Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

DAVID WILSON FERREIRA

**Mecanismos nociceptivos desencadeados pela ativação espinal dos
receptores NOD2 (CARD15) na gênese da dor crônica**

Ribeirão Preto

2013

DAVID WILSON FERREIRA

**Mecanismos nociceptivos desencadeados pela ativação espinal dos
receptores NOD2 (CARD15) na gênese da dor crônica**

Versão corrigida de acordo com a Resolução CoPGr nº 6018. O documento original se encontra disponível na FMRP

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

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

Ferreira, David Wilson

Mecanismos nociceptivos desencadeados pela ativação espinal dos receptores NOD2 (CARD15) na gênese da dor crônica.

Ribeirão Preto, 2013.

114p.

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

Orientador: Thiago Mattar Cunha

Palavras-chave: Dor crônica, hipersensibilidade, muramil dipeptídeo, NOD2, células da glia, micróglia, astrócito, receptor do tipo NOD, receptores de reconhecimento padrão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

David Wilson Ferreira

Mecanismos nociceptivos desencadeados pela ativação espinal dos receptores NOD2 (CARD15) na gênese da dor crônica

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

Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Yara Cury

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Dor 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 pais, Neusa Aparecida Ferreira e Shigueru Sato, meus irmãos, Leonardo e João Pedro, pelo total apoio, compreensão, amor e carinho compartilhados durante minha vida e durante esta trajetória. Agradeço imensamente pela educação e ensinamentos e por acreditar e apoiar incondicionalmente todos os meus sonhos.

AMO VOCÊS INFINITAMENTE!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu vida, sabedoria, saúde, felicidade, aprendizado e outras mil coisas, que SOMENTE uma pessoa perfeita e única como ele poderia proporcionar.

À todos meus familiares que incondicionalmente apoiaram-me e contribuíram para minha formação e educação.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pela orientação, atenção, paciência, incentivo, confiança, aprendizagem, amizade, oportunidades e apoio constante durante a realização do meu trabalho e pela contribuição e preocupação com minha formação científica. Agradeço toda a dedicação!

Aos Professores Dr. Sérgio Henrique Ferreira, Dr. Fernando de Queiróz Cunha e Dr. José Carlos Farias Alves Filho pelo apoio ao projeto, contribuição para minha formação científica e pela oportunidade de participar do grupo NAP-DIN.

Aos Profs. Dra. Yara Cury e Dr. Wiliam Alves do Prado pelo apoio e disponibilidade de participar da minha banca examinadora, por me atenderem prontamente com atenção, engrandecendo este trabalho.

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, pelo apoio ao projeto com os animais NOD2 e RIPK2 nocautes.

À minha amiga, Andrea Gutierrez Maria (Departamento de Bioquímica – FMRP/USP), pela força, amizade, incentivo e ajuda. Agradeço de coração tudo o que você fez por mim. Serei eternamente grato!

Aos professores e amigos da FAI (Faculdades Adamantinenses Integradas), Ms. Rodrigo Otoboni Molina, Ms. Maria Lucia Tiveron Rodrigues e Ms. Fernanda Blini M. Malheiros pelo apoio e confiança durante a graduação e incentivo para a pós-graduação.

Aos amigos do LID (Laboratório de Inflamação e Dor): Jaqueline, Paulo, Gui, Ferzinha, Silvia, Daniel Callejon, Walter, Jozi, Rafa Poloni, Cris, Paula,

Paulinha, Panda, Vanessa Borges, Andreza Urba, Fabrício, Gabi, Larissa, Fabi, Flávio, Giovane, Maurício, Rafael Ferreira, Rafael França Morena, Marcelo, Dani Nascimento, Sandra, Kana, Rangel, Claudinha, Alexandre, Miriam, Andressa Duarte, Flávia, Andressa Zaparolli, Andressa Freitas e a todos os demais amigos que passaram pelo laboratório. Agradeço a convivência, amizade e aprendizagem.

Aos alunos de iniciação científica, Eleonora, Lucas, Michel e Rafael Fais. Obrigado pelo convívio e amizade.

À minha família em Ribeirão Preto, Daniel Callejon, Kanashiro, Everton, Joel e Ruimilton. Agradeço todo apoio, amizade e as inúmeras risadas.

À Flávia Santa-Cecília, minha “partner” na realização deste trabalho, pela amizade, momentos alegres, carinho, dedicação, atenção e discussões. Uma mineirinha que mora no meu coração!!!

À Miriam Fonseca, uma pessoa que não mede esforços para ajudar as pessoas e sempre prestativa. Miris, agradeço de coração por tudo!

Ao Alexandre Lopes, um verdadeiro irmão, que sempre me apoiou, incentivou e esteve ao meu lado em todos os momentos. Agradeço por tudo e desejo todo o sucesso!

Ao DOL (Dor On Line), pelas reuniões semanais que enriquecem meu conhecimento e pelas produtivas discussões sobre dor. Sinto-me gratificado por fazer parte deste grupo.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pelas disciplinas e pelo convívio e aprendizagem.

À todos os amigos pós-graduandos e funcionários do Departamento de Farmacologia, pelos relacionamentos, conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, Soninha, Fátima e Ramon, pela atenção 24 horas, eficiência, competência e por aturar todos nós, pós-graduandos [risos].

Aos funcionários Eliana, Orlando e Marquinho (Biotério da Farmacologia) e Júlio (Biotério da Genética – camundongos nocautes), pela amizade e cuidado com os animais, ponto crucial para o sucesso de qualquer experimentação animal.

Aos técnicos do laboratório de dor e inflamação: Diva, Giu, Kátia e Serginho, pelo empenho, amizade, dedicação, ensinamentos, colaboração e apoio constante para realização deste trabalho.

À especialista de laboratório, Ieda Regina, pela amizade, confiança, profissionalismo, disponibilidade, participação, ensinamento das técnicas comportamentais e contribuição durante toda a realização deste projeto. Iedinha, agradeço de coração!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram em todos os sentidos, direta e indiretamente, para realização deste trabalho.

E...à você, que neste momento está lendo esta dissertação.

**Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.**

Cora Coralina

**Maria passa na frente e vai abrindo
estradas e caminhos, abrindo portas e
portões, abrindo casas e corações...**

Maria Passa na Frente

RESUMO

FERREIRA, D. W. Mecanismos nociceptivos desencadeados pela ativação espinal dos receptores NOD2 (CARD15) na gênese da dor crônica. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Entre os PRRs (receptores de reconhecimento padrão), NOD-like receptors (NLRs), tal como NOD2, são responsáveis pela detecção intracelular de muramil dipeptídeo (MDP); padrão molecular associado a patógeno (PAMP), encontrado no peptidoglicano (PGN) de praticamente todas bactérias GRAM positiva e negativa. Após o reconhecimento e estimulação por MDP, NOD2 recruta diretamente a serina-treonina quinase RIPK2, uma proteína adaptadora importante na ativação de NFκB mediada por NOD2. A expressão de NOD2 foi descrita em macrófagos e em outras células. Além disso, trabalhos anteriores indicaram que PRRs desempenham papel crucial na ativação de células gliais da medula espinal, na indução e manutenção da dor inflamatória crônica e dor neuropática. No presente estudo, avaliamos o papel de NOD2 na modulação da sensibilidade à dor, focando sua importância na ativação de células da glia da medula espinal, bem como a sua via de sinalização (RIPK2) e liberação de citocinas pró-nociceptivas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 beta (IL-1β). Os resultados demonstram que camundongos selvagens tratados com MDP, apresentaram diminuição no limiar nociceptivo mecânico (pico entre 3 e 5 horas) comparado com o grupo controle (veículo), retornando ao basal após 48 horas. Além disso, camundongos NOD2^{-/-}, RIPK2^{-/-}, TNFR1/2^{-/-} e IL-6^{-/-} tratados com MDP não diferiram o limiar nociceptivo mecânico, comparado com seus respectivos grupos controle (veículo). Entretanto, camundongos TNFR1^{-/-}, CCR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-} e TRIF^{-/-} tratados com MDP, apresentaram diminuição no limiar nociceptivo mecânico similar aos camundongos selvagens tratados com MDP. Adicionalmente, o pré-tratamento de camundongos selvagens com IL-1ra, propentofilina, minociclina, fluorocitrato e SB 203580 inibiu o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida por MDP. Estes dados sugerem que a ativação do sensor intracelular NOD2 esta presente em células da glia da medula espinal e estimula a ativação das vias de sinalização RIPK2 e p38 MAPK com subsequente produção de IL-1β, IL-6 e TNFα, por uma via de sinalização independente de TLR4, MyD88 e TRIF. Finalmente, estes mecanismos contribuem para o processo de hipersensibilidade mecânica durante a neuropatia periférica e

representam uma nova abordagem para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dor crônica.

Palavras-chave: Dor crônica, hipersensibilidade, muramil dipeptídeo, NOD2, células da glia, micróglia, astrócito, receptor do tipo NOD, receptores de reconhecimento padrão.

ABSTRACT

FERREIRA, D. W. Nociceptive mechanisms triggered by spinal activation of NOD2 (CARD15) in the genesis of chronic pain. Thesis (Master) – Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

Among PRRs (pattern recognition receptors), NOD-like receptors (NLRs), such as NOD2 are responsible by intracellular detection of muramyl dipeptide (MDP); pathogen-associated molecular pattern (PAMP) found in the peptidoglycan (PGN) from virtually all gram positive and gram negative bacteria. Upon recognition and stimulation by MDP, NOD2 recruits directly the receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2), an adaptor protein important in the NOD2-mediated NF κ B activation. The expression of NOD2 has been described in macrophages and other cells. Moreover, previous work has indicated that PRRs play a crucial role in the activation of spinal cord glial cells, in the induction and maintenance of chronic inflammatory and neuropathic pain. In the present study, we aimed to evaluate the role of NOD2 in the modulation of pain sensitivity, focusing on its importance in the activation of spinal cord glial cells, as well as its signaling pathway (RIPK2) and release of pro-nociceptive cytokines, such as tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β). The results demonstrate that WT mice treated with MDP showed a decrease in mechanical nociceptive threshold (peak 3 to 5 hours) compared with the control group (vehicle), returning to the base line after 48 hours. Furthermore, NOD2^{-/-}, RIPK2^{-/-}, TNFR1/2^{-/-} and IL-6^{-/-} mice treated with MDP did not differ the mechanical nociceptive threshold compared with their respective control groups (vehicle). However, TNFR1^{-/-}, CCR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-} and TRIF^{-/-} mice treated MDP, showed a decrease in mechanical nociceptive threshold similar to WT mice treated with MDP. In addition, the pretreatment of WT mice with IL-1ra, propentofylline, minocycline, fluorocitrate and SB 203580 inhibited the development of mechanical hypersensitivity induced by MDP. These data suggest that activation of the intracellular sensor NOD2 present in spinal cord glial cells stimulates the activation of RIPK2 and p38 MAPK signaling pathways and subsequent production of IL-1 β , IL-6 and TNF α , in a TLR4-, MyD88- and TRIF-independent signaling pathway. Finally, these mechanisms contribute to the process of mechanical hypersensitivity during peripheral neuropathy and represent a novel approach for elucidating the mechanisms underlying pathophysiology of chronic pain.

Keywords: Chronic pain, hypersensitivity, muramyl dipeptide, NOD2, glial cells, microglia, astrocytes, NOD-like receptors, pattern recognition receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sinalização de NLR (NOD2).....	41
Figura 2.	Via de sinalização de NOD1 e NOD2.....	43
Figura 3.	Curvas de doses e tempos resposta de hipersensibilidade nociceptiva mecânica causada pela ativação espinal de NOD2.....	59
Figura 4.	Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida por MDP é mediada pela ativação espinal dos receptores NOD2.....	60
Figura 5.	Proteína adaptadora RIPK2 é importante para desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida por MDP.....	62
Figura 6.	A hipersensibilidade mecânica induzida por MDP é independente do receptor de reconhecimento padrão TLR4.....	64
Figura 7.	MDP induz hipersensibilização mecânica por uma via de sinalização independente da proteína adaptadora MyD88.....	65
Figura 8.	MDP induz hipersensibilização mecânica por uma via de sinalização independente da proteína adaptadora TRIF.....	66
Figura 9.	Células da glia estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	68
Figura 10.	Micróglia estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	69
Figura 11.	Astrócitos estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	70
Figura 12.	TNF participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	73
Figura 13.	Receptores de TNF do tipo 2 são importantes para o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	74
Figura 14.	Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e produção de TNF- α	75
Figura 15.	IL-1 β participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	77
Figura 16.	Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e produção de IL-1 β	78
Figura 17.	IL-6 participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	80
Figura 18.	Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e	

	produção de IL-6.....	81
Figura 19.	Hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2 é independente do receptor de quimiocina CCR2.....	83
Figura 20.	Via de sinalização p38 MAPK contribui para o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(-/-)	geneticamente deficiente/nocaute para
AIA	artrite induzida por antígeno
ATP	trifosfato de adenosina
ATPase	adenosina trifosfatase
BIR	repetição da IAP do baculovirus
BSA	albumina de soro bovino
CARD	domínio de recrutamento de caspase
CARD12	domínio de recrutamento de caspase 12
CARD6	domínio de recrutamento de caspase 6
CBA	cytometric bead array
CCL2 (ou MCP-1)	proteína quimioatraente de macrófagos e monócitos
CCR2	receptor 2 de quimiocina (motif C-C)
CD14	cluster de diferenciação 14
CFA	adjuvante completo de Freund
CLR	receptor de lectina tipo C
DAMPs	padrões moleculares associados à lesão
DMSO	dimetilsulfóxido
GRD	gânglio da raiz dorsal
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática
E.P.M.	erro padrão da média
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GTPase	guanidina trifosfatase
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
iE-DAP	γ-D-meso-glutamil-ácido diaminopimérico
IFN	Interferon
IFN _γ	interferon gama
IKK	complexo IκB quinase
IKK _α	inibidor de NF-κB quinase α
IKK _β	inibidor de NF-κB quinase β
IL-1ra	antagonista do receptor de interleucina 1

IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
JNK	c-Jun N-terminal quinase
L3, L4 e L5	segmentos lombares 3, 4 e 5
LPS	lipopolissacarídeo
LRRs	repetições ricas em leucina
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDP	muramil dipeptídeo
mFPR2	receptor de formil peptídeo 2
MyD88	molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	cloreto de sódio
NEMO (ou IKK γ)	modulador essencial de NF- κ B
NF- κ B	fator nuclear kappa beta
NLR	receptor do tipo NOD
NLRP3	receptor de domínio de oligomerização de nucleotídeo-3-fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOD (ou NBD)	domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo
NOD1 (ou CARD4)	domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo 1
NOD2 (ou CARD15)	domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo 2
OPD	o-fenilenediaminadihidroclorato
p38 MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno p38
PAMPs	padrões moleculares associados à patógenos
PBS	tampão fosfato salina
PGN	peptideoglicano
PKR	proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA
PRRs	receptores de reconhecimento padrão
PYD	domínio pirina
RIPK2 (ou RICK)	serina-treonina quinase 2 de interação com o receptor
RLR	receptor do tipo RIG-I (gene induzido por ácido retinóico I)
SNC	sistema nervoso central
SNI	transecção dos ramos peroneal e tibial
SNL	ligadura do nervo espinal
TAK1	quinase 1 ativada pelo fator de transformação do crescimento β

TLRs	receptores do tipo Toll
TLR4	receptor do tipo Toll 4
TLR5	receptor do tipo Toll 5
TLR9	receptor do tipo Toll 9
TNFR1	receptor de TNF do tipo 1 (<i>p55</i>)
TNFR1/2	receptor de TNF do tipo 1/2 (<i>p55/p75</i>)
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
TRIF	adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β
WT	camundongo selvagem
i.t.	intratecal
%	porcentagem
°C	grau Celsius
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ mol	micromol
g	grama
M	molar
n=	número igual a
nm	nanômetro
nmol	nanomol
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
κ	kappa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	29
1.1. Dor Neuropática.....	30
1.2. Células gliais da medula espinal e dor neuropática.....	32
1.2.1. Mecanismos de ativação glial na gênese da dor neuropática.....	34
1.2.2. Receptores de reconhecimento padrão e ativação glial.....	36
1.2.3. NOD2 e células gliais.....	39
2. Objetivos.....	46
3. Material e métodos.....	49
3.1. Animais.....	50
3.2. Drogas.....	50
3.2.1. Administração de drogas por via intratecal (i.t.).....	51
3.3. Teste de hipersensibilidade nociceptiva mecânica: teste de von Frey filamento..	51
3.4. Quantificação de citocinas pelo método de ELISA.....	52
3.5. Quantificação de citocinas por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>).....	53
3.6. Avaliação da expressão de genes: extração de RNA e RT-qPCR em tempo real.	53
3.6.1. Processamento das amostras e extração de RNA.....	54
3.6.2. Síntese de cDNA e RT-qPCR em tempo real.....	54
3.7. Análise estatística.....	56
4. Resultados.....	57
4.1. Ativação espinal de NOD2 induz intensa hipersensibilidade nociceptiva mecânica.....	58
4.2. Recrutamento da proteína adaptadora RIPK2 está envolvido no efeito pró-nociceptivo produzido pela ativação espinal de NOD2.....	61
4.3. A hipersensibilidade nociceptiva mecânica produzida pela ativação espinal de	

NOD2, é independente de TLR4 e das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF..	63
4.4. Células da glia (microglia e astrócitos) estão envolvidas na hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	67
4.5. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por TNF- α	71
4.6. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por IL-1 β	76
4.7. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por IL-6.....	79
4.8. O desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2 não é dependente do receptor de quimiocina CCR2.....	82
4.9. Envolvimento da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.....	84
5. Discussão.....	86
6. Conclusão.....	97
7. Referências.....	99
8. Anexos.....	113

1. Introdução

1.1. Dor Neuropática

Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Como uma experiência, dor inclui não só a percepção consciente de um evento sensorial, mas também a análise cognitiva e resposta emocional associada com a experiência. A quantificação de uma experiência é problemática na melhor das hipóteses com seres humanos, e provavelmente impossível com animais de laboratório. Assim, a fim de estudar a dor sob estas limitações, foi criado o termo nocicepção que se refere aos aspectos sensoriais da complexa resposta dolorosa. O termo “nocicepção” (“noci” significa “nocivo”; “cepção” significa “recepção”) é usado para descrever a sensação de “dor”, como a observada em animais de laboratório. Especificamente, a nocicepção refere-se à detecção de um estímulo nociceptivo. A avaliação da nocicepção em animais de laboratório com frequência, baseia-se na medida dos comportamentos defensivos (“reflexos nociceptivos”) apresentados pelos mesmos quando desafiados por estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Os receptores expressos nos campos terminais dos neurônios sensoriais, que são responsivos aos estímulos nocivos, são referidos como “nociceptores”, e os neurônios que respondem a estímulos nocivos são referidos como “neurônios nociceptivos” (WIESELER-FRANK *et al.*, 2004).

Um dos maiores desafios para a terapêutica analgésica é o alívio de dores crônicas. Um exemplo bastante característico desse tipo de dor é a dor neuropática. Além de representar um problema de saúde pública, ela afeta negativamente a qualidade de vida dos pacientes, por constituir um sintoma incapacitante. Ela pode ser resultante de doenças ou injúrias que acometem diretamente o sistema nervoso periférico ou o sistema nervoso central (SNC), como, por exemplo, lesões traumáticas, intervenção cirúrgica, doenças como diabetes ou

infecções, entre outras (SELTZER *et al.*, 1999; AUSTIN & MOALEM-TAYLOR, 2010). O dano ao tecido nervoso resulta em aumento da sensibilidade a estímulos dolorosos, além dos inócuos passarem a serem percebidos como dolorosos. Esta hipersensibilidade neuropática pode ser devida principalmente às alterações centrais ou espinais e pela sensibilização dos aferentes primários nociceptivos (WALKER *et al.*, 1995).

Ativação, modulação e modificação são distintas formas de plasticidade neuronal (capacidade dos neurônios em alterar suas funções, perfil químico ou estrutura) que ocorrem nos neurônios sensoriais primários ou do corno dorsal, aumentando o ganho no sistema somatosensorial para produzir hipersensibilidade (WOOLF & SALTER, 2000). Após lesão do nervo, essa amplificação periférica e central passa a ocorrer devido à alteração da expressão de receptores, canais iônicos e neurotransmissores, aumento da excitabilidade neuronal e geração ectópica de potenciais de ação, acoplamento simpático-sensitivo, morte das células neuronais, facilitação e desinibição da transmissão sináptica, além de mudanças na conectividade sináptica e reorganização dos circuitos nociceptivos centrais (AUSTIN & MOALEM-TAYLOR, 2010). Mudanças funcionais pré-sinápticas após lesão do nervo periférico, que podem aumentar a eficiência sináptica, incluem alterações na síntese de transmissores e neuromoduladores (OBATA *et al.*, 2003) e na densidade de canais de cálcio (LI *et al.*, 2004). Já as mudanças pós-sinápticas podem envolver, por exemplo, fosforilação da subunidade dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), importante para o desenvolvimento da sensibilização central (ULTENIUS *et al.*, 2006).

Entretanto, a patogênese da dor neuropática não é simplesmente caracterizada por alterações na atividade dos sistemas neuronais, mas envolve também a interação entre neurônios e principalmente interação neurônio-glia, visto que as células gliais da medula espinal desempenham papel importante na manutenção da sensibilização central e consequentemente, na perpetuação da dor crônica.

1.2. Células gliais da medula espinal e dor neuropática

As células da glia, que superam os neurônios em número, constituem cerca de 70% da população de células do SNC. Existem vários subtipos celulares, como astrócitos, micróglia residentes, micróglia perivascular e oligodendrócitos, que têm funções distintas na regulação do processamento da dor (MILLIGAN & WATKINS, 2009). Estas células eram consideradas exclusivamente células de suporte, todavia esta visão tem sido alterada com a divulgação de um grande número de estudos destacando a importância da glia para a função neuronal e, principalmente, indicando o papel crucial destas em patologias como Mal de Parkinson e Alzheimer (ROGERS *et al.*, 2007). A importância das células da glia no SNC e o papel da comunicação entre estas células e os neurônios têm sido descritos em diversos estudos.

Os astrócitos são derivados da neuroectoderme, compreendem o tipo de célula glial mais abundante no SNC. Além de funções de suporte ao neurônio, os astrócitos também alteram diretamente a comunicação neuronal, pois encapsulam completamente as sinapses e estão em contato com os somas neuronais (HAYDON, 2001). Além disso, controlam a composição extracelular em termos de íons, aminoácidos e outras substâncias neuroativas (HANSSON & RONNBACK, 2003).

A micróglia residente, classicamente conhecida como os macrófagos do SNC, são células hematopoiéticas derivadas da medula óssea que invadem o SNC durante o desenvolvimento embrionário (MILLIGAN & WATKINS, 2009). Em condições normais, a micróglia residente encontra-se em estado de repouso (BIBER *et al.*, 2007). Geralmente, a micróglia atua como primeira linha de defesa contra a invasão de organismos patogênicos, pelo reconhecimento, sequestro e processamento do antígeno. Todavia, as micróglias (ambos subtipos, residente e perivascular) expressam muitos dos receptores de

neurotransmissores que são encontrados em astrócitos e neurônios (POCOCK & KETTENMANN, 2007).

A glia chamou a atenção de pesquisadores da dor no início da década de 90, quando Garrison e colaboradores (1991) demonstraram que a indução da hiperalgesia em ratos neuropáticos se correlacionava com o aumento na expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), indicativo de ativação desse tipo celular.

No sentido de identificar os diversos neuromoduladores da dor derivados da glia, várias técnicas são utilizadas. Os estudos que envolvem o bloqueio farmacológico glial, utilizados para romper a função glial, por sua vez, rompem a hiperalgesia e alodínia em modelos animal de dor neuropática. Os compostos mais bem caracterizados na literatura incluem fluorocitrato, um bloqueador da atividade metabólica glial pela inibição da aconitase, uma enzima do ciclo de Krebs encontrado na glia (PAULSEN *et al.*, 1987; MELLER *et al.*, 1994; MILLIGAN *et al.*, 2003); minociclina, um derivado da tetraciclina que seletivamente inibe micróglia e pode atravessar a barreira hemato-encefálica (RAGHAVENDRA *et al.*, 2003; LEDEBOER *et al.*, 2005); e propentofilina, um derivado de metilxantina que reduz a reatividade glial (SWEITZER *et al.*, 2001; TAWFIK *et al.*, 2007; OBATA *et al.*, 2010).

Ainda neste contexto, a micróglia desempenha papel importante na dor neuropática. Raghavendra e colaboradores (2003) demonstraram que em modelo de neuropatia, o desenvolvimento da alodínia mecânica e hiperalgesia térmica foram inibidos pela administração sistêmica de minociclina, administrada uma hora antes da cirurgia e nos dias subsequentes. Entretanto, o mesmo não foi observado quando a minociclina foi administrada quando a hipersensibilidade neuropática estava estabelecida, sugerindo que a micróglia tem fundamental participação na indução da dor neuropática, mas que tem pouco ou nenhum papel na manutenção do quadro. Além disso, foi verificado que minociclina, administrada via intratecal (ao nível de L5/6), previne o desenvolvimento de comportamentos nociceptivos

induzidos pela ligação do nervo espinal (LIN *et al.*, 2007). Somando-se a essas evidências, Tanga e colaboradores (2004) demonstraram uma distinta resposta glial ao avaliar a expressão gênica após lesão do nervo periférico, evidenciando que a ativação microglial inicial, seguida de ativação astrocitária, implica que os astrócitos estão envolvidos na fase de manutenção da dor neuropática.

Embora encontra-se bem estabelecido na literatura de que as micróglia participam da fase inicial (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008) e os astrócitos na fase de manutenção da dor neuropática (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009), um trabalho realizado por Tawfik e colaboradores (2007) demonstrou importante papel da micróglia na manutenção a longo prazo de hiperalgesia, mostrando que esse comportamento pode ser atenuado com a administração de propentofilina 4 a 6 semanas pós-lesão (TAWFIK *et al.*, 2007), confirmando o envolvimento da micróglia tanto no desenvolvimento como na manutenção da hipersensibilidade à dor (LEDEBOER *et al.*, 2005; CLARK *et al.*, 2007; MARCHAND *et al.*, 2009). Além do papel das células gliais na dor neuropática, astrócitos e micróglia espinais também possuem fenótipo reativo no desenvolvimento da dor aguda (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2008).

1.2.1. Mecanismos de ativação glial na gênese da dor neuropática

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ativação das células gliais na medula espinal e sua contribuição para a gênese da dor crônica. As células gliais podem ser ativadas em resposta a trauma do SNC, isquemia, tumores, neurodegeneração, neurotransmissores e neuromoduladores (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005). O que se acredita fundamentalmente é que durante os processos de lesão tecidual (inflamação) ou nervosa (neuropatia), a constante estimulação das vias nociceptivas leva a uma intensa

liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P, ATP) na medula espinal, os quais seriam responsáveis pela ativação das células da glia (MILLIGAN & WATKINS, 2009).

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 (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004). Embora os mecanismos pelos quais os mediadores pró-inflamatórios gliais aumentam a excitabilidade neuronal encontram-se em constante investigação, os dados atuais da literatura sugerem que os sinais imunes tradicionais, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, medeiam a comunicação neurônio-glia, culminando no processo de dor patológica (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005). Além disso, citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 podem, independentemente ou em combinação, mediar a sensibilização central do corno dorsal da medula espinal e do gânglio da raiz dorsal (GRD) (OZAKTAY *et al.*, 2006; KAWASAKI *et al.*, 2008).

A ativação microglial induzida após lesão do nervo periférico é caracterizada por fosforilação e consequente ativação de p38 MAPK (JIN *et al.*, 2003), ERK (ZHUANG *et al.*, 2005) e quinases da família Src (KATSURA *et al.*, 2006) que resultam em hipersensibilidade mecânica. Além disso, a micróglia ativada expressa CCR2 (o receptor para a quimiocina CCL2) contribuindo para o desenvolvimento da alodínia mecânica após lesão do nervo, efeito anulado em camundongos deficientes para CCR2. Ainda, o recrutamento e a ativação de macrófagos e micróglia periféricamente e no tecido neural, pode contribuir para dor inflamatória e neuropática (ABBADIE *et al.*, 2003).

Adicionalmente, outro alvo farmacológico é a p38 MAPK. Existem quatro isoformas diferentes de p38; α , β (principais isoformas no sistema nervoso maduro), γ e δ (KUMAR *et al.*, 2003; JI & SUTER, 2007). Em modelo de dor neuropática, a ativação dessa enzima pode ocorrer em neurônios do GRD e na medula espinal. Na medula espinal, a p38 MAPK

fosforilada é restrita a micróglia, e o pré e pós-tratamento com o inibidor SB203580 por via intratecal, reduz a alodínia mecânica induzida pelo modelo de ligadura do nervo espinal (SNL) (JIN *et al.*, 2003; TSUDA *et al.*, 2004), evidenciado o importante papel da ativação de p38 na indução e desenvolvimento da dor neuropática. Além disso, em condição de dor neuropática, animais tratados com minociclina, apresentam diminuição dos níveis de p38 fosforilada (HAINS & WAXMAN, 2006).

Além dos mecanismos citados acima, alguns trabalhos têm indicado que os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), também desempenham papel crucial na ativação das células gliais da medula espinal, contribuindo para indução e manutenção da dor neuropática (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; TANGA *et al.*, 2005).

1.2.2. Receptores de reconhecimento padrão e ativação glial

O principal avanço conceitual na 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) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

Os PRRs compreendem um conjunto de sensores presentes no plasma, na membrana plasmática e no citosol das células do hospedeiro. A sua ativação por estímulos microbianos ou endógenos, resulta na ativação de várias vias de sinalização intracelulares, incluindo o fator nuclear- κ B (NF- κ B), as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a reposta de interferon tipo I (IFN), que leva 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 & AKIRA, 2010). A maioria do

conhecimento sobre PRRs deriva de estudos sobre os TLRs, que se localizam tanto na superfície celular quanto em endossomas (TAKEDA & AKIRA, 2005; UEMATSU & AKIRA, 2007), e os NLRs, do tipo domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo (NOD), que são sensores citosólicos intracelulares (CHISHOLM *et al.*, 2006).

Os TLRs foram descritos pela primeira vez a partir da mosca de fruta (UEMATSU & AKIRA, 2007) e são caracterizados por repetições ricas em leucina (LRRs), uma região transmembrana seguida por um domínio citoplasmático homólogo Toll/IL-1R (TIR). Existem 13 TLRs descritos em mamíferos. Funcionalmente, foram identificados 10 TLRs em humanos (TLR1-10) e 12 TLRs em camundongos (TLR1-9;11-13), uma vez que TLR10 não é funcional em camundongos (KAWAI & AKIRA, 2010; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Já os NLRs foram identificados primeiramente em plantas, onde desempenham função crítica de resistência a doenças promovidas por micróbios patogênicos e parasitas (CHISHOLM *et al.*, 2006).

Conforme descrito, glia, em seu papel de células imunocompetentes, são ativadas na invasão do patógeno. Semelhante às clássicas células imunes inatas, incluindo macrófagos e células dendríticas, astrócitos e micróglia tornam-se ativados por patógenos pelo reconhecimento específico de padrões moleculares presente nas proteínas patogênicas e detritos celulares tóxicos durante a infecção ou lesão tecidual (NGUYEN *et al.*, 2002). De fato, a ativação imune das células gliais, pela administração intratecal tanto de componente da parede celular bacteriana, o lipopolissacarídeo (LPS) (MELLER *et al.*, 1994), quanto de proteínas do envelope viral (glicoproteína do envelope do HIV, gp120) (MILLIGAN *et al.*, 2001) desencadeiam hiperalgesia. Ambos, astrócitos e micróglia expressam uma grande variedade de PRRs, incluindo receptores toll-like (TLRs) (OLSON & MILLER, 2004; CARPENTIER *et al.*, 2008).

Como citado anteriormente, alguns trabalhos têm indicado que PRRs desempenham papéis cruciais na ativação das células da glia da medula espinal, mediando a indução e manutenção da dor neuropática. Dados da literatura apoiam a ligação entre dor neuropática e resposta imune inata mediada pela ativação de TLRs. Um trabalho realizado por Tanga e colaboradores (2005) demonstrou pela primeira vez, que TLR4 possui papel chave na indução da hipersensibilidade tátil e térmica, ativação microglial e aumento da expressão gênica de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , após lesão do nervo, visto que essas características foram atenuadas em camundongos deficientes ou mutantes de TLR4 e em ratos tratados com TLR4 ODN-antisense. Similarmente, TLR2 também contribui para indução da alodínia mecânica, hiperalgesia térmica, ativação das células gliais da medula espinal (microglia e astrócitos) e aumento da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida por lesão do nervo, uma vez que todas essas características foram reduzidas em camundongos deficientes para TLR2 (KIM *et al.*, 2007). Além disso, Cao e colaboradores (2009) demonstraram que CD14, uma molécula acessória na via de sinalização LPS-TLR4, esta envolvida no desenvolvimento da alodínia mecânica e hiperalgesia térmica após transecção do nervo espinal. Ainda, foi observado aumento da expressão de CD14 na superfície de células microgliais da medula espinal, evidenciando a contribuição de CD14 na dor neuropática dependente de TLR4. Embora não se saiba exatamente como os TLRs são ativados durante a neuropatia, visto que não há produtos bacterianos (PAMPs), seria possível a participação de substâncias endógenas que são liberadas durante processos de lesão celular. Estas substâncias têm sido recentemente denominadas padrões moleculares associados à lesão (DAMPs).

Uma vez evidenciada a participação dos TLRs no processo de ativação das células gliais da medula espinal e conseqüentemente no desenvolvimento e/ou manutenção do processo doloroso crônico, sabendo que os receptores NLRs são expressos pelas células gliais, é

possível que estes receptores também possam desempenhar papel importante na dor neuropática.

1.2.3. NOD2 e células gliais

Os primeiros sensores intracelulares de PAMPs da família NLRs a serem descobertos foram NOD1 (CARD4) e NOD2 (CARD15) (INOHARA *et al.*, 1999; OGURA *et al.*, 2001a). Eles são membros da família NLR (também conhecido como NOD-LRR, NACHT-LRR e CATERPILLER). Os NOD-like receptors caracterizam-se por três domínios distintos: domínio do tipo repetições ricas em leucina (LRR) na região C-terminal, que está envolvido no reconhecimento do ligante; um domínio central NOD (também conhecido como NACHT), que facilita a auto-oligomerização e possui atividade ATPase; e um domínio efetor, que pode ser um domínio pirina (PYD), CARD (domínio de recrutamento de caspase) ou um domínio BIR (repetição da IAP do baculovirus) na região N-terminal (MEYLAN *et al.* 2006; STROBER *et al.* 2006).

Entre os NLRs, o NOD1 e NOD2 são os mais estudados. Peculiarmente, NOD2 contém dois CARDS N-terminal, para a interação com outras proteínas contendo CARD (enquanto NOD1 contém um único domínio CARD), um NOD intermediário para oligomerização, e 11 repetições ricas em leucina (LRRs), responsáveis pela detecção da presença intracelular de muramyl dipeptídeo (MDP) (TANABE *et al.* 2004; STROBER *et al.* 2006), encontrado no peptidoglicano (PGN) de quase todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MCDONALD *et al.*, 2005). O muramyl dipeptídeo pode ser liberado pela ação das hidrolases bacterianas durante a biossíntese da parede celular e remodelação, ou após a degradação de bactérias por lisozimas do hospedeiro (MEYLAN *et al.* 2006). Embora estudos iniciais

identificaram o LPS como um ligante de NOD2 (OGURA *et al.*, 2001b), encontra-se bem estabelecido na literatura que MDP é agonista de NOD2.

A expressão de NOD2 é restrita, tendo sido descrita em macrófagos (OGURA *et al.*, 2001a), células dendríticas (INOHARA, *et al.*, 2005), células de Paneth (OGURA *et al.*, 2001a), queratinócitos (VOSS *et al.*, 2006), células epiteliais do intestino (HISAMATSU *et al.*, 2003), pulmão (UEHARA *et al.*, 2007) e cavidade oral (UEHARA *et al.*, 2005). NOD2 é expresso no citoplasma, mas foi demonstrado que uma fração do NOD2 pode estar associado a membrana plasmática (BARNICH *et al.*, 2005). A expressão de NOD1 e NOD2 é regulada por citocinas pró-inflamatórias, porém a mesma ocorre de uma maneira ligeiramente diferente entre ambos. No caso de NOD2, a expressão basal de proteína pelas células epiteliais é baixa, contudo TNF- α é capaz de induzir a regulação positiva de NOD2 em células epiteliais, e o co-tratamento com IFN γ contribui sinergicamente para essa regulação (ROSENSTIEL *et al.*, 2003).

Atualmente, na literatura, existem poucos mecanismos que demonstram a maneira com que ocorre o transporte do MDP extracelular para o meio intracelular e sua respectiva detecção por NOD2, porém, encontra-se bem caracterizado que em macrófagos, o mecanismo de internalização de MDP, que é crítico para sinalização e ativação de NOD2, é regulado por endocitose dependente de clatrina, assim como dinamina (GTPases que são essenciais para formação de vesículas revestidas por clatrina da membrana plasmática) (URRUTIA *et al.*, 1997). Similarmente, LPS também sofre ação de uma via endocítica que é dependente de clatrina e dinamina (HUSEBYE *et al.*, 2006). Outra característica importante na sinalização induzida por MDP em macrófagos é a acidificação e/ou maturação vacuolar. Todos esses fatores são importantes para ativação de NF- κ B e MAPK, assim como secreção de citocinas pró-inflamatórias (MARINA-GARCÍA *et al.*, 2009). Como há algumas características em

comum entre macrófagos e células da glia, esses mecanismos de transporte também podem constituir a via endocítica MDP-NOD2 em células da glia.

Tem sido proposto que, na ausência de agonista, NOD2 encontra-se em um estado inativo, com as LRRs dobradas sobre a região de NOD (ou NBD – domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo). Após a detecção do MDP, NOD2 sofre mudança conformacional que expõe o NOD, promovendo oligomerização de NOD2 e exposição de seus CARDS (TANABE *et al.* 2004; STROBER *et al.* 2006).

Figura 1. Sinalização de NLR (NOD2). A proteína NOD2 pode repousar em uma conformação auto-inibida “inativa” por meio da inibição intramolecular do domínio NACHT (NBD) por LRRs. O reconhecimento do ligante (MDP) pode causar mudança conformacional de NOD2. A ligação do trifosfato de adenosina (ATP) ao domínio NBD desencadeia modificações adicionais em sua conformação, o que leva a oligomerização das moléculas. Subsequentemente, a oligomerização de NOD2 recruta a molécula efetora RIPK2, que autofosforila e ativa sua cascata de sinalização subjacente, incluindo MAPKs e NF- κ B. Ao lado, é mostrado a oligomerização

de NLRs, onde NBD é indicado por azul, LRRs são indicados por amarelo e domínio de interação proteína-proteína são indicados por vermelho. Modificado de WILMANSKI *et al.*, 2008.

Dando sequência a detecção microbiana, o NOD2 recruta diretamente a serina-treonina quinase RIPK2 [também conhecida como proteína 2 de interação com o receptor (RIP2), RICK, CARDIAK e CCK] através de interações homotípicas CARD-CARD (INOHARA *et al.*, 1999; OGURA *et al.*, 2001a). A ativação de RIPK2 leva a poliubiquitinação K63 do inibidor de NF- κ B (IKK γ ou NEMO) no sítio de ubiquitinação, que é seguido pela fosforilação de IKK β , bem como a fosforilação de I κ B e posterior degradação proteossomal, e a liberação de NF- κ B para translocação em direção ao núcleo (INOHARA *et al.*, 2000; ABBOTT *et al.*, 2004; STROBER *et al.* 2006). Além de NF- κ B, a estimulação de NOD2 resulta na ativação de MAPKs, que leva a transcrição de numerosos genes envolvidos na imunidade inata e adaptativa (HAYDEN & GHOSH, 2004). Confirmando a importância da sinalização do NOD2 via RIPK2, células provenientes de animais deficientes para a molécula RIPK2 não são capazes de ativar o NF- κ B após estímulo com o ligante de NOD2 (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

A ilustração abaixo, demonstra a via de sinalização de NLRs (NOD1 e NOD2) e os eventos subjacentes à ativação por seus respectivos ligantes, γ -D-meso-glutamil-ácido diaminopimérico (iE-DAP) e muramil dipeptídeo (MDP).

Figura 2. Via de sinalização de NOD1 e NOD2. Após reconhecimento de seus respectivos ligantes, NOD1 e NOD2 recruta RICK por meio da interação CARD-CARD. No caso de NOD2, a ativação de RICK leva a poliubiquitinação K63 do inibidor de NF- κ B (IKK γ , também conhecido como NEMO, o membro chave do complexo IKK) no sítio de ubiquitinação (resíduo de lisina na posição 285). Isso é seguido pela fosforilação de IKK β , bem como a fosforilação de I κ B e posterior degradação proteossomal, e a liberação de NF- κ B para translocação em direção ao núcleo. CARD12 regula negativamente a ativação de NF- κ B mediada por RICK em NOD1 e NOD2, e CARD6 somente regula negativamente em NOD1. Além da ativação de NF- κ B, a sinalização de NOD1 e NOD2 dá origem à ativação de MAPKs, tais como JNK, ERK e p38 MAPK (indicado por setas tracejadas). Modificado de STROBER *et al.* 2006.

Os recentes interesses em NOD2, foram gerados pela associação de mutações no mesmo com duas desordens inflamatórias crônicas, a doença de Crohn, uma doença inflamatória comum do trato intestinal, apresentando mutação na região LRR (OGURA *et al.*,

2001b; HUGOT *et al.*, 2001), e a síndrome de Blau, um traço autossômico dominante que é caracterizado por artrite, uveíte e erupções cutâneas, apresentando mutação na região NBD (MICELI-RICHARD *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

Um trabalho recente publicado por Vieira e colaboradores (2012) demonstrou que, em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), camundongos selvagens apresentaram hipersensibilidade mecânica articular, no qual foi reduzida em camundongos deficientes para NOD2 e RIPK2. Entretanto, o mesmo não foi observado em camundongos imunizados deficientes para NOD1, demonstrando a participação de NOD2 na dor inflamatória na artrite reumatoide (VIEIRA *et al.*, 2012). Excetuando o trabalho em comento, até o momento, não há relatos na literatura que demonstrem a correlação entre NOD2 e seu papel na indução e/ou manutenção do processo doloroso, assim como os mecanismos e mediadores envolvidos.

Alguns trabalhos na literatura correlacionam a presença de receptores NOD2 em células da glia. Sterka e colaboradores (2006) demonstraram que astrócitos de camundongo expressam níveis constitutíveis de NOD2 e após exposição com duas bactérias patogênicas do SNC, *Borrelia burgdorferi* e *Neisseria meningitidis*, a expressão de NOD2, assim como de sua proteína adaptadora RIPK2, são aumentadas. No sentido de confirmar a natureza funcional de NOD2 em astrócitos, um ligante específico para esse receptor, induziu significativa produção de citocinas pró-inflamatórias. Dados semelhantes foram obtidos em micróglia após exposição a ambas bactérias patogênicas e seu ligante específico, o MDP (STERK & MARRIOTT, 2006). Um outro trabalho evidenciando a presença de NOD2 em células microgliais, sugere que TLR2 e NOD2 cooperam para o aumento da expressão do receptor de formil peptídeo 2 (mFPR2), implicado nos processos de inflamação do SNC e doenças neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2008). Por fim, trabalhos recentes demonstraram e ratificaram que micróglia e astrócitos expressam NOD2, sendo o mesmo, um componente importante na geração da resposta inflamatória do SNC, após infecção por duas bactérias

patogênicas clinicamente relevantes, *N. meningitidis* ou *B. burgdorferi* (CHAUHAN *et al.*, 2009), bactérias gram-positiva como *Streptococcus pneumoniae* (LIU *et al.*, 2010a) e bactérias gram-negativa como *Staphylococcus aureus* (LIU *et al.*, 2010b), tornando evidente a relação de NOD2 e células da glia, assim como a consequente ativação glial e ativação do fator de transcrição NF- κ B, que resultam na elevação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios.

Essas evidências nos levaram a hipotetizar que também em modelos de dor crônica, além dos receptores do tipo TLRs, a ativação de células da glia dependa da estimulação dos receptores do tipo NOD2. Neste sentido, resultados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstram que, após lesão do nervo periférico (SNI), animais deficientes para o NOD2, bem como para a principal proteína envolvida na via de sinalização do NOD2, RIPK2, apresentam hipersensibilidade mecânica reduzida em relação a animais selvagens (SANTA-CECÍLIA *et al.*, dados não publicados). A redução na hipersensibilidade neuropática observada em animais deficientes para NOD2 e RIPK2 estava associada a redução na produção de citocinas pró-nociceptivas (IL-1 β e TNF- α) espinais, quando comparada a animais selvagens. Sendo assim, torna-se evidente que processos espinais dependentes da ativação de NOD2 desempenham papel importante na fisiopatologia da dor neuropática.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Baseado no exposto acima, o presente estudo teve como objetivo principal, investigar os mecanismos pelos quais a ativação espinal dos receptores NOD2 contribui para o desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva mecânica.

Objetivo Específico

1. Avaliar o efeito da administração espinal (intratecal - i.t.) de diferentes doses do agonista seletivo (MDP) dos receptores NOD2 sobre o limiar mecânico nociceptivo de camungongos selvagens.
2. Avaliar a participação da via de sinalização RIPK2 no desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2, por meio da utilização de animais deficientes para esta proteína.
3. Avaliar a participação do receptor de reconhecimento padrão TLR4 e das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF no desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2.
4. Avaliar o envolvimento das células da glia espinais (astrócitos e micróglia) no desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2.

5. Avaliar o envolvimento de citocinas pró-nociceptivas na medula espinal pela administração do agonista dos receptores NOD2, por meio do bloqueio farmacológico destes mediadores e da quantificação protéica das mesmas na medula espinal.
6. Investigar se o desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2 é dependente do receptor de quimiocina CCR2.
7. Investigar o envolvimento da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2.

3. Material e métodos

3.1. Animais

Utilizaram-se camundongos C57BL/6 (selvagem) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os camundongos 129/SvEv, assim como os camundongos geneticamente deficientes ($^{-/-}$) para NOD2, RIPK2, TNFR1, TNFR1/2, IL-6, CCR2, MyD88, TLR4 e TRIF provieram do Centro de Criação de Camundongos Especiais da FMRP-USP. Os camundongos possuíam entre cinco e sete semanas de idade, pesavam aproximadamente 20-23 g, e foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo claro/escuro (12 horas) controlados, com livre acesso à ração e água até o dia do experimento. Todos os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983), e avaliado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP (protocolo n°106/2011, ver anexo 1).

3.2. Drogas

As drogas foram adquiridas das seguintes fontes: MDP, propentofilina, fluorocitrato, minociclina foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), SB 203580 foi adquirido de Tocris Bioscience (Bristol, U.K.) e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), foi adquirido de NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Hertfordshire, UK). As drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%) estéril, exceto SB

203580 que foi dissolvido em DMSO 3%/salina. Todas as doses selecionadas foram baseadas em curvas dose e tempo resposta.

3.2.1. Administração de drogas por via intratecal (i.t.)

Os animais foram previamente anestesiados em isoflurano (1-2%). Os pêlos dorsais dos camundongos foram removidos e uma agulha BD *Ultra-Fine*® (29G) de seringa para insulina 30 unidades foi inserida diretamente no espaço subaracnóide, entre as vértebras L4 e L5 (MESTRE *et al.* 1994) e o volume de 5 µL foi injetado em *bolus* vagarosamente. A correta localização da punção no espaço subaracnóide, pôde ser verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal. Após a injeção, a agulha era mantida por alguns segundos antes de sua cuidadosa retirada, para evitar o refluxo da solução injetada.

3.3. Teste de hipersensibilidade nociceptiva mecânica: teste de von Frey filamento

A avaliação da hipersensibilidade nociceptiva mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito (CUNHA *et al.*, 2004). Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é constituído por uma rede de malha de arame não maleável, 15-30 minutos antes do experimento, para habituação ao ambiente. Uma série de filamentos de von Frey (0.07 g – 1.40 g, North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA) foi aplicada no centro da pata posterior direita e esquerda. O estímulo foi interrompido após a observação da resposta nociceptiva, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, “*flinch*”. Cada um dos

filamentos de von Frey foi aplicado uma vez por aproximadamente 3 segundos. O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico (g). Os testes foram realizados antes (basal - condição livre de droga ou veículo) e após administração de MDP ou veículo.

3.4. Quantificação de citocinas pelo método de ELISA

Nos tempos determinados em cada protocolo experimental, os animais foram sacrificados e amostras da medula espinal foram removidas para determinação dos níveis locais de citocinas. Após maceração do tecido (medula espinal - segmentos L4, L5 e L6), as amostras foram centrifugadas (10000 rpm/10 minutos/4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de citocinas. A dosagem de IL-1 β e TNF α foram realizadas pelo método imunoenzimático (ELISA). Em resumo, placas de 96 poços foram cobertas com 50 μ L/poço do anticorpo específico contra a proteína de interesse (Pharmigen, San Diego, CA, USA.). Este anticorpo foi diluído em solução de ligação pH 9,0 e incubados por 18-24 horas, a 4 °C. As placas então foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 μ L de PBS/BSA 1% por 120 minutos em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para as citocinas foram colocados nas placas (50 μ L) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 μ L dos anticorpos biotinizados específicos contra a citocina de interesse foram adicionados. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1:5000, adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 100 μ L do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidrocloro; Sigma). As placas então foram

incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 (1 M) e a densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices.). Os resultados foram expressos em picogramas/mg de proteína.

3.5. Quantificação de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*)

Com descrito acima, amostras da medula foram removidas para dosagem dos níveis espinais de IL-6. Após maceração do tecido (medula espinal - segmentos L4, L5 e L6), as amostras foram centrifugadas (10000 rpm/10 minutos/4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para avaliar os níveis de citocina. A dosagem de IL-6 foi feita pelo método CBA, utilizando o kit de quantificação de citocinas murinas (BDTM Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit). Para a realização desta quantificação os experimentos foram conduzidos conforme especificações da bula e protocolo de marcação proposto pelo fabricante. Para a leitura das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II Flow Cytometry System (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os dados obtidos foram armazenados em mídia eletrônica e analisados com o software FCAP ArrayTM Software versão 2.0 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em picogramas/mg de proteína.

3.6. Avaliação da expressão de genes: extração de RNA e RT-qPCR em tempo real

3.6.1. Processamento das amostras e extração de RNA

Após coletar as medulas (segmentos L4, L5 e L6), o volume de Trizol foi completado para 750 μ L. Estas foram primeiramente homogeneizadas utilizando o seguinte aparelho - Homogeneizer Workcenter, IKA T 10 basic ultra-turrax. A extração do RNA total foi realizada como se segue: para cada 750 μ L de suspensão (tecido + Trizol), foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Merck). As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (15 minutos) a 4 °C e a fase aquosa, contendo RNA, foi transferida para outro tubo, e adicionado 500 μ L de isopropanol (Merck) gelado. Os tubos contendo as amostras foram agitados no vórtex e incubados (15 minutos) a -20°C. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugados a 14000 rpm (15 minutos) a 4 °C. Após este procedimento, o líquido sobrenadante foi descartado cuidadosamente, ficando aderido aos tubos o precipitado de RNA. Assim, a este precipitado foi adicionado 1000 μ L de álcool a 75% (preparado com água livre de DNase e RNase e álcool absoluto), e agitados no vórtex. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 7000 rpm (10 minutos) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi ressuspensionado com 10 μ L de H₂O. A concentração de RNA foi determinada através da densidade ótica no comprimento de onda de 260nm, por meio do aparelho nanoVue plus® GE.

3.6.2 Síntese de cDNA e RT-qPCR em tempo real

O RNAm foi transcrito para cDNA, através da seguinte reação: 2 μ g de amostra de RNAm + 1 μ L de Oligo DT (0,5 μ g/ μ L – Sigma) e H₂O q.s.p 7 μ L. A solução foi levada ao termociclador (Eppendorf mastercycle gradiente), seguindo os determinados tempos e temperaturas: 70 °C por 5 minutos e 5°C durante 1 minuto. A reação foi parada para adicionar um MIX de reagentes contendo: 1 μ L de DNTP (10 mM), 4 μ L de Buffer 5X, 2,4 μ L de

MgCl₂ (25mM), 1 µL transcriptase reversa Pre-Improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e H₂O q.s.p para 13 µL. Deu-se continuidade a reação em 25 °C (5 minutos), 42°C (60 minutos) e 70 °C (15 minutos). A reação quantitativa do RT-PCR em tempo real foi feita no ABI Prism 7500 Sequence Detection System, usando o sistema de fluorescência SYBR-green® (Invitrogen, Carlsbad, USA), para a quantificação das amplificações. O RT-PCR foi executado com volume final de 6,25 µL de MIX (3,125 µL SYBR-green + 0,25 µL de primer (sequência sense) + 0,25 µL primer (sequência anti-sense) + 0,0125 µL de Rox® (Invitrogen, Carlsbad) + 1,6125 µL de água) e 1 µL de amostra de cDNA. A placa na qual esses reagentes e amostras foram pipetadas foi mantida a 95 °C (10 minutos), e mais 40 ciclos de 94 °C (1 minuto), 56 °C (1 minuto) e 72 °C (2 minutos). A curva de dissociação foi analisada a (65-95 °C), para verificar se apenas um produto foi amplificado. Amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” (CT). Os 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 foram:

GAPDH (forward: 5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'; reverse: 5'-CGGCCAAATCCGTTTAC-3');

IL-1β (forward: 5'-TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC-3'; reverse: 5'-TTGGAAGCAGCCCTTCATCT-3');

IL-6 (forward: 5'-TTCCTACCCCAATTTCCAAT-3'; reverse: 5'-CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3'); e

TNF-α (forward: 5'-AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG-3'; reverse: 5'-GGCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA-3').

3.7. Análise estatística

Os experimentos foram realizados, pelo menos, duas vezes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). O número amostral foi representado na legenda de cada figura. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA *two way*) quando existiu interação entre os tratamentos e o tempo, seguido pelo post-test de Bonferroni. Quando os resultados foram de apenas um ponto (tempo) as análises foram realizadas usando ANOVA *one way*, seguido pelo post-test de Bonferroni. O nível de significância foi de $P < 0.05$. Para a realização das análises estatísticas supracitadas foi utilizado programa estatístico computadorizado (GraphPad Prism Software, GraphPad Prism 5 Demo, USA, 2007).

4. Resultados

4.1. Ativação espinal de NOD2 induz intensa hipersensibilidade nociceptiva mecânica.

Com o intuito de avaliar se a ativação espinal de NOD2 produz efeito pró-nociceptivo, MDP (N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina), um agonista seletivo dos receptores intracelulares NOD2, foi administrado pela via intratecal (i.t.) em camundongos selvagens (WT). Foram realizadas curvas dose e tempo resposta para diferentes doses de MDP (1, 10 e 100 µg – i.t.). A dose de 1 µg resultou em leve hipersensibilidade mecânica observada apenas na 5ª hora após administração da droga (**Fig. 3 A**). As doses de 10 e 100 µg causaram diminuição máxima no limiar nociceptivo mecânico, observando pico de efeito entre a 5ª e 7ª hora após administração do agonista, retornando ao limiar mecânico basal em 72 horas após administração do MDP (**Fig. 3 A,B**). Uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos 10 e 100 µg, a dose de MDP estabelecida para os próximos experimentos foi de 10 µg (i.t.), pois representa a menor dose de agonista capaz de produzir efeito máximo.

Logo, no sentido de validar e investigar se a hipersensibilidade mecânica induzida por MDP observado em camundongos selvagens é realmente dependente do reconhecimento intracelular por NOD2, o efeito pró-nociceptivo espinal do MDP foi avaliado em animais deficientes para NOD2. A hipersensibilidade mecânica induzida pela administração espinal de MDP em animais selvagens não foi observada em animais deficientes para o receptor NOD2 em todos os tempos analisados (**Fig. 4 A,B**).

Figura 3. Curvas de doses e tempos resposta de hipersensibilidade nociceptiva mecânica causada pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam injeções i.t. de uma solução salina contendo MDP nas doses de (1, 10 e 100 µg/i.t.). Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24, 48 e 72 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM (n=5, * (10 µg); # (100 µg); § (1 µg) $P < 0.05$, todos os grupos comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5)).

Figura 4. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida por MDP é mediada pela ativação espinal dos receptores NOD2. Camundongos WT ou NOD2^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 10) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5). # P < 0.05 (n=7) comparado com camundongos WT tratados com MDP.

4.2. Recrutamento da proteína adaptadora RIPK2 está envolvido no efeito pró-nociceptivo produzido pela ativação espinal de NOD2.

Visto que a injeção intratecal de MDP produz efeito pró-nociceptivo em animais selvagens, e que este efeito é dependente do reconhecimento intracelular pelos receptores NOD2, foi investigado o envolvimento de RIPK2, uma proteína adaptadora recrutada por NOD2 após detecção intracelular de MDP e necessária para desencadear os mecanismos subjacentes deste receptor (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Para isso, o efeito pró-nociceptivo desencadeado pela ativação espinal de NOD2 foi avaliado em animais deficientes para RIPK2. A administração de MDP em camundongos selvagens induziu hipersensibilidade mecânica (efeito máximo entre a 3ª e 7ª hora), ao passo que camundongos deficientes para molécula adaptadora RIPK2 não desenvolveu hipersensibilidade nociceptiva em todos os tempos avaliados (**Fig. 5 A,B**). Logo, esses conjuntos de dados confirmam a importância da ativação espinal de NOD2 e recrutamento de sua proteína adaptadora RIPK2 para indução da hipersensibilidade nociceptiva após administração de MDP.

Figura 5. Proteína adaptadora RIPK2 é importante para desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida por MDP. Camundongos WT ou RIPK2^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 μ g. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ (n= 5) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5). # $P < 0.05$ (n=5) comparado com camundongos WT tratados com MDP.

4.3. A hipersensibilidade nociceptiva mecânica produzida pela ativação espinal de NOD2, é independente de TLR4 e das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF.

Uma vez que o MDP é uma substância purificada da parede celular de micro-organismos sendo assim com grande possibilidade de carrear contaminantes, o próximo passo deste trabalho foi avaliar o efeito pró-nociceptivo espinal do MDP em animais deficientes para TLR4, bem como das principais vias de sinalização desencadeadas pelos principais receptores de reconhecimento padrão até então descritos, MyD88 e TRIF. Neste sentido, camundongos selvagens e deficientes para estas proteínas receberam injeções espinais de MDP e o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado nos vários tempos determinados. De forma similar ao observado em camundongos WT, a injeção espinal de MDP foi capaz de produzir hipersensibilidade nociceptiva mecânica de mesma intensidade em animais deficientes para TLR4 (**Fig. 6 A,B**), MyD88 (**Fig. 7 A,B**) e TRIF (**Fig. 8 A,B**) em todos os tempos avaliados. Esses conjuntos de dados indicam ausência de impurezas (outros PAMPs) na preparação de MDP e sugere que a hipersensibilidade comportamental observada em camundongos selvagens tratados com agonista de NOD2, seja independente de outros receptores de reconhecimento padrão e das vias de sinalização MyD88 e TRIF.

Figura 6. A hipersensibilidade mecânica induzida por MDP é independente do receptor de reconhecimento padrão TLR4. Camundongos WT ou TLR4^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 5) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 4). * P < 0.05 TLR4^{-/-} - MDP (n=5) comparado com TLR4^{-/-} tratados com veículo (n=5).

Figura 7. MDP induz hipersensibilização mecânica por uma via de sinalização independente da proteína adaptadora MyD88. Camundongos WT ou MyD88^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 μ g. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ (n= 4) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 4). * $P < 0.05$ (n=5) MyD88^{-/-} - MDP comparado com MyD88^{-/-} tratados com veículo (n=5).

Figura 8. MDP induz hipersensibilização mecânica por uma via de sinalização independente da proteína adaptadora TRIF. Camundongos SvEv ou TRIF^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 5) comparado com camundongos selvagens (SvEv) tratados com veículo (n= 5). * P < 0.05 (n=5) TRIF^{-/-} - MDP comparado com TRIF^{-/-} tratados com veículo (n=5).

4.4. Células da glia (micróglia e astrócitos) estão envolvidas na hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.

As células gliais, semelhante as clássicas células do sistema imunológico, expressam grande variedade de PRRs e são ativados por diversos PAMPs presentes em micro-organismos, como por exemplo, em bactérias. Neste sentido, o próximo passo deste estudo foi investigar o envolvimento das células gliais da medula espinal, no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica após ativação de NOD2. Animais selvagens que receberam pré-tratamento com veículo e posterior administração de MDP, desenvolveram hipersensibilidade mecânica (resposta máxima na 5^a hora), ao passo que animais que receberam pré-tratamento com propentofilina na dose de 7 nmol (i.t.), inibidor da ativação glial, e posterior administração de MDP, apresentaram redução da hipersensibilidade mecânica em todos os tempos avaliados (**Fig. 9 A,B**). O mesmo pôde ser observado nos animais pré-tratados com minociclina na dose de 0,15 µmol (i.t.), um inibidor da ativação microglial, seguido da administração de MDP (**Fig. 10 A,B**) e nos animais pré-tratados com fluorocitrato na dose de 0,33 nmol (i.t.), um inibidor da ativação astrogliar, seguido da administração de MDP (**Fig. 11 A,B**). Além disso, os pré-tratamentos apenas com os inibidores seguidos da administração de veículo, não induziram hipersensibilidade mecânica nos animais. Portanto, esses resultados evidenciam a participação de células da glia (micróglia e astrócitos) no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica desencadeado pela ativação do receptor NOD2.

Figura 9. Células da glia estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam pré-tratamento (30 minutos) com veículo ou propentofilina seguido da injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg ou veículo. Após administração de MDP ou veículo, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos pré-tratados com veículo + MDP ($n = 5$).

Figura 10. Micróglia estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam pré-tratamento (60 minutos) com veículo ou minociclina seguido da injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg ou veículo. Após administração de MDP ou veículo, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos pré-tratados com veículo + MDP ($n = 4$).

Figura 11. Astrócitos estão envolvidas no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam pré-tratamento (30 minutos) com veículo ou fluorocitrato seguido da injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg ou veículo. Após administração de MDP ou veículo, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos pré-tratados com veículo + MDP ($n = 4$).

4.5. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por TNF- α .

Alguns trabalhos têm indicado que PRRs desempenham papel crucial na ativação de células gliais da medula espinal, contribuindo para indução e manutenção da dor neuropática (RAGHAVENDRA *et al.*, 2004; TANGA *et al.*, 2005). A ativação dessas células gliais promovem a liberação de proteínas imunes clássicas em resposta a sinais neuronais (BENVENISTE *et al.*, 1995), incluindo citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF- α , implicadas na modulação da hipersensibilidade à dor. Uma vez confirmada a participação das células gliais, o próximo passo foi avaliar se TNF- α está envolvido na hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Portanto, o efeito pró-nociceptivo do MDP foi investigado em animais deficientes para ambos receptores de TNF (TNFR1/2) e para o TNFR1.

A hipersensibilidade mecânica induzida pela administração espinal de MDP em animais WT não foi observada em animais deficientes para os dois receptores de TNF- α (TNFR1/2) em todos os tempos analisados (**Fig. 12 A,B**). Entretanto, o mesmo não foi observado em camundongos deficientes para TNFR1 tratados com MDP, os quais apresentaram hipersensibilidade mecânica similar aos animais WT tratados com MDP, evidenciando a participação do TNF e a importância do receptor de TNF do tipo 2 (TNFR2) na hipersensibilidade mecânica observada em camundongos selvagens tratados com MDP (**Fig. 13 A,B**).

O próximo passo foi avaliar o possível envolvimento da ativação espinal de NOD2 na indução da citocina pró-nociceptiva TNF- α na medula espinal. O perfil de expressão da citocina foi avaliado nos tempos iniciais do desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva, sendo que foi observado aumento na expressão do RNAm (**Fig. 14 A**) e produção

(Fig. 14 B) de TNF- α na 3^a e 5^a hora, respectivamente, após administração do agonista seletivo de NOD2, demonstrando assim, o envolvimento de TNF- α na hipersensibilidade nociceptiva observada em camundongos selvagens.

Figura 12. TNF participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT ou TNFR1/2^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 5) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5). # P < 0.05 (n=6) comparado com camundongos WT tratados com MDP.

Figura 13. Receptores de TNF do tipo 2 são importantes para o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT ou TNFR1^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 5) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 4). * P < 0.05 (n=6) TNFR1^{-/-} - MDP comparado com TNFR1^{-/-} tratados com veículo (n=4).

A)

B)

Figura 14. Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e produção de TNF-α. As amostras de medula espinal de camundongos selvagens (segmentos L4, L5 e L6) foram coletadas nos tempos indicados após injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. A quantificação da citocina TNF-α foi realizada por RT-qPCR (A) e ELISA (B). O nível de expressão relativa do gene alvo (TNF-α) foi normalizado com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. Os resultados são expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$ ($n = 8$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 7$). # $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 5$).

4.6. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por IL-1 β .

Além de TNF- α , outra importante citocina pró-nociceptiva liberada em processos dolorosos é a IL-1 β (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005). No intuito de investigar se a IL-1 β está envolvida na hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2, animais selvagens foram tratados com IL-1ra, uma citocina que antagoniza competitivamente a ligação da interleucina 1 (IL-1) ao seu receptor, seguido da administração espinal de MDP. Animais selvagens que receberam pré-tratamento com veículo e posterior administração de MDP, desenvolveram hipersensibilidade mecânica (resposta máxima na 5ª hora). Por outro lado, nos animais que foram pré-tratados com IL-1ra na dose de 10 μ g, e posterior administração de MDP, observou-se redução da hipersensibilidade mecânica em todos os tempos avaliados (**Fig. 15 A,B**). Além disso, a administração apenas do antagonista seguido da administração de veículo, não induziu hipersensibilidade mecânica nos animais (**Fig. 15 A,B**). Corroborando os resultados obtidos no ensaio comportamental, foi observado que a ativação espinal de NOD2 induz aumento significativo na expressão do RNAm (**Fig. 16 A**) e produção (**Fig. 16 B**) de IL-1 β neste tecido, na 3ª e (1ª, 3ª, 5ª e 7ª) hora, respectivamente, após a injeção do estímulo.

Figura 15. IL-1 β participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam pré-tratamento (30 minutos) com veículo ou IL-1ra seguido da injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg ou veículo. Após administração de MDP ou veículo, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos pré-tratados com veículo + MDP ($n = 5$).

Figura 16. Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e produção de IL-1 β . As amostras de medula espinal de camundongos selvagens (segmentos L4, L5 e L6) foram coletadas nos tempos indicados após injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 μ g. A quantificação da citocina IL-1 β foi realizada por RT-qPCR (A) e ELISA (B). O nível de expressão relativa do gene alvo (IL-1 β) foi normalizado com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ ($n = 8$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 8$). # $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 5$).

4.7. Hipersensibilidade nociceptiva mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2 é mediada por IL-6.

Uma vez demonstrada a participação de IL-1 β e TNF α , foi investigada o envolvimento de uma terceira citocina conhecida por mediar a dor patológica, por exemplo, a dor neuropática (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005). Nessa linha de raciocínio, o efeito pró-nociceptivo espinal do MDP foi avaliado em animais deficientes para IL-6. A hipersensibilidade mecânica induzida pela administração espinal de MDP em animais selvagens, não foi observada em animais deficientes para o receptor IL-6 em todos os tempos analisados (**Fig. 17 A,B**). Complementando a investigação comportamental, a avaliação do perfil de expressão da citocina IL-6 na medula espinal, evidenciou aumento significativo na expressão do RNAm (**Fig. 18 A**) e produção (**Fig. 18 B**) na 3^a hora após administração de MDP e o envolvimento da mesma no processo de hipersensibilidade mecânica desencadeada pela ativação espinal de NOD2.

Figura 17. IL-6 participa do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT ou IL-6^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$ (n= 5) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5). # $P < 0.05$ (n=6) comparado com camundongos WT tratados com MDP.

Figura 18. Ativação espinal de NOD2 induz aumento na expressão do RNAm e produção de IL-6. As amostras de medula espinal de camundongos selvagens (segmentos L4, L5 e L6) foram coletadas nos tempos indicados após injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. A quantificação da citocina IL-6 foi realizada por RT-qPCR (A) e pelo método CBA - *Cytometric Bead Array* (B). O nível de expressão relativa do gene alvo (IL-6) foi normalizado com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. * $P < 0.05$ ($n = 8$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 8$). # $P < 0.05$ ($n = 4$) comparado com camundongos selvagens tratados com veículo ($n = 4$).

4.8. O desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2 não é dependente do receptor de quimiocina CCR2.

CCR2, o receptor para a quimiocina CCL2/MCP-1, é um receptor expresso em monócitos/macrófagos, assim como em micróglia, e possui um papel importante no desenvolvimento da ativação microglial espinal e na alodínia mecânica após lesão do nervo periférico (ZHANG *et al.*, 2007). No sentido de investigar se CCR2 está envolvido no processo de hipersensibilidade mecânica desencadeada pela ativação espinal de NOD2, foram utilizados animais deficientes para o receptor de quimiocina CCR2. A hipersensibilidade mecânica induzida pela administração espinal de MDP em animais selvagens foi também observada em animais deficientes para o receptor CCR2 (**Fig. 19 A,B**). Portanto, esses dados excluem a participação da quimiocina CCL2 e seu receptor (CCR2) na hipersensibilidade mecânica observada em camundongos selvagens tratados com MDP.

Figura 19. Hipersensibilidade nociceptiva induzida pela ativação espinal de NOD2 é independente do receptor de quimiocina CCR2. Camundongos WT ou CCR2^{-/-} receberam injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg. Após administração de MDP, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * P < 0.05 (n= 4) comparado com camundongos selvagens (WT) tratados com veículo (n= 5). * P < 0.05 (n=6) CCR2^{-/-} - MDP comparado com CCR2^{-/-} tratados com veículo (n=5).

4.9. Envolvimento da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2.

Após detecção intracelular de MDP por NOD2 e recrutamento da proteína adaptadora RIPK2, duas cascatas de sinalização subjacentes podem ser ativadas, que incluem MAPKs e NF- κ B (HAYDEN & GHOSH, 2004; WILMANSKI *et al.*, 2008.). No intuito de analisar o envolvimento da via de sinalização da p38 MAPK, foi utilizado SB 203580 na dose de 1 μ g, um inibidor seletivo de p38 MAPK. Animais selvagens que receberam pré-tratamento com veículo e posterior administração de MDP, desenvolveram hipersensibilidade mecânica (resposta máxima na 5^a hora), ao passo que em animais que foram pré-tratados com SB 203580 e posterior administração de MDP, observou-se redução da hipersensibilidade mecânica em todos os tempos avaliados (**Fig. 20 A,B**). Ainda, a administração apenas do inibidor seguido da administração de veículo, não induziu hipersensibilidade mecânica nos animais. Esses dados indicam a participação de p38 MAPK como evento de sinalização “*downstream*” à ativação espinal de NOD2, que contribui para o processo de hipersensibilidade mecânica induzida por MDP.

Figura 20. Via de sinalização p38 MAPK contribui para o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. Camundongos WT receberam pré-tratamento (30 minutos) com veículo ou SB 203580 seguido da injeção i.t. de uma solução salina contendo MDP na dose de 10 µg ou veículo. Após administração de MDP ou veículo, a hipersensibilidade nociceptiva mecânica foi avaliada 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas nas patas direita (A) e esquerda (B) dos animais. O tempo “0” no eixo “x” representa a medida basal dos animais. Os resultados são expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$ ($n = 5$) comparado com camundongos pré-tratados com veículo + MDP ($n = 5$).

5. Discussão

NOD2 foi descrito pela primeira vez em 2001, sendo um receptor expresso principalmente em monócitos. Após reconhecimento de produtos bacterianos, NOD2 associa-se com RIPK2, via interação homofílica CARD-CARD, levando à ativação de NF- κ B e transcrição de vários genes regulatórios (OGURA *et al.*, 2001a). No mesmo ano foi descrita uma associação entre mutações no gene CARD15, o qual codifica NOD2, com a ocorrência de duas desordens inflamatórias crônicas, a doença de Crohn (OGURA *et al.*, 2001b; HUGOT *et al.*, 2001) e a síndrome de Blau (MICELI-RICHARD *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002). Desde então, as pesquisas com receptores NOD2 foram voltadas para seu papel na resposta imune e doenças inflamatórias.

Embora trabalho anterior publicado por Sato e colaboradores (2011), demonstre que, receptores NOD2 sejam importantes para atividade analgésica, por diminuir a frequência de contorções induzida por ácido acético, recentemente, foi demonstrada a participação de NOD2 na dor inflamatória articular (modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos), sendo o primeiro estudo que correlaciona o papel de NOD2 no contexto pró-nociceptivo (VIEIRA *et al.*, 2012).

Entretanto, pouco é conhecido como NOD2 atua no desenvolvimento do processo doloroso. Resultados recentes de nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais deficientes para o receptor NOD2 não desenvolvem hipersensibilidade mecânica após lesão de nervos sensitivos periféricos, sugerindo papel para este receptor na gênese da dor neuropática. Neste sentido, este trabalho avaliou de forma inédita os mecanismos envolvidos na possível participação do NOD2 no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica neuropática (SANTA-CECÍLIA *et al.*, dados não publicados), focando principalmente nos mecanismos espinais envolvidos.

Primeiramente, foi avaliado o envolvimento de NOD2 no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica após administração intratecal de MDP, um ligante seletivo de

NOD2, em animais selvagens e em camundongos deficientes para NOD2 e para RIPK2, molécula adaptadora importante na via de sinalização de NOD2. Os resultados mostraram que o MDP foi capaz de produzir hipersensibilidade nociceptiva mecânica em camundongos selvagens, entretanto, a administração do MDP não foi capaz de induzir o mesmo fenótipo comportamental em camundongos deficientes para NOD2 e RIPK2.

Kobayashi e colaboradores (2002) demonstram a importância da molécula adaptadora RIPK2 na ativação de NF- κ B e consequente transcrição de citocinas pró-inflamatórias mediadas por NOD2. Outro trabalho importante demonstra que camundongos deficientes para RIPK2 apresentam defeitos em suas respostas mediadas por agonista de NOD1 e NOD2. Além disso, macrófagos deficientes para NOD2 e RIPK2, estimulados com MDP, apresentam comprometimento da resposta, assim como redução da produção de citocinas dependentes de NF- κ B e MAPK (PARK *et. al.*, 2007). Ainda, a ativação de NF- κ B induzida por NOD2, correlaciona com sua capacidade de interagir com RIPK2 e foi especificamente inibida por uma forma truncada de RIPK2, mutante desta proteína (OGURA *et al.*, 2001a). Portanto, com base nos dados e estudos acima descritos, sugere-se que a ativação do receptor intracelular NOD2 e consequente recrutamento da proteína adaptadora RIPK2, compreende uma etapa importante para o desenvolvimento da hipersensibilidade nociceptiva mecânica.

Outro ponto importante explorado neste estudo foi o envolvimento de células gliais no desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica induzida pela ativação espinal de NOD2. As células da glia, especialmente micróglia e astrócitos, sofrem ativação pelos mesmos tipos de estímulos e ambas são ativadas em resposta a manipulações experimentais que induzem a amplificação da dor, liberando uma variedade de substâncias neuroexcitatórias. A ativação das células gliais ocorre em resposta a trauma do SNC, isquemia, tumores, neurodegeneração, vírus, bactérias, entre outros estímulos, porém a intensidade destes estímulos resulta em diferentes padrões e curso temporal de respostas, e as mudanças morfológicas e funcionais

gliais resultantes dessa ativação podem não estar necessariamente ligadas (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005).

Ainda neste contexto, alguns trabalhos na literatura apresentam evidências da existência de receptores NOD2 em células da glia, e que estes podem ser importantes para detecção de estímulos bacterianos. Sterka & Marriott (2006) forneceram a primeira demonstração que micróglia isolada de camundongos expressa constitutivamente, um nível robusto de NOD2, tendo sua expressão aumentada após desafio bacteriano com dois patógenos do SNC, *Borrelia burgdorferi* e *Neisseria meningitidis*. Além disso, RIPK2 também é expresso na micróglia e a estimulação com MDP provocou elevações modestas, porém significativa de IL-1 β em células microgliais. Contudo, a estimulação com MDP falhou em induzir secreção de IL-6 e TNF- α . Sterka e colaboradores (2006) demonstraram o mesmo perfil em astrócitos isolados de camundongos, perfil este inverso do observado com células microgliais, onde a estimulação de astrócitos com MDP provocou elevações significativas das citocinas IL-6 e TNF- α , falhando em aumentar a produção de IL-1 β por astrócitos.

Desta maneira, esses estudos demonstram a relação de NOD2 com a ativação das células da glia e produção de citocinas pró-inflamatórias e suportam a ideia de que a ativação glial induzida pela ativação de receptores NOD2, contribui para o fenótipo comportamental de hipersensibilidade, uma vez que tal efeito foi reduzido com drogas que inibem a função glial (propentofilina), microglial (minociclina) e astrogial (fluorocitrato). Além disso, o MDP administrado intratecalmente pode ativar receptores NOD2 presentes em células gliais que residem no GRD, como por exemplo, as células satélites (que envolvem o soma dos neurônios sensoriais). Estas, após ativação, podem liberar mediadores pró-nociceptivos nos neurônios aferentes primários, contribuindo para a hipersensibilidade mecânica.

Conforme mencionado, um possível mecanismo pelo qual as células da glia induzem hiperalgesia e alodínia é através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β ,

TNF- α e IL-6 (MILLIGAN & WATKINS, 2009). Estas citocinas são frequentemente liberadas em cascata, onde uma liberação inicial de TNF é seguida por IL-1, e posteriormente, por IL-6 (WIESELER-FRANK *et al.*, 2005). De fato, a administração intratecal de IL-6 produz alodínia ao toque, em ratos normais (DeLEO *et al.*, 1996), da mesma maneira, a administração intratecal de IL-1 β também leva ao desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia, além de contribuir para o aumento da excitabilidade neuronal (REEVE *et al.*, 2000). Cabe ressaltar, que o uso de diferentes modelos experimentais para o estudo da dor, pode apresentar diferentes padrões de atividades frente à intensidade de cada estímulo, onde as citocinas podem atuar sinergicamente, ou atuar sequencialmente (CUNHA *et al.*, 2005), ou mesmo podendo formar uma rede complexa de ativação interdependente.

Nossos resultados permitem sugerir que liberação de citocinas pelas células da glia e posterior sensibilização das aferências nociceptivas são orquestradas pelas citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , uma vez que administração de IL-1ra e a utilização de camundongos deficientes para IL-6 e duplo deficientes para TNFR1/2, reduziram a hipersensibilidade mecânica induzida pelo MDP. Além disso, com base nas evidências descritas anteriormente, sugere-se que a ativação de receptores NOD2 na micróglia resulte na liberação da citocina IL-1 β , e que a ativação em astrócitos, por sua vez, induza a liberação das citocinas TNF- α e IL-6, contribuindo assim para a hipersensibilidade mecânica nociceptiva.

Embora as análises de quantificação das citocinas e avaliação comportamental não demonstre de forma determinada um padrão sequencial de liberação dessas citocinas, não podemos descartar a possibilidade da síntese em cascada. Contudo, estes dados permitem sugerir ação sinérgica, onde em combinação, elas exercem hipersensibilidade, não observada na ausência de qualquer uma delas, principalmente nos tempos de efeito máximo (3^a, 5^a e 7^a hora).

Nossos dados demonstraram a participação do TNF- α na hipersensibilidade mediada pela ativação espinal de NOD2, sugerindo ser um mediador chave na sensibilização neuronal ou mesmo ativando distalmente outras citocinas, resultando na diminuição do limiar nociceptivo. Entretanto, camundongos deficientes para TNFR1 apresentaram uma intensa e sustentada hipersensibilidade, permitindo sugerir que, além de um possível envolvimento de TNFR1, TNF- α requer especialmente receptores de TNF do tipo 2 para gerar o fenótipo de hipersensibilidade.

Na medula espinal, o TNF- α , também conhecido como caquetina, é produzida principalmente pela micróglia, embora outros tipos celulares, tais como os astrócitos, também produzem TNF- α (XU *et al.*, 2006). O TNF é uma citocina que desempenha funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória, quanto na neuropática, exercendo seus efeitos através de dois diferentes receptores conhecidos como TNFR1 e TNFR2. É notável a extensa literatura demonstrando e caracterizando a via de sinalização do TNFR1 durante os últimos anos, quando comparado ao TNFR2. No entanto, os receptores TNFR1 e R2 podem exercer distintos papéis na indução ou manutenção da dor.

Ainda neste contexto, Zhang e colaboradores (2011) investigaram o envolvimento de ambos receptores de TNF em diferentes condições de dor inflamatória, demonstrando o papel crucial do TNFR2 como mediador da sensibilização central, onde camundongos deficientes para TNFR2 exibiram reduzida hiperalgesia térmica após administração intratecal de TNF- α , diminuição da dor no teste de formalina (2ª fase) e redução da fase inicial da hiperalgesia térmica no modelo inflamatório induzido pela administração intraplantar CFA. Além disso, a expressão de TNFR2 na medula espinal, foi transitoriamente aumentada 1 dia após a administração de CFA. Embora o estudo demonstre papel predominante de TNFR1 ao mediar os efeitos de TNF- α , e que o mesmo integra todos os efeitos evidenciados pelo TNFR2, os

dados sugerem papel essencial de TNFR1 e R2 na fase inicial e de TNFR1 na fase tardia do desenvolvimento da dor inflamatória.

Essas evidências permitem sugerir que, após administração espinal de MDP, a liberação de TNF- α resultante dessa ativação, possa regular a sensibilização central não apenas por atuar em receptores de TNF do tipo 2, mas também por um provável efeito sinérgico dessa citocina sobre ambos tipos de receptores, contribuindo direta ou indiretamente para o desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica aguda. Possivelmente, durante a dor neuropática, a ativação de receptores NOD2 por algum DAMP liberado em resposta ao dano tecidual, levaria a liberação de TNF- α , sendo que sua ação sobre os receptores de TNF do tipo 1 e 2 poderiam estar contribuindo para a indução do processo doloroso crônico.

Uma vez que, os sinais gerados resultante da ativação de TLRs e NLRs dirigem para as mesmas vias de sinalização, seria esperado que a ativação de ambos PRRs resultasse em sinergismo. Embora essa regulação cruzada, que pode ocorrer entre diferentes receptores de reconhecimento padrão, não seja clara, ela pode estar relacionada com alterações na expressão de componentes essenciais nas vias de transdução de sinais, visto que LPS e MDP regulam positivamente a expressão de NOD2 e MyD88, respectivamente. Esses efeitos de aumento podem resultar da ativação sinérgica de NF- κ B ou MAPKs pelas vias de sinalização TLR e NOD (YANG *et al.* 2001; GUTIERREZ *et al.* 2002; TSAI *et al.*, 2011).

Focando na regulação cruzada que pode ocorrer em células da glia, em astrócitos isolados de camundongos, LPS (ligante de TLR4), flagelina (ligante de TLR5) e oligonucleotídeo CpG (ligante de TLR9) aumentam a expressão gênica de NOD2 (STERKA *et al.*, 2006). No entanto, em micróglia isolada de camundongos, apenas LPS e flagelina aumentam a expressão gênica de NOD2 (STERKA & MARRIOTT, 2006), além da capacidade de MDP em aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por ligantes de TLRs.

No intuito de investigar um possível envolvimento de TLR4 e suas proteínas adaptadoras MyD88 (comum a todos os TLRs, exceto TLR3) e TRIF (TLR3 e TLR4), na hipersensibilidade mecânica mediada por NOD2, observou-se que a resposta após administração de MDP não foi reduzida em camundongos deficientes para TLR4, MyD88 e TRIF, demonstrando que tal fenótipo independe de TLR4 e da sinalização mediada por MyD88 e TRIF, excluindo também a possibilidade da presença de outros PAMPs (contaminação) na preparação de MDP.

Outro mediador importante, a quimiocina CCL2 (ou MCP-1) e seu receptor CCR2 estão envolvidos na ativação microglial, bem como na dor neuropática. Após lesão do nervo, a micróglia ativada expressa CCR2 e camundongos deficientes para CCR2 não desenvolvem alodínia mecânica. No entanto, em testes de dor aguda, repostas de camundongos deficientes para CCR2 foram similares aos camundongos selvagens (ABBADIE *et al.*, 2003). Ainda nesse contexto, administração intratecal de CCL2 produz alodínia (THACKER *et al.*, 2009) e resulta na ativação microglial em camundongos selvagens, mas não em camundongos deficientes para CCR2 (ZHANG *et al.*, 2007).

Fundamentado nessas evidências e baseado no estudo publicado por Kim e colaboradores (2011) demonstrando que a ativação de receptores NOD2 por MDP, induz a secreção de CCL2 em células estromais intestinal, efeito anulado em células deficientes para NOD2, investigou-se o envolvimento de CCR2, e indiretamente CCL2, na hipersensibilidade desencadeada pela ativação de NOD2. Todavia, os camundongos deficientes para CCR2 desenvolveu hipersensibilidade similar aos camundongos selvagens, permitindo sugerir que tal efeito independe deste receptor, possivelmente por constituir um estímulo agudo. Ainda, não se pode descartar que, durante a dor neuropática, a ativação de receptores NOD2 por algum DAMP, leva a liberação dessa quimiocina e consequentemente a ativação do receptor

CCR2 em células gliais, podendo contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da dor neuropática.

Finalmente, para elucidar a via de sinalização “*downstream*” à ativação espinal de NOD2 e recrutamento da molécula adaptadora RIPK2, que leva a liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , responsáveis pela sensibilização central e diminuição do limiar nociceptivo mecânico, o papel da p38 MAPK foi investigado. Inicialmente, é importante ressaltar que a ativação de p38 MAPK desempenha papel importante no desenvolvimento da dor neuropática, uma vez que, a administração intratecal diária do inibidor de p38 MAPK (SB203580) impede a alodínia mecânica induzida por ligadura do nervo espinal (SNL), um modelo experimental de dor neuropática (JIN *et al.*, 2003). Além disso, a p38 MAPK ativada na medula espinal é restrita a micróglia e sua ativação inicial na medula espinal demonstra seu papel essencial na indução da dor neuropática, embora também esteja envolvida no desenvolvimento da mesma (JIN *et al.*, 2003). Em geral, a ativação de NOD2 pode levar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, por meio da ativação de MAPKs e NF- κ B, e a ativação da enzima TAK1 via MDP-NOD2-RIPK2, parece ser um passo importante nessa ativação (KIM *et al.*, 2008). Contribuindo para esses achados, a estimulação de macrófagos com MDP resulta na ativação de NF- κ B, p38 MAPK e ERK, que é fortemente reduzida em macrófagos deficientes para NOD2 (KOBAYASHI *et al.*, 2005).

Corroborando com essas evidências, em nosso estudo, pôde-se observar que a p38 MAPK está envolvida na cascata de sinalização que culmina no efeito pró-nociceptivo da ativação espinal dos receptores intracelulares NOD2. Ainda, após administração de MDP, a ativação espinal de NOD2 pode liberar o estoque pré-existente de pró-IL-1 β de uma maneira dependente de caspase-1, sendo que a IL-1 β secretada, por sua vez, contribuiria de forma autócrina para uma ativação adicional de MAPK induzida por MDP, levando a subsequente liberação de citocinas. Complementando essa hipótese, o bloqueio de IL-1 β inibe

completamente a produção de citocinas induzida por MDP em macrófagos derivados de monócitos humanos (HEDL & ABRAHAM, 2011).

Uma vez elucidados os possíveis mecanismos pelos quais a ativação de NOD2 pode contribuir para o desenvolvimento do processo doloroso, torna-se evidente que, durante a neuropatia, algum produto liberado, possivelmente um DAMP, após ser reconhecimento pelo NOD2, resultaria na ativação de uma via de sinalização e liberação de mediadores que culminariam no processo doloroso crônico.

Além disso, uma via de sinalização distinta poderia também liberar algum mediador (DAMP), e uma vez reconhecido pelos receptores NOD2, ativaria vias de sinalizações e produziria mediadores pró-nociceptivos similares à ativação pelo reconhecimento de PAMP. Não obstante, durante a neuropatia, a fosforilação de receptores NOD2 poderia resultar em ativação independente de ligante. Este efeito foi observado em um membro da família NLRs (NALP3), evidenciando o papel de tirosinas quinases (SHIO *et al.*, 2009) e proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA (PKR) (LU *et al.*, 2012) na ativação de NALP3 e outros inflamassomas.

Ainda neste contexto, uma vez que animais deficientes para o receptor NOD2 não desenvolvem hipersensibilidade mecânica após lesão do nervo (Santa-Cecília *et al.*, dados não publicados), a utilização de um antagonista seletivo dos receptores NOD2, reduziria a hipersensibilidade mecânica relacionada a dor neuropática. Até o momento, não há relatos na literatura da existência de antagonista de receptores NOD2, portanto, torna-se importante o estudo de modelagem molecular e relação estrutura atividade com base na estrutura de seu agonista (MDP), para o desenvolvimento de moléculas promissoras para o tratamento da dor neuropática.

Somando os resultados obtidos aos dados já descritos na literatura, sugere-se que a ativação de receptores NOD2, presentes em células da glia da medula espinal e possivelmente

do GRD, possam desempenhar papel importante na dor neuropática e também em outros tipos de dor. Contudo, a participação de outras células que expressam NOD2, como por exemplo, macrófagos que infiltram o local da lesão, podem também contribuir para o processo doloroso crônico ao liberar citocinas pró-nociceptivas.

Em resumo, os resultados demonstram que a administração espinal de MDP ativa o receptor intracelular NOD2 presente em células da glia (astrócitos e micróglia), recruta a proteína adaptadora RIPK2 que por sua vez ativa vias de sinalizações subjacentes, como MAPKs e possivelmente NF- κ B, levando a transcrição de genes pró-nociceptivos, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e consequente sensibilização dos nociceptores, resultando em hipersensibilidade nociceptiva mecânica, efeito este independente de TLR4 e das vias de sinalização MyD88 e TRIF, assim como do receptor da quimiocina CCL2 (CCR2).

6. Conclusão

O conjunto dos resultados apresentados permite concluir que a ativação de receptores NOD2 presentes em células gliais, por seu ligante seletivo (MDP) ou mesmo por possíveis DAMPs liberados durante o processo de dor neuropática, constitui um mecanismo chave para liberação de citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente relacionadas com o processo de sensibilização neuronal, contribuindo para fisiopatologia da dor crônica. Ainda, a utilização de drogas antagonistas de receptores NOD2 representaria uma nova abordagem terapêutica para aliviar a dor crônica de origem neuropática.

7. Referências

- Abbadie, C., Lindia, J.A., Cumiskey, A.M., Peterson, L.B., Mudgett, J.S., Bayne, E.K., DeMartino, J.A., MacIntyre, D.E., Forrest, M.J. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(13):7947-52.
- Abbott, D.W., Wilkins, A., Asara, J.M., Cantley, L.C. (2004). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr. Biol.* 14, 2217–2227.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 4, 783-801.
- 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.
- Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R., Podolsky, D.K. (2005). Membrane recruitment of Nod2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor-kappaB activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 1, 21-6.
- Benveniste, E.N., Huneycutt, B.S., Shrikant, P., Ballestas, M.E. (1995). Second messenger systems in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 9(4):304-14.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H.W. (2007). Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602.
- Cao, L., Tanga, F.Y., Deleo, J.A. (2009). The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain. *Neuroscience.* 158(2):896-903.
- Carpentier, P.A., Duncan, D.S., Miller, S.D. (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun.* 22(2):140-7.

- Chauhan, V.S., Sterka, D.G. Jr., Furr, S.R., Young, A.B., Marriott, I. (2009). NOD2 plays an important role in the inflammatory responses of microglia and astrocytes to bacterial CNS pathogens. *Glia*. 57(4):414-23.
- Chen, K., Zhang, L., Huang, J., Gong, W., Dunlop, N.M., Wang, J.M. (2008). Cooperation between NOD2 and Toll-like receptor 2 ligands in the up-regulation of mouse mFPR2, a G-protein-coupled Abeta42 peptide receptor, in microglial cells. *J Leukoc Biol*. 83(6):1467-75.
- 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.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 4, 803-14.
- Clark, A.K., Gentry, C., Bradbury, E.J., McMahon, S.B., Malcangio, M. (2007). Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain*. 11(2):223-30.
- Cunha, T.M., Verri Jr, W.A., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*. 37, 401-7.
- Cunha, T.M., Verri, W.A. Jr., 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(5):1755-60.
- Decosterd, I., Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 87,149-58.
- DeLeo, J.A., Colburn, R.W., Nichols, M., Malhotra, A. (1996). Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res*. 16(9):695-700.

- Garrison, C.J., Dougherty, P.M., Kajander, K.C., Carlton, S.M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 565(1):1-7.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., Fernandez-Luna, J.L. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem.* 1;277(44):41701-5.
- Hains, B.C., Waxman, S.G. (2006). Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 26(16):4308-17.
- Hansson, E., Ronnback, L. (2003). Glial neuronal signaling in the central nervous system. *Faseb J.* 17, 341-8.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J. (1998). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 32,77-88.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2(3):185-93.
- Hayden, M.S., Gosh, S. (2004). Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18, 2195-224.
- Hedl, M., Abraham, C. (2011). Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1 β in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages. *J Biol Chem.* 286(30):26440-9.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Nadeau, W.J., Podolsky, D.K. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 4, 993-1000.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411(6837):599-603.

- Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo J.* 25, 683–692.
- Inohara, N., Del Peso, L., Koseki, T., Chen, S., Nunez, G.(1999). Nod1, na Apalf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 274, 14560-7.
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., Núñez, G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem.* 275(36):27823-31.
- Inohara, N., Chamaillard, M., McDonald, C. Nuñez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74,355-383.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.
- Ji, R.R., Suter, M.R. (2007). p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain.* 3:33.
- Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., Ji, R.R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *Neurosci.* 23(10):4017-22.
- Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M., Noguchi, K. (2006). Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *J Neurosci.* 26(34):8680-90.
- 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.

- Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.K., Ji, R.R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci.* 28(20):5189-94.
- Kim, D., Kim, M.A., Cho, I.H., Kim, M.S., Lee, S., Jo, E.K., Choi, S.Y., Park, K., Kim, J.S., Akira, S., Na, H.S., Oh, S.B., Lee, S.J. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem.* 282, 14975-83.
- Kim, D.S., Figueroa, K.W., Li, K.W., Boroujerdi, A., Yolo, T., Luo, Z.D. (2009). Profiling of dynamically changed gene expression in dorsal root ganglia post peripheral nerve injury and a critical role of injury-induced glial fibrillary acidic protein in maintenance of pain behaviors [corrected]. *Pain.* 143(1-2):114-22.
- Kim, J.Y., Omori, E., Matsumoto, K., Núñez, G., Ninomiya-Tsuji, J. (2008). TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Biol Chem.* 283(1):137-44.
- Kim, Y.G., Kamada, N., Shaw, M.H., Warner, N., Chen, G.Y., Franchi, L., Núñez, G. (2011). The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity.* 34(5):769-80.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Núñez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.* 6877, 194-9.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 307(5710):731-4.
- Kumar, S., Boehm, J., Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2(9):717-26.

- Ledeboer, A., Sloane, E.M., Milligan, E.D., Frank, M.G., Mahony, J.H., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2005). Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain*. 115(1-2):71-83.
- Li, C.Y., Song, Y.H., Higuera, E.S., Luo, Z.D. (2004). Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci*. 24(39):8494-9.
- Lin, C.S., Tsaur, M.L., Chen, C.C., Wang, T.Y., Lin, C.F., Lai, Y.L., Hsu, T.C., Pan, Y.Y., Yang, C.H., Cheng, J.K. (2007). Chronic intrathecal infusion of minocycline prevents the development of spinal-nerve ligation-induced pain in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 32, 209-16.
- Liu, X., Chauhan, V.S., Young, A.B., Marriott, I. (2010a). NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia*. 58(7):839-47.
- Liu, X., Chauhan, V.S., Marriott, I. (2010b). NOD2 contributes to the inflammatory responses of primary murine microglia and astrocytes to *Staphylococcus aureus*. *Neurosci Lett*. 474(2):93-8.
- Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundbäck, P., Valdes-Ferrer, S.I., Olofsson, P.S., Kalb, T., Roth, J., Zou, Y., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Ting, J.P., Wang, H., Andersson, U., Antoine, D.J., Chavan, S.S., Hotamisligil, G.S., Tracey, K.J. (2012). Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature*. 488(7413):670-4.
- Marchand, F., Tsantoulas, C., Singh, D., Grist, J., Clark, A.K., Bradbury, E.J., McMahon, S.B. (2009). Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. *Eur J Pain*. 13(7):673-81.
- Marina-García, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Hu, Y., Smith, D.E., Boons, G.J., Núñez, G. (2009). Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol*. 182(7), 4321-7.
- McDonald, C., Inohara, N., Nunez, G. (2005). Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem*. 21, 20177-80.

- Meller, S.T., Dykstra, C., Grzybycki, D., Murphy, S., Gebhart, G.F. (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology*. 33(11):1471-8.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A. (1994). A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 32(4):197-200.
- Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 442(7098):39-44.
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A.M., Manouvrier-Hanu, S., Häfner, R., Chamaillard, M., Zouali, H., Thomas, G., Hugot, J.P. (2001) CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*. 29(1):19-20.
- Milligan, E.D., O'Connor, K.A., Nguyen, K.T., Armstrong, C.B., Twining, C., Gaykema, R.P., Holguin, A., Martin, D., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 21(8):2808-19.
- Milligan, E.D., Twining, C., Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci*. 23, 1026-40.
- Milligan, E.D., Watkins, L.R. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 10(1):23-36.
- Nguyen, M.D., Julien, J.P., Rivest, S. (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*. 3(3):216-27.
- Obata, H., Sakurazawa, S., Kimura, M., Saito, S. (2010). Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats. *Brain Res*. 1363:72-80.

Obata, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Yi, D., Tokunaga, A., Hashimoto, N., Yoshikawa, H., Noguchi, K. (2003). Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Pain*. 101(1-2):65-77.

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.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Nunez, G.(2001a). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 276(7), 4812-8.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H. (2001b). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411(6837):603-6.

Ozaktay, A.C., Kallakuri, S., Takebayashi, T., Cavanaugh, J.M., Asik, I., DeLeo, J.A., Weinstein, J.N. (2006). Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J*. 15(10):1529-37.

Park, J.H., Kim, Y.G., McDonald, C., Kanneganti, T.D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N., Núñez, G. (2007). RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol*. 178(4):2380-6.

Paulsen, R.E., Contestabile, A., Villani, L., Fonnum, F. (1987). An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem*. 48(5):1377-85.

Pocock, J.M., Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*. 30(10):527-35.

- Raghavendra, V., Tanga, F., DeLeo, J.A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 306(2), 624-30.
- 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.
- Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L. (2000). Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain.* 4(3):247-57.
- Rogers, J., Mastroeni, D., Leonard, B., Joyce, J., Grover, A. (2007). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol.* 82, 235-46.
- Romero-Sandoval, A., Chai, N., Natile-McMenemy, N., DeLeo, J.A. (2008). A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Res.* 1219:116-26.
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Bräutigam, K., Kühbacher, T., Waetzig, G.H., Seegert, D., Schreiber, S. (2003). TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 124(4):1001-9.
- Sato, T., Shikama, Y., Shimauchi, H., Endo, Y., Takada, H. (2011). Analgesic effects of chemically synthesized NOD1 and NOD2 agonists in mice. *Innate Immun.* 17, 54-9.
- 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.
- Shio, M.T., Eisenbarth, S.C., Savaria, M., Vinet, A.F., Bellemare, M.J., Harder, K.W., Sutterwala, F.S., Bohle, D.S., Descoteaux, A., Flavell, R.A., Olivier, M. (2009). Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog.* 5(8):e1000559.

- Sterka, D. Jr., Rati, D.M., Marriott, I. (2006). Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia*. 53(3):322-30.
- Sterka, D. Jr., Marriott, I. (2006). Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *J Neuroimmunol*. 179(1-2):65-75.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 6, 9–21.
- Sweitzer, S.M., Schubert, P., DeLeo, J.A. (2001). Propentofylline, a glial modulating agent, exhibits antiallodynic properties in a rat model of neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*. 297(3):1210-7.
- Takeda, K., Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 1, 1-14.
- 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.
- Tanabe, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M.M., Tromp, G., Williams, C.J., Inohara, N., Núñez, G. (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J*. 23, 1587–1597.
- Tanga, F.Y., Raghavendra, V., DeLeo, J.A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem Int*. 45(2-3):397-407.

- Tanga, F.Y., Nutile-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., Nutile-McMenemy, N., Lacroix-Fralish, M.L., Deleo, J.A. (2007). Efficacy of propentofylline, a glial modulating agent, on existing mechanical allodynia following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*. 21(2):238-46.
- Thacker, M.A., Clark, A.K., Bishop, T., Grist, J., Yip, P.K., Moon, L.D., Thompson, S.W., Marchand, F., McMahon, S.B. (2009). CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*. 13(3):263-72.
- Tsai, W.H., Huang, D.Y., Yu, Y.H., Chen, C.Y., Lin, W.W. (2011). Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. *Cell Microbiol*. 13(5):717-30.
- Tsuda, M., Mizokoshi, A., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Inoue, K. (2004). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia*. 45(1):89-95.
- Uehara, A., Sugawara, Y., Kurata, S., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Satta, Y., Sasano, T., Sugawara, S., Takada, H. (2005). Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol*. 5, 675-86.
- Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takada, H. (2007). Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*. 12, 3100-11.
- Uematsu, S., Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem*. 21, 15319-23.
- Ulfenius, C., Linderöth, B., Meyerson, B.A., Wallin, J. (2006). Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett*. 399(1-2):85-90.

- Urrutia, R., Henley, J.R., Cook, T., McNiven, M.A. (1997). The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci USA*. 94, 377–384.
- Vieira, S.M., Cunha, T.M., França, R.F., Pinto, L.G., Talbot, J., Turato, W.M., Lemos, H.P., Lima, J.B., Verri Jr, W.A., Almeida, S.C., Ferreira, S.H., Louzada-Junior, P., Zamboni, D.S., Cunha, F.Q. (2012). Joint NOD2/RIPK2 signaling regulates IL-17 axis and contributes to the development of experimental arthritis. *J Immunol*. 188(10):5116-22.
- Voss, E., Wehkamp, J., Stange, E.F., Harder, J. (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*. 281, 2005-11.
- Walker, K., Perkins, M., Dray, A. (1995). Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int*. 26, 1-16.
- Wang, X., Kuivaniemi, H., Bonavita, G., Mutkus, L., Mau, U., Blau, E., Inohara, N., Nunez, G., Tromp, G., Williams, C.J. (2002) CARD15 mutations in familial granulomatosis syndromes: a study of the original Blau syndrome kindred and other families with large-vessel arteritis and cranial neuropathy. *Arthritis Rheum*. 46(11):3041-5.
- Wieseler-Frank, J., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2004). Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int*. 45(2-3):389-95.
- Wieseler-Frank, J., Maier, S.F., Watkins, L.R. (2005). Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals* 14(4):166-74.
- Wilmanski, J.M., Petnicki-Ocwieja, T., Kobayashi, K.S. (2008). NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol*. 83(1):13-30.
- Woolf, C.J., Salter, M.W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 288(5472):1765-9.

- Xu, J.T., Xin, W.J., Zang, Y., Wu, C.Y., Liu, X.G. (2006). The role of tumor necrosis factor- α in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain*. 123(3):306-21.
- Yang, S., Tamai, R., Akashi, S., Takeuchi, O., Akira, S., Sugawara, S., Takada, H. (2001). Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun*. 69(4):2045-53.
- Zhang, J., Shi, X.Q., Echeverry, S., Mogil, J.S., De Koninck, Y., Rivest, S. (2007). Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci*. 27(45):12396-406.
- Zhang, L., Berta, T., Xu, Z.Z., Liu, T., Park, J.Y., Ji, R.R. (2011). TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*. 152(2):419-27.
- Zhuang, Z.Y., Gerner, P., Woolf, C.J., Ji, R.R. (2005). ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain*. 114(1-2):149-59.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16,109-117.

8. Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 106/2011, sobre o projeto intitulado “*Investigação do papel dos receptores intracelulares NOD1 e NOD2 na fisiopatologia da dor crônica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Thiago Mattar Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de agosto de 2011.

(We certify that the protocol nº 106/2011, about “*Investigation of the role of intracellular receptors NOD1 and NOD2 in the physiopathology of chronic pain*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 08/29/2011.

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2011.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal