décimo quarto dia de avaliação. Ambos os grupos, no entanto, apresentaram redução do limiar térmico quando comparados ao grupo sham. (figura 4).

Os próximos passos do nosso trabalho buscaram avaliar os mecanismos neuro-imunes pelos quais os receptores do tipo Toll-like 9 estão envolvidos na dor neuropática, iniciamos, então nossa busca pela avaliação da expressão gênica diferencial do receptor TLR9 no local da lesão (nervo ciático) em animais que sofreram o modelo de neuropatia.

Figura 3. Avaliação da hipersensibilidade nociceptiva mecânica em animais WT ou TLR9^{-/-} submetidos ao modelo de PSNL por von Frey filamento. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M., n= 7. Análise estatística por ANOVA two way, seguido de one way ponto a ponto, com post hoc de Bonferroni. *P<0,05 quando comparado ao grupo sham e #P<0,05 comparando-se os grupos WT e TLR9^{-/-}.

Figura 4. Avaliação da hipersensibilidade nociceptiva térmica ao frio em animais WT ou TLR9^{-/-} submetidos ao modelo de PSNL por teste da acetona. Resultados expressos em média $\pm$ E.P.M., n= 7. Análise estatística por ANOVA two way, seguido de one way ponto a ponto, com post hoc de Bonferroni. *P<0,05 quando comparado ao grupo sham e #P<0,05 comparando-se os grupos WT e TLR9^{-/-}.

4.2 O receptor TLR9 tem expressão gênica aumentada inicialmente após lesão de nervo periférico.

Uma vez observada a participação do TLR9 na sensibilização nociceptiva neuropática, partimos para avaliação da expressão do receptor no local da lesão (nervo ciático) e sua possível variação durante o decurso temporal inicial da neuropatia.

Para análise da expressão diferencial do gene em questão, inicialmente induzimos o modelo de neuropatia (PSNL) em animais C57BL/6 WT e subsequentemente coletamos amostras de nervo periférico 12 horas e 1, 3 e 7 dias após a cirurgia para posterior realização de RT-qPCR. Pudemos observar que a expressão do gene TLR9 estava aumentada significativamente 12 horas e 1 dia após a indução da neuropatia quando comparado ao grupo naïve, sendo que a expressão foi maior nas primeiras horas, decaindo ao longo do primeiro e terceiro dia (figura 5).

Com esses dados inferimos que o aumento da expressão do nosso gene de interesse ocorria principalmente nas primeiras horas após a indução da neuropatia (12 horas). Baseando-se nesse resultado, nosso próximo passo foi avaliar quais células estariam expressando o receptor TLR9, tanto no local da lesão, como no DGR e na medula espinal.

Figura 5. Avaliação da expressão gênica do receptor TLR9 no nervo ciático após lesão por PSNL. Expressão gênica por qRT-PCR do receptor TLR9 no nervo ciático após PSNL, em animais C57BL/6 machos. Dados representados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com $n=6$. Análise estatística ANOVA one-way, com post hoc de Bonferroni. * $P<0,05$ em relação ao grupo naïve.

4.3 Após lesão de nervo periférico, o receptor TLR9 está inicialmente expresso em neutrófilos no local da lesão.

A partir da observação de nosso dado anterior a respeito da expressão gênica de TLR9 no local da lesão, constatamos que sua expressão apresentava-se aumentada significativamente 12 horas após cirurgia, levando em conta esse achado, realizamos o ensaio de imunofluorescência no local da lesão (nervo ciático) 12 horas após indução do modelo PSNL para observação de quais células poderiam estar expressando nosso receptor de interesse. Para isso, animais WT foram submetidos a cirurgia e após tempo indicado acima foram coletadas amostras do nervo ciático para realização do ensaio de imunofluorescência. Observamos através de nossos resultados a co-localização das marcações para o receptor TLR9 e Ly6G, molécula marcadora de neutrófilos (figura 6).

Em conjunto, esses dados nos levam a inferir que a presença do receptor TLR9 se restringe ao local da lesão (nervo ciático), estando este expresso em neutrófilos. Com fundamento nesses dados, focamos nosso estudo em observar o papel do receptor TLR9 na migração leucocitária para o local lesionado.

Figura 6. *TLR9 está expresso em neutrófilos no local da lesão.* Imunofluorescência de nervo ciático lesionado por PSNL, de animais WT 12 horas após a cirurgia. Imagens realizadas em microscópio confocal Leica SP5.

4.4. A ausência do receptor TLR9 reduz a migração leucocitária de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão

Para observação da migração leucocitária para o local da lesão, inicialmente animais C57BL/6 e animais TLR9 KO, deficientes para o receptor, foram submetidos a cirurgia (PSNL) e amostras do nervo ciático coletados para citometria de fluxo 12 horas após a lesão.

Dados obtidos do experimento mostraram uma diminuição estatisticamente significativa da migração de células CD45⁺ em animais deficientes para o receptor, quando comparados aos animais WT (figura 7AeB). Observamos também uma forte tendência a diminuição da migração de células CD11b⁺ /Ly6G⁺ para o local da lesão em animais TLR9^{-/-}, quando comparados ao grupo WT (figura 7Ce D). Além disso, pudemos analisar a diminuição significativa de células CD11b⁺ /Ly6G⁻ no grupo TLR9^{-/-} comparado ao WT (figura 7CeE).

Nossos resultados demonstraram a diminuição da migração de leucócitos em animais deficientes para o receptor TLR9 que foram submetidos ao modelo de neuropatia PNL. Procuramos, então, avaliar se a ausência do receptor tem influência sobre a produção de citocinas e quimiocinas no local da lesão em animais submetidos ao modelo de neuropatia.

Figura 7. A ausência de *TLR9* altera a migração de leucócitos para o local da lesão. Dados representativos de citometria de fluxo realizada no nervo ciático de camundongos C57BL/6 machos WT ou *TLR9*^{-/-} submetidos ao modelo de PSNL. A e B, perfil do infiltrado de células CD45⁺ e C, D e E de neutrófilos (CD11b⁺, Ly6G⁺) e macrófagos (CD11b⁺, Ly6G⁻). Dados representados em média ± erro padrão da média (EPM), com n=5. Análise estatística test t com post hoc Bonferroni para comparar os grupos WT e *TLR9*^{-/-} (*P<0,05).

4.5. A ausência do receptor TLR9 modula a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no local da lesão

Inicialmente animais WT e deficientes para o receptor TLR9 foram submetidos ao modelo PSNL e 12 horas, 1 e 3 dias após cirurgia amostras do nervo ciático foram coletadas para a análise da produção de citocinas por ELISA.

Através de nossos resultados, pudemos observar que o pico de liberação de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 β , IL-6 é após 12 horas da cirurgia, quando estão aumentadas em relação aos animais sham. Estas, por sua vez, apresentaram-se reduzidas estatisticamente em animais TLR9 KO, quando comparados aos animais WT (figura 8A e B). Corroborando com essa diminuição, quimiocinas como: CCL3, CCL4 e MIP-2/CXCL2 também estavam significativamente reduzidas em animais deficientes para o TLR9, em relação ao grupo WT, 12 horas após a cirurgia (figura 8D, E e F). A quimiocina CCL2, por sua vez, não apresentou diferença estatística na comparação entre animais TLR9 KO e animais WT, porém está aumentada em relação ao grupo sham (figura 8C).

Figura 8. A ausência de *TLR9* modula a liberação de citocinas no local da lesão. Quantificação pg/mL das citocinas liberadas no segmento lesionado de nervo ciático/isquiático após PSNL, em animais C57BL/6 machos WT ou TLR9^{-/-}. Dados representados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM), com n=5. Análise estatística teste t múltiplo com post hoc de Holm-Sidak *P<0,05 em relação ao grupo WT.

5. *Discussão*

Diversas formas de lesão do sistema nervoso central e/ou periférico (provocadas por traumas, agentes tóxicos, infecções, metabólitos ou doenças de caráter autoimune) resultam em alterações profundas na função dos neurônios sensoriais primários e nas suas vias de projeção central, mas também estão associadas a uma resposta imune robusta em quase todos os níveis do sistema somatossensorial (Calvo *et al.*, 2012). O recrutamento de células inflamatórias e a expressão de citocinas têm sido reportados não apenas em modelos murinos, mas também em biópsias de nervos de pacientes com neuropatia (Empl *et al.*, 2001; Lindenlaub e Sommer, 2003; Austin e Moalem-Taylor, 2010; Kim e Moalem-Taylor, 2011). A resposta inflamatória gerada em resposta a esses danos envolve tanto células do sistema imune inato, quanto do sistema imune adaptativo, sendo que os mediadores liberados por essas células, como citocinas e quimiocinas, são capazes de alterar diretamente a transdução e transmissão de informações nociceptivas para o SNC por neurônios sensoriais (Cui *et al.*, 2000; Abbadie *et al.*, 2005; Moalem *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2008; Austin e Moalem-Taylor, 2010; Chen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Em conjunto, células do sistema nervoso lesionadas, também são capazes de liberar diferentes mediadores que induzem ativação e recrutamento de leucócitos, contribuindo com o estabelecimento e manutenção da resposta inflamatória, a qual tem início no local da lesão, mas estende-se para os corpos celulares dos neurônios lesionados, localizados no gânglio da raiz dorsal, em seguida para a medula espinal e por fim para regiões supra- espinais (White, Bhangoo, *et al.*, 2005; White, Sun, *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014). Deste modo, o estudo das interações neuro-imunes que ocorrem frente a lesão do nervo é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da dor neuropática.

Para início de nossas considerações, buscamos avaliar o desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva em animais deficientes para o receptor TLR9, submetidos ao modelo de PSNL, descrito por Seltzer e cols. em 1990 e amplamente utilizado na literatura e

em trabalhos de nosso grupo (Klusakova e Dubovy, 2009; Quadros e Cunha, 2016; Isami *et al.*, 2018). Após a cirurgia é possível observar algum comportamento de dor espontânea desde as primeiras horas até 3 dias, aproximadamente, nos animais submetidos a esse modelo, especialmente elevação e curvatura para dentro da pata ipsilateral (*guarding*), além de lambidas. O posicionamento normal da pata apenas é visível a partir do 5º dia após a cirurgia, motivo pelo qual há certa dificuldade em realizar medidas de von Frey antes desse período.

Inicialmente, notamos uma diminuição significativa do limiar nociceptivo em animais submetidos ao modelo de PSNL, quando comparados ao grupo sham, corroborando dados da literatura e demonstrando efetividade do nosso modelo na indução da dor neuropática (Woolf e Mannion, 1999). Ademais, observamos que esse aumento da hipersensibilidade nociceptiva mecânica e térmica ao frio, desenvolvido durante a neuropatia foi reduzida significativamente em animais deficientes para o receptor TLR9.

Apesar de já descrito na literatura o envolvimento de receptores TLR9 em modelos de neuropatia causada por neoplasia ou por lesão medular (Qi et al., 2011; David et al., 2013), sua relação com o modelo traumático de indução de neuropatia, PSNL, o qual mimetiza pinçamentos cirúrgicos, hérnias de discos (na qual há compressão neuronal) ou até mesmo acidentes de trânsito (nos quais pode haver lesão parcial de nervo periférico), ainda não foi explorada, e os mecanismos pelos quais o TLR9 desempenha seu papel na dor neuropática ainda são pouco caracterizados. Ademais, Mesmo já descrita a importância de receptores toll-like no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal, focamos nossa busca pelo seu papel no local da lesão (nervo periférico). Para isso, procuramos inicialmente avaliar qual o perfil de expressão diferencial do RNA mensageiro de TLR9 no nervo ciático de animais submetidos a modelo de neuropatia (PSNL). Observamos por qRT-PCR que a expressão do gene de TLR9 apresentava-se significativamente aumentada ao longo do primeiro dia após indução da neuropatia, com pico de expressão em 12 horas, tendo queda da expressão ao longo dos dias avaliados.

Baseando-se nesse dado, buscamos descobrir quais subtipos celulares estariam expressando TLR9 no local da lesão. Pelo perfil de expressão observado, enfocamos nosso estudo nas células do sistema imune envolvidas na via neural da dor, presentes nas primeiras horas após lesão, os neutrófilos.

Utilizando técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência, pudemos observar que ambos revelaram grande infiltrado de células expressando Ly6G (neutrófilos) no local da lesão, 12 horas após PSNL em animais WT, quando comparados a animais não lesionados. Esse perfil de migração, no entanto já está bem estabelecido na literatura, trabalhos caracterizam neutrófilos como células iniciais no combate ao dano tecidual (Ainsworth *et al.*, 1996; Zuo *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011). Ainda por sua vez, observamos por imunofluorescência que esses neutrófilos infiltrados no local da lesão 12 horas após indução do modelo de PSNL apresentavam expressão do receptor TLR9. Sabe-se através da literatura que os polimorfonucleares são células da imunidade inata, tipicamente conhecidas por serem as primeiras células a extravasar através dos tecidos em resposta a estímulos nocivos. Esses são altamente móveis e reativos a uma ampla gama de estímulos, como PAMPs e DAMPs (Jones *et al.*, 2016). Porém, para o reconhecimento desses estímulos, são necessários sensores de reconhecimento padrão, como os TLRs, que estão presentes nessas células, como comprovado pela literatura (Hayashi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010; Prince *et al.*, 2014). Podemos inferir com nossos dados até momento, que animais deficientes para o receptor TLR9 apresentam redução da nocicepção e que aparentemente no local da lesão de animais WT esses receptores estão expressos em neutrófilos.

Sabendo-se, então, da presença do receptor no nervo periférico, seguimos nossas análises na busca por avaliar se o TLR9 apresenta algum papel no recrutamento leucocitário para o local da lesão. Através da técnica de citometria de fluxo, observamos preliminarmente, que animais submetidos ao modelo de PSNL apresentavam aumento significativo de células

CD45⁺ infiltradas no tecido lesionado (nervo ciático), quando comparados a animais do grupo sham. Dentre essas células, a composição avaliada foi majoritariamente de neutrófilos (CD11b⁺ / Ly6G⁺) e também macrófagos (CD11b⁺ / Ly6G⁻). O perfil de células infiltradas após a lesão por PSNL obtido, reproduz totalmente os dados observados por Liou e cols. em trabalhos de 2011 e 2013. Os autores mostram, da mesma forma, que há um aumento do infiltrado de células CD45⁺ após 1 dia de PSNL, composto principalmente de neutrófilos e macrófagos. Uma caracterização detalhada da resposta neuro-imune no modelo de PSNL foi feita por Kim e Moalem-Taylor, em 2011 e demonstra exatamente o mesmo perfil inflamatório. Verificamos, entretanto, que animais *knockout* para o receptor TLR9 apresentaram redução do infiltrado, tanto de células leucocitárias totais (CD45⁺), como de neutrófilos (CD11b⁺ / Ly6G⁺) e macrófagos (CD11b⁺ / Ly6G⁻) no local da lesão, 12 horas após PSNL. Deste modo, mesmo o infiltrado inflamatório induzido por PSNL sendo classicamente descrito pela literatura (Kim *et al.*, 2011; Liou *et al.*, 2011; Liou *et al.*, 2013) este estudo foi o primeiro a demonstrar a influência do receptor TLR9 na redução dessa migração celular para o nervo periférico lesionado.

Considerando os resultados expostos até o dado momento, e sabendo-se que o recrutamento de células inflamatórias para o *site* da lesão facilita a regulação positiva de diversas proteínas envolvidas no processo inflamatório, bem como, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, e induzem a produção e secreção de mediadores algésicos, que contribuem para a geração e manutenção da dor (Moalem e Tracey, 2006; Manjavachi *et al.*, 2014). Procuramos investigar se o receptor TLR9 tem papel não só na migração leucocitária, como também na produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias no local da lesão. Através do ensaio de ELISA, observamos redução significativa (12 horas após indução da neuropatia) da produção de citocinas/quimiocinas, como: IL-1 β , IL-6, CCL3, CCL4 e CXCL2, em animais lesionados deficientes para o receptor TLR9, quando comparados com animais WT

operados , nos quais a produção dessas citocinas estava consideravelmente aumentada.

Segundo trabalhos anteriores de nosso grupo, citocinas como a IL-1 β são as primeiras citocinas pró-inflamatórias a participarem do processo doloroso e estão intimamente relacionadas à sensibilização do neurônio periférico. Tem seu papel por ativar a translocação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1 em leucócitos, levando a expressão de inúmeros produtos pró inflamatórios/nociceptivos (Cunha *et al.*, 2005). A citocina IL-6, por sua vez, também é reconhecida por ter papel na modulação da dor tanto no sistema nervoso periférico, como no SNC (Moalem e Tracey, 2006; Liou *et al.*, 2013).

De uma maneira geral, as quimiocinas também exercem importante papel na modulação do processo inflamatório e no consequente desenvolvimento da dor neuropática (Kim, 2004; Verri *et al.*, 2006; Kiguichi *et al.*, 2012), tanto por promover o influxo de leucócitos ativados ao local da lesão, que liberam mediadores pró-nociceptivos (Abbadie *et al.*, 2005), como por sensibilizar e ativar diretamente a fibra nervosa lesionada (White *et al.*, 2005). Tendo em vista que na ausência de nosso receptor animais lesionados apresentam menor produção das citocinas e quimiocinas avaliadas no local da lesão, em relação aos animais WT, podemos inferir que a presença do receptor TLR9 está intimamente relacionada não só ao infiltrado de células inflamatórias, bem como a produção de citocinas/quimiocinas no nervo periférico lesionado.

Assim sendo, com base nos resultados obtidos e nos dados da literatura, é possível propor que: no local da lesão, há aumento na expressão de TLR9, nos momentos iniciais após lesão induzida por PSNL. O receptor está localizado em neutrófilos, que são recrutados preliminarmente para o nervo periférico lesionado. O receptor TLR9 aparenta demonstrar papel no recrutamento leucocitário para o nervo, e age estimulando os neutrófilos e macrófagos infiltrados a liberarem citocinas pró- inflamatórias/nociceptivas, capazes de sensibilizar o neurônio aferente primário, induzindo o processo doloroso.

6. *Conclusão*

Foi demonstrado neste trabalho que, o receptor TLR9 tem envolvimento na hipersensibilidade nociceptiva neuropática, causada por lesão mecânica do nervo periférico, induzida pelo modelo experimental de PSNL. Há aumento da expressão de TLR9 no local da lesão no primeiro dia após indução do modelo, principalmente em neutrófilos. A sinalização do receptor TLR9 resulta tanto no recrutamento de leucócitos, majoritariamente neutrófilos e macrófagos, quanto na liberação de citocinas pró inflamatórias, capazes de sensibilizar o neurônio aferente primário. Essa sensibilização periférica contínua pode acarretar em plasticidade neuronal na via nociceptiva, levando a amplificação do sinal doloroso e cronificação da dor.

Os dados obtidos demonstram que a sinalização de TLR9 é crucial para o desenvolvimento da dor crônica neuropática, tendo seu papel demonstrado no sistema nervoso periférico, caracterizando um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dor.

7. Referências

- Abbadie, C. (2005). Chemokines, chemokine receptors and pain. *Trends Immunol.* 26(10):529-34.
- Ainsworth, T.M., Lynam, E.B., Sklar, L.A. (1996) Neutrophil function in ammatation and infection. *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2(8):675-80.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 4, 783-801.
- Aldskogius, H., Kozlova, E.N. (1998). Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Prog Neurobiol.* 55(1):1-26.
- Arruda, J.L., Colburn, R.W., Rickman, A.J., Rutkowski, M.D., DeLeo, J.A. (1998). Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: potential rol of IL-6 in neuropathic pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62,228–235.
- Austin, P.J., Moalem-Taylor, G. (2010). The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* 229(1-2):26-50.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer G., Julius D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* 139:267–284.
- Baron, R., Binder, A., Wasner, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* 9(8):807-19.
- Beck, K.D., Nguyen, H.X., Galvan, M.D., Salazar, D.L., Woodruff, T.M., Anderson, A.J., (2010). Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain.* 133, 433–447.
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain.* 136(3):380-7.
- Bourne, S., Machado, A.G., Nagel, S.J. (2014). Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin N Am.* 25(4):629-38.
- Bowman, C.C., Rasley, A., Tranguch, S.L., Marriott, I. (2003). Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia.* 43(3):281-91.
- Calvo, M., Dawes, J.M., Bennett, D.L. (2012). The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol.* 11(7):629-42.

- Clatworthy, A.L., Illich, P.A., Castro, G.A., Walters, E.T. (1995) Role of periaxonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 184:5– 8.
- Cohen, S.P., Mao, Ji. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *Bmj*, v. 348, n. f7656, p. 1-12, 2014.
- Colburn, R.W., Rickman, A.J., DeLeo, J.A. (1999) The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol.* 157(2):289- 304.
- Colloca, L. et al. Neuropathic pain. (2017) *Nature reviews. Disease primers*, v. 3, p. 17002.
- Costigan, M., Scholz, J., Woolf, Clifford J. (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience*, v. 32, p. 1-32.
- Cui, J.G., Holmin, S., Mathiesen, T., Meyerson, B.A., Linderöth, B. (2000) Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain.* 88(3):239-48.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 660e664.
- Cunha, T.M., Verri Jr., W.A., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., (2005). A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1755e1760.
- Cunha, T.M., Verri, W.A. Jr, Schivo, I.R., Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole, S., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. (2008) Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Leukoc Biol.* 83(4):824-32.
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.G., Nuñez, G. (2009). NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol.* 4:365-98.
- Chen, G. et al. (2014) Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. *Brain*, v. 137, n. 8, p. 2193-2209.
- David, B. T., Ratnayake, A., Amarante, M. A., Reddy, N. P., Dong, W., Sampath, S., Elkabes, S. (2013). A toll-like receptor 9 antagonist reduces pain hypersensitivity and the inflammatory response in spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 54, 194–205.
- Dalpke, A.H., Schäfer, M.K., Frey, M., Zimmermann, S., Tebbe, J., Weihe, E., Heeg, K. (2002). Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol.* 168(10):4854-63.
- DeLeo, J.A., Colburn, R.W., Rickman, A.J. (1997). Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. *Brain Res.* 759, 50–57.

- Devor, M. (1999). Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*. (Suppl 6):S27–35.
- Dubin, A.E., Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 120(11):3760-72.
- Earle, K.M. (1952). The tract of Lissauer and its possible relation to the pain pathway. *J Comp Neurol*. 96(1):93-111
- Emery, E.C., Luiz, A.P., Sikandar, S., Magnúsdóttir, R., Dong, X., Wood, J.N. (2016) In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv*. 2(11):e1600990.
- Empl, M. et al. (2001). TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*, v. 56, n. 10, p. 1371-7. 0028-3878
- Faurschou, M., Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 5:1317–27.
- Finnerup, N.B., Jensen, T.S. (2006) Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain-a critical analysis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2(2):107-15.
- Fu, K.Y., Light, A.R., Matsushima, G.K., Maixner, W. (1999). Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res*. 825(1-2):59- 67.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 20(3):269-87.
- Gehrmann, J. (1996). Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Res Virol*. 147(2-3):79-88.
- Gureje, O., Simon, G.E., Von Korff, M. (2001). A cross-national study of the course of persistent pain in primary care. *Pain*. 92(1-2):195-200.
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Rev*. 48(3):457-76.
- Hayashi, F., Means, T.K., Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 102, 2660–2669.
- Hu, P. et al. (2007) Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun*, v. 21, n. 5, p. 599-616.
- Huang, Y.H., Sinha, S.R., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 24(19):4551-9.

- Hucho, T., Levine, J.D. (2007). Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*. 55(3):365-76.
- Hunt, S.P., Mantyh, P.W. (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nature Reviews Neuroscience*. v. 2, n. 2, p. 83.
- Isami, K., Imai, S., Sukeishi, A., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2018). The impact of mouse strain-specific spatial and temporal immune responses on the progression of neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*. doi:10.1016/j.bbi.2018.08.013
- Jeon, Young Hoon. (2015). Herpes zoster and postherpetic neuralgia: practical consideration for prevention and treatment. *The Korean journal of pain*, v. 28, n. 3, p. 177-184.
- Ji, R.R., Xu, Z.Z., Gao, Y.J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat. Rev. Drug Discov*. 13, 533–548.
- Ji, R.R., Chamesian, A., Zhang, Y.Q. (2016). Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*. 354(6312):572-577.
- Johannes, C.B., Le, T.K., Zhou, X., Johnston, J.A., Dworkin, R.H. (2010). The prevalence of chronic pain in United States adults: results of an Internet-based survey. *J Pain*. 11(11):1230-9.
- Jones, H. R., Robb, C. T., Perretti, M., e Rossi, A. G. (2016). The role of neutrophils in inflammation resolution. *Seminars in Immunology*. 28(2), 137–145.
- Julius, D., Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413:203– 210.
- Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11(5):373-84.
- Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Kishioka, S. (2012). Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(1), 55–61.
- Kim, C.H. (2004). Chemokine-Chemokine Receptor Network in Immune Cell Trafficking. Current Drug Targets. *Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 4(4), 343–361.
- Kim, C.F., Moalem-Taylor, G. (2011). Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. *Brain Res*. 1405:95-108.
- Klusáková, I., e Dubový, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 191(3), 248–259.

- Lacroix-Fralish, M.L., Mogil, J.S. (2009). Progress in genetic studies of pain and analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49:97-121
- Lindenlaub, T., Sommer, C. (2003). Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta neuropathologica.* v. 105, n. 6, p. 593-602.
- Liou, J.T., Lui, P.W., Liu, F.C., Lai, Y.S., Day, Y.J. (2011). Exogenous granulocyte colony-stimulating factor exacerbate pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *J Neuroimmunol.* 232:83–93.
- Liou, J.T., Lee, C.M., Lin, Y.C., Chen, C.Y., Liao, C.C., Lee, H., Day, Y.J. (2013). P-selectin is required for neutrophils and macrophage infiltration into injured site and contributes to generation of behavioral hypersensitivity following peripheral nerve injury in mice. *Pain,* 154(10), 2150–2159.
- Liu, F. et al. (2017). Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroinflammation.* v. 14, n. 1, p. 70.
- Loeser, J.D., Treede, R-D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* v. 137, n. 3, p. 473-477.
- Manjavachi, M.N., Costa, R., Quintão, N.L., Calixto, J.B. (2014). The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology,* 79, 17–27.
- Mika, J. et al. (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *European journal of pharmacology.* v. 716, n. 1-3, p. 106-119.
- Miller, R.J., Jung, H., Bhangoo, S.K., White, F.A. (2009). Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol.* (194):417-49.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 10(1):23-36.
- Moalem, G., Xu, K., Yu, L. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience,* v. 129, n. 3, p. 767-777.
- Moalem, G., Tracey, D.J., (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* 51 (2), 240e264.
- Moulin, D.E. et al. (2014). Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. *Pain Research and Management.* v. 19, n. 6, p. 328-335.
- Nishikawa, N., Nomoto, M. (2017). Management of neuropathic pain. *Journal of General and Family Medicine.*

- Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A. (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161:303–310.
- Ohara, P.T., Vit, J.P., Bhargava, A., Romero, M., Sundberg, C., Charles, A.C., Jasmin, L. (2009) Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist.* 15(5):450-63.
- Olson, J.K., Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 173(6):3916-24.
- Perkins, N.M., Tracey, D.J. (2000). Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience.* 101(3):745-57.
- Perry, V.H., Brown, M.C., Gordon, S. (1987). The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med.* 165:1218–23.
- Pestana, C.R., Phelippin, D.P., Polizello, A.C., Dorta, D.J., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Doro, F.G., Rodrigues, F.P., Tfouni, E., Curti, C. (2009). Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. *Nitric Oxide.* 20(1):24-30.
- Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., Parker, L.C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(4), 397–403.
- Quadros, A.U., Cunha, T.M. (2016). C5a and pain development: An old molecule, a new target. *Pharmacological Research*, 112, 58–67.
- Qi, J., Buzas, K., Fan, H., Cohen, J.I., Wang, K., Mont, E., Klinman, D., Oppenheim, J.J., Howard, O.M. (2011). Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons. *J Immunol.* 186(11):6417-26.
- Raghavendra, V., Tanga, F.Y., DeLeo, J.A. (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci.* 20, 467-73.
- Rexed B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol.* 100(2):297-379.
- Souza, G.R., Talbot, J., Lotufo, C.M., Cunha, F.Q., Cunha, T.M., Ferreira, S.H. (2013). Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 110(27):11193-8.
- Scholz, J., Woolf, C.J. (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 10(11):1361-8.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y. (1999). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 43, 205-18.
- Stirling, D.P., Yong, V.W. (2008). Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry. *J. Neurosci. Res.* 86, 1944–1958.

- Takeshita, S., Takeshita, F., Haddad, D.E., Janabi, N., Klinman, D.M. (2001). Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides. *Neuroreport*. 12(14):3029-32.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140, 805-820.
- Taktak, Y.S., Selkirk, S., Bristow, A.F., Carpenter, A., Ball, C., Rafferty, B., Poole, S. (1991). Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J Pharm Pharmacol*. 43(8):578-82.
- Tanga, F.Y., Natile-McMenemy N., DeLeo, J.A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 5856-61.
- Tawfik, V.L., Lacroix-Fralish, M.L., Bercury, K.K., Natile-McMenemy, N., Harris, B.T., Deleo, J.A. (2006). Induction of astrocyte differentiation by propentofylline increases glutamate transporter expression in vitro: heterogeneity of the quiescent phenotype. *Glia*. 54(3):193-203.
- Tracey, D.J., Walker, J.S. (1995). Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm. Res*. 44, 407-411.
- Verri, W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S. H. (2006). Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, 112(1), 116-138.
- Wagner, R., Myers, R.R. (1996). Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *NeuroReport* 7, 2897-2901.
- Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E. (1995). Immune activation: the role of pro inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*. 63, 289-302.
- Watkins, L.R., Maier, S.F. (2000). The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol*. 51:29-57.
- White, F.A., Bhangoo, S.K., Miller, R.J. (2005). Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nature reviews Drug Discovery*. v. 4, n. 10, p. 834.
- White, F.A., Sun, J., Waters, S.M., Ma, C., Ren, D., Ripsch, M., Steflik, J., Cortright, D.N., Lamotte, R.H., Miller, R.J. (2005). Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 102:14092-14097.
- Witko-Sarsat V. (2010). Apoptosis, cell death and inflammation. *J Innate Immun*. 2(3):201-3.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 353(9168):1959-64.
- Woolf, C.J., Ma, Q. (2007). Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 55(3):353- 64.

Wieseler-Frank, J., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2005). Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals* 14(4):166-74.

Xin, J. et al. (2008). Phenotype of CD4⁺ T cell subsets that develop following mouse facial nerve axotomy. *Brain Behav Immun.* v. 22, n. 4, p. 528-37.

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 464(7285):104-7.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16,109-117.

Zuo, Y., Perkins, N.M., Tracey, D.J., Geczy, C.L. (2003). Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*. 105(3):467-79.