

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

JAQUELINE RAYMONDI SILVA

Interações neuro-imunes envolvidas na gênese da hipersensibilidade nociceptiva herpética e  
pós-herpética

Ribeirão Preto

2014

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.

Este manuscrito trata-se da versão corrigida da tese originalmente submetida e apresentada para a defesa.

### Ficha Catalográfica

Silva, Jaqueline Raymondi

Interações neuro-imunes envolvidas na gênese da hipersensibilidade nociceptiva herpética e pós-herpética.

Ribeirão Preto, 2014.

182 p.

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Palavras-chaves: HSV-1, dor, leucócitos, TNF- $\alpha$ , COX-2

JAQUELINE RAYMONDI SILVA

Interações neuro-imunes envolvidas na gênese da hipersensibilidade nociceptiva herpética e pós-herpética

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto

2014

# *Resumo*

Silva JR. Interações neuro-imunes envolvidas na gênese da hipersensibilidade nociceptiva herpética e pós-herpética. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014.

Herpes Zoster é uma doença causada pela reativação do vírus Varicela Zoster nos gânglios sensoriais, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões na pele e dor. Não há modelos animais disponíveis para estudo da patofisiologia da doença. No entanto, um modelo murino que utiliza o HSV-1 tem sido usado para tal fim, visto que os animais desenvolvem lesões zosteriformes e desenvolvem hipersensibilidade na pata infectada. Não há dados na literatura acerca da resposta imune que se desenvolve nos gânglios da raiz dorsal destes animais. Logo, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar células e mediadores inflamatórios presentes nos gânglios da raiz dorsal e sua relação com a hiperalgesia durante a infecção cutânea por HSV-1. Durante a fase aguda da infecção, os camundongos desenvolveram hiperalgesia nas patas ipsilaterais a partir do 3 dia pós-infecção, que perdurou até o 7 dia pós-infecção. A maior carga viral foi detectada nos gânglios L4, L5 e L6, os quais compõem o nervo ciático, que inerva a área infectada. O tratamento dos animais infectados com dexametasona ou fucoidina resultou na redução do comportamento de hiperalgesia, a partir do 5 dia pós-infecção, que corresponde ao período em que a migração de leucócitos passa a aumentar nos gânglios da raiz dorsal. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD4 foram detectados nos gânglios durante a infecção aguda. No entanto, linfócitos T CD8 estavam ausentes. A expressão do mRNA de TNF- $\alpha$  e COX-2 estava aumentada nos gânglios, e o tratamento de animais infectados com drogas inibidoras de ambos resultou na redução da hiperalgesia. Os receptores do tipo Toll-like e da IL-1 não participam da geração da hipersensibilidade herpética. Após 50 dias da infecção, constatou-se que alguns animais apresentavam comportamento de hiperalgesia irreversível, semelhante à neuralgia pós-herpética humana (NPH). Não houve diferença significativa na incidência da NPH em animais de linhagens ou sexos diferentes. Ainda, o tratamento com drogas anticonvulsivantes e antidepressivas, mas não com morfina e anti-inflamatórios, resultou na redução transiente da hiperalgesia. Neste período, não há participação da inflamação na manutenção da hiperalgesia. A expressão de TNF- $\alpha$  e COX-2 retorna aos níveis basais, e não são mais detectados neutrófilos e macrófagos. No entanto, a migração de linfócitos T CD4+ e CD8+ aos gânglios aumenta de maneira tempo-dependente. Durante a NPH, detectou-se uma intensa ativação das células satélites gliais, que contribuem para a manutenção da hiperalgesia pós-herpética. Nossos resultados demonstram que a manutenção hiperalgesia herpética é resultado da intensa resposta inflamatória que ocorre nos gânglios da raiz dorsal infectados, com aumento da produção de TNF- $\alpha$  e COX-2, importantes mediadores para a hipersensibilidade. No entanto, durante a neuralgia pós-herpética, não há participação de células ou mediadores inflamatórios, mas de células da glia, as quais são importantes na manutenção da hiperalgesia.

**PALAVRAS-CHAVE:** HSV-1, dor, leucócitos, TNF- $\alpha$ , COX-2



# *Abstract*

Silva JR. Neuro-immune interactions involved in the genesis of herpetic and postherpetic nociceptive hypersensitivity. Ribeirao Preto: University of Sao Paulo, Ribeirao Preto Medical School, 2014.

Herpes Zoster is a disease caused by reactivation of varicella zoster virus in sensory ganglia, characterized by dermal rash and pain. There are no animal models available to study the pathophysiology of the disease. A murine model of HSV-1 infection on the hind paw skin has been used to study HZ, since mice develop HZ-like skin lesions and pain-related responses. There are no data available about the immune response in dorsal root ganglion (DRG) of these mice. Thus, the aim of this study was to evaluate cells and inflammatory mediators present in DRGs and its relationship with hyperalgesia during HSV-1 cutaneous infection. During the acute phase of infection, mice developed hyperalgesia in ipsilateral paws from 3 days post-infection, which persisted until 7 days post-infection. The highest viral load was detected in ganglia L4, L5 and L6. Treatment of infected mice with fucoidin or dexamethasone resulted in the reduction of hyperalgesic behavior, from the 5th post-infection day, which corresponds to the period in which leukocyte migration increase in the dorsal root ganglia. Macrophages, neutrophils and CD4 + T lymphocytes were detected in the ganglia during acute infection. However, CD8 + T lymphocytes were absent. The mRNA expression of TNF- $\alpha$  and COX-2 was increased in dorsal root ganglia, and the treatment of infected mice with drugs that inhibits both mediators resulted in reduced hyperalgesia. The Toll-like receptors and IL-1 does not participate in the generation of herpetic hypersensitivity. After 50 days of infection, it was found that some animals presented irreversible hyperalgesic behavior, like human post-herpetic neuralgia (PHN). There was no significant difference in the incidence of PHN in animals of different genders or strains. Furthermore, treatment with anticonvulsant and antidepressant drugs, but not morphine and anti-inflammatory, resulted in transient reduction of hyperalgesia. In this period, there is no participation of inflammation in the hyperalgesia maintenance of. The expression of TNF- $\alpha$  and COX-2 returns to baseline levels, and neutrophils and macrophages are no longer detected. However, the migration of CD4 + and CD8 + to ganglia increases in a time-dependent manner. During NPH, an intense activation of glial cells satellites was detected, that contributes to the maintenance of post-herpetic hyperalgesia. Our results demonstrate that herpetic hyperalgesia maintenance is a result of an intense inflammatory response that occurs in the infected dorsal root ganglia, with increased production of TNF- $\alpha$  and COX-2. However, during post-herpetic neuralgia, there is involvement of glial cells, which are important in hyperalgesia maintenance.

**KEYWORDS:** HSV-1, pain, leukocytes, TNF- $\alpha$ , COX-2

## **Dedicatória**

*Aos meus pais, Angela e Wagner, que participaram, participam, e continuarão participando de cada etapa cumprida em minha vida.*

*Ao meu irmão Alessandro, companheiro da minha vida. Segue sendo exemplo, além de ser o melhor irmão do mundo.*

*Ao meu amigo Jhimmy que me iniciou nessa aventura que foi o doutorado, e que me ofereceu suporte e ajuda em todas as horas necessárias*

*A todos os animais que participaram deste estudo, de forma direta e indireta. Tenho consciência que este trabalho não teria sido feito sem a essencial ajuda destes seres especiais.*

*Amo vocês!!!*

### **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, por ter me dado a oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, por ter me proporcionado as condições de realizar este trabalho, e pelos ensinamentos e orientação.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, o qual foi fundamental para a realização deste projeto com sua orientação e experiência no assunto.

Ao Prof. Dr. Benedito A. Lopes da Fonseca, por ter cedido seu laboratório para a execução de várias etapas do trabalho, e por sua disposição em ajudar em todos os momentos.

Aos professores membros da banca examinadora, Prof. Dr. Juliano Ferreira, Prof. Dr. Dario Simões Zamboni e Prof. Dr. Yara Cury, pela discussão do trabalho e sugestões, que me ajudaram a aprimorar esta tese, além da disponibilidade de participarem desta Comissão Julgadora.

Aos técnicos Maria Lúcia Silva (Pitty) e Danilo Esposito, por terem ajudado na realização de experimentos e por terem cedido as linhagens celulares utilizadas no estudo, além de ensinarem técnicas fundamentais para o aprimoramento do trabalho.

Ao Curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP – USP, na pessoa de seus professores e funcionários, pelos ensinamentos e convivência.

À secretária da pós-graduação Ana Cristine S. Ferreira pela eficiência na condução de seu trabalho e por ter me ajudado tantas vezes durante o Doutorado, além de ter se mostrado uma grande amiga.

Aos técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor, Katia, Serginho, Giu, Diva e Marquinhos, pela ajuda em todos os momentos, estando sempre dispostos a nos ajudar em tudo o que precisássemos.

À técnica Ieda pela competência e por ter contribuído muito na execução do trabalho, já que grande parte dos tratamentos em animais experimentais foram feitos por ela.

A todos colegas do LID pela convivência, discussões intelectuais e companheirismo.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório, no decorrer do Doutorado: Fernanda, Kalil, Panda, Nerry e França. Obrigado a vocês, queridos, por tornar o dia-a-dia menos maçante e por me aturar, inclusive, mal-humorada!

Aos meus velhos e queridos amigos Viviane e Joni, que me acompanham desde o começo do Mestrado e continuam participando da minha vida. Obrigada pela amizade sincera e por tudo que já fizeram por mim.

Ao meu grande amigo Jhimmy pela ajuda em todos os momentos, pela paciência e pelo bom-humor. Além de ter sido fundamental para a execução do projeto, também o foi para a minha vida.

Ao meu amigo Alexandre, que me acudiu sempre ao pedir ajuda, e nunca titubeou em nenhum momento. O melhor colaborador que eu poderia ter conseguido.

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial aos da “casa amarela” e agregados, por me ajudarem a lembrar (mas não por muito tempo), que existe vida fora do laboratório.

À minha grande e melhor amiga Mônica. Obrigada por esses anos de amizade, apoio, incentivo, diversão, enfim, por ser esta amiga tão especial, que não tenho nem palavras para descrever.

À minha divertida família (vó Diva, Artur, Adriana, Carol, Gu, Regina, Thaís, Thiago, pessoal do Sul, e todos os outros) pelo apoio, mesmo à distância.

Aos meus bebês mais lindos do Sofia, Anita e Bernarndo. Vocês são os “filhos” mais queridos que uma “mãe” pode querer.

À FAPESP pelo essencial apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. São tantas pessoas importantes que fica difícil lembrar-se de todas no momento.

**Obrigada a todos vocês!**

*“Enquanto o homem continuar a destruir impiedosamente os seres vivos inferiores não conhecerá a saúde e a paz. Pois enquanto os homens massacrarem os animais, matarão uns aos outros. De fato, aquele que semeia morte e dor não pode colher alegria e amor”*

*— Pitágoras*

*“O maior pecado contra a mente humana é acreditar em coisas sem evidências. A ciência é somente o supra-sumo do bom-senso – isto é, rigidamente precisa em sua observação e inimiga da lógica falaciosa.”*

*—Aldous Huxley*

# Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>16</b>
1.1 Dor	17
1.2 Dor inflamatória	18
1.3 Dor neuropática	14
1.4 Varicela Zoster Virus (VZV), Herpes Zoster (HZ) e neuralgia pós-herpética (NPH)	16
1.5 Herpes Simplex-1 (HSV-1) e o modelo de Herpes Zoster e NPH murino	19
1.6 A hiperalgesia como consequência da resposta imune contra o HSV-1	21
1.6.1 Reconhecimento viral – Papel dos TLRs	21
1.6.2 Papel das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ na resposta contra o HSV-1	23
1.6.3 Papel de neutrófilos e macrófagos na resposta contra o HSV-1	24
1.6.4 Papel dos linfócitos T CD4 e CD8 na resposta contra o HSV-1	25
<b>2 Objetivos</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>30</b>
3.1 Drogas	31
3.2 Animais	32
3.3 Amostras virais	33
3.3.1 Vírus	33
3.3.2 Preparo das sementes virais	33
3.3.3 Titulação viral	33
3.4 Modelo de hiperalgesia herpética	34
3.5 Avaliação da nocicepção mecânica - Teste com Von Frey de filamento	34
3.6 Quantificação da carga viral em GRDs	35
3.7 Análise da presença de células T CD8+ (CD45+high CD8+CD4- ), T CD4+ (CD45+high CD4+CD8), Neutrófilos (CD45+high GR-1/Ly-6G+ F4/80-), macrófagos/monócitos (CD45+high F4/80+GR-1/Ly-6G-) por citometria de fluxo (FACS)	36
3.8 Análise de expressão relativa de mRNA	36
3.9 Quantificação da expressão proteica da COX-2 e GFAP por Western blot	37
3.10 Análise Estatística	37
<b>4 Resultados</b>	<b>38</b>
4.1 Caracterização do modelo de hiperalgesia herpética e pós-herpética	39

4.1.1 Determinação da hiperalgesia herpética em camundongos infectados .....	38
4.1.2 Determinação da carga viral nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) de camundongos infectados .....	45
4.2 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento da hiperalgesia herpética .....	47
4.2.1. Papel da inflamação nos GRDs e medula na manutenção da hiperalgesia herpética .....	47
4.2.2 Caracterização do perfil temporal de infiltração de células do sistema imune nos GRDs e na medula durante a infecção por HSV-1 .....	50
4.2.3 Caracterização do perfil de leucócitos que infiltram os GRDs durante a infecção herpética .....	53
4.2.4 Leucócitos que infiltram nos GRDs tem um papel importante na amplificação, mas não na gênese da hiperalgesia herpética .....	55
4.2.5 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios nos GRDs durante a infecção por HSV-1 e o seu papel na hiperalgesia herpética – Papel da PGE <sub>2</sub> / COX-2 .....	60
4.2.6 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios nos GRDs durante a infecção por HSV-1 e o seu papel na hiperalgesia herpética – Papel do TNF- $\alpha$ .....	64
4.2.7 A molécula adaptadora de sinalização MyD88 tem um papel importante na fase inicial da hiperalgesia herpética, mas não nos eventos mais tardios .....	68
4.2.8 Papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na fase inicial da hiperalgesia herpética .....	70
4.2.9 Papel dos receptores do tipo IL-1 (IL-1RI) na fase inicial da hiperalgesia herpética .....	72
4.2.10 Ativação de células satélites gliais dos GRDs durante a infecção por HSV-1 .....	74
4.3 Avaliação da Neuralgia Pós-Herpética (NPH) em camundongos infectados .....	78
4.3.1 Avaliação temporal dos camundongos infectados .....	77
4.3.2 Determinação da Neuralgia Pós-Herpética (NPH) em camundongos infectados .....	82
4.3.3 O gênero não interfere no desenvolvimento da NPH .....	83
4.3.4 Cinética da carga viral dos GRDs no decurso da infecção .....	86
4.4 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento da hiperalgesia pós-herpética .....	88
4.4.1 Isomorfismo Farmacológico da NPH murina com a hiperalgesia neuropática .....	88
4.4.2 Papel da inflamação na manutenção da NPH .....	92
4.4.3 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios (COX-2 e TNF- $\alpha$ ) nos GRDs e o seu papel na NPH .....	94
4.4.4 Papel do TNF- $\alpha$ na gênese da NPH .....	97
4.4.5 Caracterização do perfil de leucócitos que infiltram os GRDs durante a infecção por HSV-1 .....	99
4.4.5.1 Cinética do Infiltrado de Neutrófilos e Macrófagos nos GRDs de camundongos infectados .....	99
4.4.5.2 Cinética do Infiltrado de linfócitos T CD4 e T CD8 nos GRDs de camundongos infectados .....	101
4.4.6 Papel da das células satélites dos GRDs (CSGs) na NPH .....	103
<b>5 Discussão .....</b>	<b>107</b>

<b>6 Conclusões</b>	<b>124</b>
<b>7 Referências bibliográficas</b>	<b>126</b>
<b>Anexos</b>	<b>140</b>

# ***1 Introdução***

## 1.1 Dor

Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”, e pode ser caracterizada clinicamente em quatro categorias, relacionadas a substratos anatômicos, fisiológicos e psicológicos: nocicepção, percepção da dor, sofrimento e comportamento da dor (Loeser, 1980). Além de envolver a percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais especializados (nociceptores) são ativados, a dor apresenta um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção e aprendizagem ((Loeser e Melzack, 1999). A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiências de vida de cada pessoa. A partir dessas considerações, dor é o termo mais adequado para a experiência humana, enquanto nocicepção é o termo indicado para animais experimentais, uma vez que não há meios de se conhecer a percepção nos mesmos (Noback, Strominger e Dmarest, 1996).

Os estímulos nociceptivos, sejam eles físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (bradicinina, capsaicina, serotonina, prótons etc.), são detectados por nociceptores presentes nos diferentes tecidos. Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas, de uma família específica de neurônios sensoriais primários e estão distribuídos na pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras; aqueles que inervam a cabeça e pescoço compõem os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares no gânglio trigeminal. Já os corpos celulares das fibras de nociceptores que inervam tronco e membros estão nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) dos nervos espinais (Besson e Chaouch, 1987). Os nociceptores são neurônios pseudo-unipolares, possuindo um ramo axonal distal, que se dirige à periferia, e outro ramo axonal proximal, que se dirige ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral.

Baseado em critérios morfológicos, as fibras nociceptivas podem ser classificadas em fibras de pequeno e médio diâmetro. As fibras de médio diâmetro, também denominadas fibras A $\delta$ , são finamente mielinizadas, possuem velocidades de condução entre 2 e 30 m/s. Elas correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras de pequeno diâmetro, denominadas fibras C, não são mielinizadas e por isso possuem velocidade de condução baixa (0,5 - 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa (Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Elas correspondem a 80% das fibras condutoras da informação nociceptiva. Quanto ao estímulo nociceptivo capaz de ativar estas fibras, as fibras A $\delta$  respondem, principalmente, a estímulos mecânicos e térmicos, enquanto as fibras C respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Julius e Basbaum, 2001).

A informação nociceptiva (ou seja, um estímulo nociceptivo) é reconhecida por moléculas sinalizadoras específicas (eg. TRPV1, TRPA1, TRPM8 etc.) presentes nos nociceptores (fibras A $\delta$  e C), convertida em impulsos elétricos e transmitida pelos nervos espinais e cranianos aos neurônios de segunda e terceira ordem no sistema nervoso central. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas fazem sinapses diretamente com neurônios secundários, em núcleos no tronco cerebral. Já os presentes nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central através da raiz dorsal da medula espinal, onde realizam sinapses com neurônios de segunda ordem (Noback, Strominger e Dmarest, 1996).

### **1.1 Dor inflamatória**

A dor inflamatória é resultado de uma resposta inflamatória aguda em um tecido lesionado, no qual observa-se o rubor e o calor, decorrentes, principalmente, da arteríolo-dilatação local, bem como formação de edema inflamatório (tumor). Em acréscimo a esses eventos, há o desenvolvimento concomitante de um denominador comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos

que normalmente não produzem ou produzem pouca dor. A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios, os quais realizam modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos (Petho e Reeh, 2012). Estes mediadores podem ser liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual, ou por células da imunidade inata e adaptativa, que migram ao tecido lesionado e são fundamentais para o desenvolvimento das respostas inflamatórias e das hiperalgésias (Cunha *et al.*, 2005). Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória, no que se refere à dor, podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários e os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais interagem diretamente com seus receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização (Cunha *et al.*, 2007). Entre os mediadores intermediários, destacam-se as citocinas, como sendo os que possuem papel mais bem caracterizado na dor inflamatória, tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-8 (Verri *et al.*, 2006). Foi demonstrado, tanto em ratos, quanto em camundongos, que estas citocinas são liberadas seqüencialmente durante o processo inflamatório e constituem uma ligação entre o estímulo inflamatório e a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção. Os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais são aqueles responsáveis pela sensibilização direta do nociceptor, tais como endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpáticas (Petho e Reeh, 2012). A capacidade das prostaglandinas e aminas simpáticas em sensibilizar os nociceptores já foi demonstrada em humanos e outros animais através de técnicas comportamentais e eletrofisiológicas (Nakamura e Ferreira, 1987; Ferreira, 1993). Estes mediadores agem, preferencialmente, em receptores neuronais metabotrópicos de fibras C, desencadeando a ativação de mensageiros secundários, tais como AMP cíclico (cAMP),

proteína kinase A (PKA) e proteína kinase C (PKC) . A subsequente fosforilação do canal de sódio voltagem-dependente Nav1.8 e a inibição de canais de potássio voltagem-dependentes são responsáveis pela queda dos limiares de ativação neuronais, aumentando a excitabilidade de membrana (Ferreira e Nakamura, 1979a; b; Ferreira, 1980). Na indução da hipernocicepção/hiperalgesia inflamatória, a liberação dos mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Quando se realiza uma análise do exsudato inflamatório, colhido em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo, é possível detectar vários mediadores presentes. Porém, a análise temporal cuidadosa desse exsudato revelavque a liberação dos mesmos segue uma seqüência definida. É por esta razão que, ao se bloquear um passo desta seqüência, pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor (Verri *et al.*, 2006).

### **1.3 Dor neuropática**

A dor neuropática é definida pela IASP como “dor iniciada ou causada por lesão primária ou doença do sistema nervoso”. Este trauma ao tecido nervoso resulta em anormalidades da função neural percebidas pelo indivíduo como sintomas e sinais da dor neuropática. Em teoria, a maioria dos processos patológicos capazes de gerar dano ou disfunção do tecido nervoso podem ser considerados causas potenciais de dor neuropática. Inflamação asséptica, infecções virais ou bacterianas, pressão devido a neoplasmas ou outras lesões estruturais, isquemia, mecanismos autoimunes, tóxicos, traumáticos e endócrinos/metabólicos já foram relacionados na geração da dor (Jay e Barkin, 2014). As evidências da literatura sugerem que a atividade anormal neuronal é um importante mecanismo relacionado à dor neuropática. Os focos ectópicos podem ocorrer em nervos lesionados ou em processo de regeneração, em neuromas, nos gânglios da raiz dorsal e nas lâminas do corno dorsal da medula espinal. Evidências farmacológicas sugerem que a atividade ectópica neuronal é resultado do número aumentado de canais de sódio ou instabilidade na sua atividade, visto que alguns anestésicos locais e anticonvulsivantes, que

bloqueiam a atividade destes canais, são efetivos no tratamento da dor neuropática. Além dos canais de sódio, sugere-se que a atividade de canais de cálcio voltagem-dependentes também seja importante na modulação da transmissão sináptica (Fornasari, 2012).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que as modificações funcionais não são apenas um processo intrínseco dos neurônios, mas que neste fenômeno as células da glia, presentes tanto no Sistema Nervoso Central (células da glia na medula espinal) quanto no periférico (células satélites do gânglio da raiz dorsal- GRD), desempenham um importante papel (Milligan e Watkins, 2009). As células da glia (microglia, astrócitos e células satélites) são células de origem mielóide (microglia) ou ectodermal (astrócitos e células satélites), cuja função é fornecer suporte, nutrição e proteção aos neurônios. A idéia principal é que durante o processo de instalação da nocicepção, as células da glia seriam responsáveis pela criação de um ambiente inflamatório na medula espinal, bem como nos GRDs, induzindo e mantendo estados dolorosos crônicos.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ativação das células gliais da medula espinal e das células satélite nos GRDs e sua contribuição para a gênese da dor crônica. As evidências sugerem que durante os processos de lesão tecidual (inflamação), a constante estimulação das vias nociceptivas leva a liberação intensa de neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P, ATP) na medula espinal e nos GRDs, os quais seriam responsáveis pela ativação das células da glia (Milligan e Watkins, 2009). Além destes neurotransmissores, os receptores de reconhecimento padrão como os receptores do tipo Toll-like (TLRs) desempenhariam também um papel crucial na ativação das células da glia (Raghavendra, Tanga e Deleo, 2004). Estes receptores são expressos por estas células e demonstrou-se que animais geneticamente deficientes para TLR2 e TLR4 apresentam redução da dor inflamatória e neuropática, fato associado a uma redução na ativação das células da glia da medula espinal e consequente diminuição da produção de mediadores inflamatórios (Tanga, Nutile-Mcmenemy e Deleo, 2005; Kim *et al.*, 2007). Entre os principais mediadores

inflamatórios descritos como participantes do processo de desenvolvimento e manutenção da dor neuropática crônica, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Ainda, existem evidências que a ativação de células da glia por quimiocinas do tipo CC - MCP-1 (via receptor CCR2) e MIP-1 $\beta$  (via receptor CCR5) - pode estar também relacionada com o desenvolvimento da dor neuropática crônica. Por fim, todos estes mediadores culminariam na expressão da enzima ciclooxigenase-2 e produção do mediador nociceptivo, a PGE<sub>2</sub> (Abbadie *et al.*, 2003; Milligan e Watkins, 2009; Kiguchi *et al.*, 2010). Muitos autores ainda atribuem a liberação destes mediadores com a manutenção da sensibilização dos neurônios nociceptivos periféricos na dor neuropática crônica. Ademais, alguns autores sugerem que a produção de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, a hipersensibilidade nociceptiva, são amplificadas por células do sistema imune inato que infiltram nos GRDs (Perkins e Tracey, 2000; Morin *et al.*, 2007). Entre estas células, destacam-se os monócitos e os neutrófilos, os quais, após ativação, também podem produzir TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e PGE-2. No entanto, os mecanismos envolvidos com as alterações nas vias nociceptivas, a nível medular e nos GRDs, não estão bem descritos para estados dolorosos crônicos causados por infecções. Este ponto torna-se importante, visto que nos estados infecciosos, a produção de mediadores inflamatórios é constantemente induzida pelo agente infeccioso, o qual, por sua vez, tem a sua eliminação efetivada pelos mesmos.

#### **1.4 Varicella zoster Virus (VZV), Herpes Zoster e Neuralgia Pós-Herpética (NPH)**

O Varicella Zoster (VZV) é um alpha-herpesvirus de DNA dupla fita, que apresenta tropismo por neurônios e infecta exclusivamente humanos. A infecção primária resulta em zoster (comumente conhecido como catapora), que acomete principalmente crianças, caracterizada por febre e o aparecimento generalizado de vesículas pruríticas (Dworkin e Portenoy, 1996). No decorrer da infecção, o VZV é transportado das células epiteliais aos neurônios localizados nos gânglios trigeminiais ou da raiz dorsal, onde estabelece latência e, conseqüentemente, não se replica. No entanto, o vírus pode ser reativado em situações de

imunocomprometimento (idade avançada, indivíduos soropositivos ou sob tratamento com drogas imunossupressoras) (Opstelten *et al.*, 2010). A reativação do VZV dá origem ao Herpes Zoster (HZ), doença caracterizada por dor aguda e aparecimento de vesículas confinadas a um dermatomo sensorial. A incidência de HZ nos Estados Unidos é de 3,2 casos a cada 100 indivíduos, resultando em, aproximadamente, 1 milhão de episódios anualmente (Nagel e Gilden, 2014; O'Connor e Paauw, 2013). O aparecimento da dor aguda coincide com o surgimento das lesões na pele, e pode durar de 2 a 4 semanas. A dor do herpes zoster é descrita como uma sensação de queimação e dor lancinante quando o membro afetado é tocado ou movido. Cerca de 50% dos pacientes sofrem dor espontânea e respondem a estímulos táteis não nocivos, o que caracteriza a alodinia (Nurmikko, Rasanen e Hakkinen, 1990). O tratamento com drogas antivirais, tais como acyclovir, famciclovir e valacyclovir, reduz as lesões da pele e sua duração, bem como a dor associada ao herpes zoster (Tyring, 2007). Ainda, o tratamento complementar para alívio da dor envolve o uso de corticosteróides, anti-inflamatórios não-esteroidais, e, nos casos severos, opióides, anticonvulsivantes (gabapentina ou pregabalina) ou antidepressivos tricíclicos (amitriptilina). O desaparecimento das lesões no decorrer da resolução do herpes zoster geralmente está associado à cura da dor. No entanto, parte dos indivíduos acometidos pela doença apresenta dor persistente, mesmo após a cura das lesões cutâneas, o que caracteriza a Neuralgia Pós-Herpética (NPH) (Gilden *et al.*, 2011)..

A NPH é a consequência mais comum do herpes zoster, e sua apresentação é heterogênea, visto que os pacientes podem apresentar dor contínua ou intermitente, a qual pode ser espontânea, evocada, ou evocada em resposta a estímulos táteis não dolorosos (alodinia). Indivíduos com mais de 50 anos apresentam 14.7 vezes maior probabilidade de desenvolver a NPH, quando comparados a indivíduos com menos de 50 anos (Choo *et al.*, 2013). Ainda, pacientes que apresentam pródromo do herpes zoster, possuem maior gravidade das lesões e dor, bem como indivíduos do sexo feminino, são mais propensos a desenvolver a

doença (Jung *et al.*, 2004). Os pródromos do HZ em humanos consistem em hiperestesia, parestesia, disestesia e prurido no dermatômo afetado, que dura de um a dois dias e pode preceder o aparecimento de lesões na pele até três semanas antes (Stankus, Dlugopolski e Packer, 2000). Os sintomas associados à NPH incluem fadiga crônica, anorexia, perda de peso e insônia. Os antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes são os fármacos de escolha no tratamento da NPH e, na maioria das vezes, não oferecem alívio satisfatório ao indivíduo. Assim sendo, a NPH é associada ao sofrimento psicológico em longo prazo, limitações físicas que levam à perda de dias de trabalho, a interferência com o sono e atividades diárias, que resultam em grandes complicações na qualidade de vida dos indivíduos afetados, além de consumir uma parte significativa de recursos destinados à saúde pública por ser uma doença de longa duração.

O entendimento da patofisiologia do Herpes Zoster e NPH pode indicar possíveis direções no desenvolvimento de drogas e cura da doença (Johnson, 1997). Para tanto, a necessidade do desenvolvimento de um modelo experimental para avaliação da dor herpética é imprescindível, mas o VZV não é capaz de infectar outros mamíferos além de humanos. A infecção de pequenos mamíferos, como camundongos, cobaias e ratos, resultou na soroconversão destes animais sem o aparecimento de infecção produtiva. Portanto, a necessidade de um modelo que reflita a gênese e manutenção da dor durante a infecção neuronal por herpesvirus tornou-se urgente, e uma alternativa ao uso do VZV foi criada: a utilização do HSV-1 para infecção de pequenos roedores, visto que ambos vírus são estruturalmente semelhantes, pertencem à mesma família, têm ciclos de replicação quase idênticos e são capazes de infectar neurônios e causar dor aguda e duradoura (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000; Takasaki *et al.*, 2002)(Takasaki *et al.*, 2000; Takasaki *et al.*, 2002).

### 1.5 Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) e o modelo de Herpes Zoster e NPH murino

O HSV-1 é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, gênero  $\alpha$ -herpesvirus, e possui DNA fita-dupla de aproximadamente 150 kb, arranjado de maneira linear dentro do capsídeo, o qual, por sua vez, é envolto por um envelope contendo 9 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM), além de lipídeos adquiridos da célula do hospedeiro (Knipe *et al.*, 1981).

No ciclo lítico, que ocorre em células da mucosa e/ou epitélio (infecção primária), ocorre a infecção da célula do hospedeiro, translocação do capsídeo ao núcleo e deposição do DNA através dos poros nucleares; instantaneamente começa o processo de transcrição viral, replicação do DNA e encapsidação de virions. Na infecção neuronal, inicia-se o processo de latência do HSV-1. O vírus é capaz de entrar no neurônio através de fusão no terminal axonal, e o capsídeo é transportado por mecanismos de transporte axonal retrógrado ao núcleo do corpo do neurônio. O DNA viral persiste no núcleo em uma forma circular episomal, associada a nucleossomos. A replicação lítica é reprimida, e os únicos transcritos detectados nesta fase são os transcritos associados à latência (LAT), expressos abundantemente (Bloom, Giordani e Kwiatkowski, 2010; Placek e Berger, 2010). Apesar de nem todos os neurônios serem permissivos à latência do HSV-1, sabe-se que a mesma só ocorre neste subtipo celular; este processo não ocorre em células epiteliais (Miller, Danaher e Jacob, 1998). Os mecanismos que dirigem a conversão do ciclo lítico à latência ainda não são totalmente compreendidos, e consistem em um amplo campo de estudo. Como tal modulação só ocorre em neurônios, acredita-se que esta célula possa, de alguma maneira, controlar a replicação viral. Em uma pequena fração dos neurônios infectados, ocorre reativação periódica do vírus, com uma pequena produção de virions, que não chega a lesar as células. Estes vírus são transportados via transporte axonal anterógrado até o sítio da infecção primária, e lá infectam novas células epiteliais, reiniciando o ciclo lítico (Placek e Berger, 2010). Dependendo de fatores intrínsecos ao hospedeiro, a reativação pode ser assintomática ou ocasionar lesões

visíveis a olho nu, e ocorre, geralmente, após traumas de áreas inervadas por neurônios infectados, ou por estímulos sistêmicos (estresse físico ou emocional, exposição à luz ultravioleta, menstruação ou desregulação hormonal) (Miller, Danaher e Jacob, 1998).

O modelo murino é o mais utilizado para avaliação dos efeitos da infecção por HSV-1 *in vivo*, sendo utilizado em experimentos de infecção pelas vias intra-nasal, ocular e sistêmica. De maneira semelhante a humanos, após as infecções intra-nasal e ocular, o vírus infecta os neurônios do gânglio trigeminal. Em ambos, o vírus replica produtivamente em alguns neurônios enquanto estabelece a latência em outros até o 21 dia pós-infecção (dpi); no 28 dpi, vírus infectivos não são detectados no gânglio trigeminal e a latência é atingida por completo (Divito, Cherpes e Hendricks, 2006). Em 1923, Teague e Goodpasture infectaram a coxa de coelhos com HSV-1 e constataram que desenvolveu-se uma lesão zosteriforme, semelhante à ocorrida em humanos, o que indica o transporte do vírus através dos neurônios sensitivos e o retorno à pele do neurodermatômo, com aparecimento de vesículas (Teague e Goodpasture, 1923). O modelo foi reproduzido em camundongos e durante anos foi utilizado para avaliação da resposta imune contra o HSV-1 e eventos da replicação viral, além de estudos de eficácia de terapias antivirais. Foi somente no ano 2000 que Takasaki e colaboradores avaliaram a hiperalgesia herpética no modelo de infecção pericutânea. No trabalho, após escarificação da coxa de camundongos BALB/c e infecção do sítio, houve o aparecimento de lesões zosteriformes no 5 dpi, desenvolvimento de hiperalgesia do 5 ao 8 dpi, e detecção do vírus no gânglio da raiz dorsal (GRD) do 2 ao 8 dpi (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000). Desde então, o modelo é aceito para avaliação da neuralgia herpética e pós herpética, devido à patologia desenvolvida no camundongo ser extremamente semelhante à ocorrida em humanos e à dificuldade do estabelecimento de um modelo confiável e reprodutível do Herpes Zoster e NPH em animais de experimentação (Colleoni e Sacerdote, 2010). No entanto, ainda não se sabe qual o papel do vírus e/ou Sistema Imune na gênese e manutenção da dor herpética, resultando em um extenso campo de estudo da patofisiologia da dor causada por herpesvirus.

## 1.6 A hiperalgesia como consequência da resposta imune contra o HSV-1

Os mecanismos da Imunidade Inata e Adaptativa têm participação fundamental no controle da infecção pelo HSV-1, desde o reconhecimento do vírus até sua manutenção em latência. Porém, os próprios mecanismos de controle da infecção poderiam estar relacionados com a gênese da hiperalgesia herpética e da NPH, visto que diversos trabalhos os relacionam com a cronificação da dor neuropática. Abaixo apresentamos os dados mais relevantes sobre a resposta imune contra o HSV-1, enfatizando os principais mecanismos que poderiam estar relacionados com o desenvolvimento da hiperalgesia herpética.

### 1.6.1 Reconhecimento viral – Papel dos TLRs

O reconhecimento molecular dos vírus é feito pelos receptores de reconhecimento padrão, dentre os quais os receptores do tipo toll (Toll-like receptors – TLR). Os TLRs de maior importância no reconhecimento do HSV-1 são os TLR2 e TLR9, além dos TLR3, TLR4, TLR7 e TLR8.

O TLR2 é expresso em células da linhagem monocítica, além da micróglia e astrócitos, e sua ativação estimula a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias após a infecção por HSV-1 (Aravalli *et al.*, 2005). O TLR9 é expresso principalmente por células dendríticas plasmocitóides, além de células de linhagem monocítica, células da glia (micróglia e astrócitos) e linfócitos T CD8. O papel do TLR2 na infecção por HSV-1 é controverso. Sua ativação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2 e CXCL4. O reconhecimento do vírus pelo TLR2 tem efeito deletério em modelos de encefalite herpética, visto que animais deficientes para o receptor têm menor mortalidade e menos danos ao Sistema Nervoso Central em comparação a camundongos selvagens (Kurt-Jones *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Outros trabalhos, entretanto, demonstram que a expressão de TLR2 e TLR9 pode ser um fator de resistência e controle da infecção por HSV-1, principalmente pela importância no reconhecimento do

material genético do HSV-1 (DNA não-metilado) exercido pelo TLR9 e indução da produção de citocinas antivirais (Berezky-Veress *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010). Além disso, os TLR2/9 são expressos em linfócitos T CD8, e sua ativação resulta em uma maior atividade e proliferação destas células.

O TLR3 reconhece RNA fita dupla e é expresso por astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e neurônios, e a proteína adaptadora envolvida na sinalização deste receptor é TRIF, em contraste com os outros TLRs restantes, nos quais o MyD88 está envolvido. A ativação de TRIF é fundamental para a proteção contra o HSV-1 em modelos de encefalite herpética, visto que camundongos deficientes para esta proteína apresentam maior mortalidade, como consequência de maior presença de vírus no cérebro e menor produção de IFN- $\beta$  (Menasria *et al.*, 2013). Ademais, a deficiência de TRIF em humanos predispõe o desenvolvimento de encefalite herpética (Sancho-Shimizu *et al.*, 2011; Herman *et al.*, 2012). Mutações neste receptor podem estar relacionadas à susceptibilidade à encefalite herpética, bem como à resistência à infecção por HSV-1 (Herman *et al.*, 2012; Svensson *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). A indução de NF $\kappa$ -B em astrócitos infectados por HSV-1, e consequente produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, parece ocorrer via ativação deste receptor nestas células (Liu, Z. *et al.*, 2013).

O TLR4 parece desempenhar um importante papel no controle viral da infecção ocular por HSV-1 (Zheng *et al.*, 2005). Ainda, foi identificado que o HSV-2 ativa a produção de citocinas como IL-6 e IFN- $\beta$  em células epiteliais humanas por uma via dependente de TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B (Liu, H. *et al.*, 2013). Astrócitos apresentam aumento da expressão dos TLRs 2 e 4 após infecção por HSV-1, com consequente aumento dos níveis de expressão de IRF3 e IRF7, INF- $\beta$  e IL-6 (Villalba *et al.*, 2012). Os TLR 7 e 8, por reconhecerem RNA fita simples, parecem desempenhar importante ação antiviral, e suas ativações por drogas agonistas (ex. resiquimod) é uma estratégia terapêutica na infecção por HSV-2, já que as lesões da mucosa vaginal são reduzidas e há aumento na produção de IFNs tipo1 (Mark *et al.*,

2007). A expressão de TLR7 é induzida após a infecção ocular de camundongos (Li *et al.*, 2006). A ativação dos TLRs 3 e 8 em neurônios por RNA dupla fita (poly:IC) ou RNA fita simples induz a expressão de IFN- $\alpha$  e reduz a susceptibilidade destas células à infecção por HSV-1 (Zhou *et al.*, 2009).

Apesar de existirem dados da literatura sobre a importância dos TLRs na resposta inflamatória contra o HSV-1, nenhum trabalho relata o papel do reconhecimento viral na gênese e manutenção da hipernocicepção herpética e da NPH. Se, por um lado, a ativação dos TLRs poderia ser importante para conter e eliminar a infecção nos GRDs, a produção de mediadores inflamatórios em consequência da ativação destes receptores poderia desencadear o quadro nociceptivo.

### **1.6.2 Papel das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ na resposta contra o HSV-1**

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são citocinas pró-inflamatórias importantes no controle do HSV-1. Ambas citocinas são produzidas por células da micróglia, não permissivas à infecção, mas não por astrócitos e neurônios, totalmente permissivos à replicação do HSV-1 (Lokensgard *et al.*, 2001; Marques, Cheeran, Palmquist, Hu, Urban, *et al.*, 2008).

O TNF- $\alpha$ , além de ser uma das citocinas prontamente detectadas após a infecção, pode ser expresso até 120 dpi em GRDs de camundongos infectados, independentemente de reativação, replicação ou transcrição do LAT, mas dependente da baixa expressão de genes do HSV-1 nos neurônios (Chen, Oakes e Lausch, 1993). O uso do acyclovir no período de latência é capaz de reduzir a expressão do TNF- $\alpha$ , pois inibe qualquer replicação, mesmo em baixas taxas, como também inibe a reativação viral (Halford, Gebhardt e Carr, 1997). Na infecção por HSV-1, esta citocina pode ter um papel dual na resposta contra o HSV-1. No modelo de encefalite herpética, animais deficientes para a produção do TNF- $\alpha$  exibem menor produção de outras citocinas e quimiocinas no cérebro e, portanto, não conseguem desenvolver uma resposta apropriada contra o vírus. No entanto, estes animais exibem

redução das lesões no Sistema Nervoso Central, induzidas pela resposta inflamatória. O tratamento de animais infectados por HSV-1 com etanercept, uma droga inibidora de TNF- $\alpha$ , resulta em aumento da sobrevivência dos mesmos quando comparados a animais veículo (Boivin *et al.*, 2013). O pré-tratamento de astrócitos com o TNF- $\alpha$ , antes da infecção por HSV-1, inibe significativamente a replicação viral *in vitro*. O TNF- $\alpha$  também é produzido por linfócitos T CD8, que parecem ser mais eficientes no controle da infecção em relação a aqueles que não o produzem.

A IL-1 $\beta$ , assim como o TNF- $\alpha$ , é uma citocina pró-inflamatória expressa nos estágios iniciais da infecção e parece desempenhar papel fundamental na proteção contra a encefalite herpética, visto que animais deficientes em sua produção não são capazes de estimular a expressão de quimiocinas e citocinas no cérebro e têm menor sobrevivência quando comparados aos animais selvagens infectados (Sergeier, Rivest e Boivin, 2007). Já no modelo de infecção intra-ocular, animais que possuem super-expressão do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) exibem menor lesão ocular, além de não serem capazes de induzir a produção de outras citocinas inflamatórias e quimiocinas, o que sugere o papel da IL-1 $\beta$  na lesão inflamatória durante a infecção por HSV-1.

### **1.6.3 Papel de neutrófilos e macrófagos na resposta contra o HSV-1**

Os macrófagos e os neutrófilos estão presentes no sítio da infecção por HSV-1 em estágios iniciais. No modelo de encefalite herpética, é possível observar um infiltrado massivo de macrófagos e neutrófilos já no 2º dpi, os quais produzem TNF- $\alpha$ , tendo uma importante atividade antiviral (Marques, Cheeran, Palmquist, Hu e Lokensgard, 2008). Entretanto, estes tipos celulares tem também um papel deletério neste modelo. Isto é observado em linhagens de camundongos suscetíveis ao desenvolvimento de encefalite herpética letal, as quais apresentam um maior infiltrado de neutrófilos e macrófagos, em relação a linhagens resistentes. Estas células seriam as responsáveis pela geração da resposta inflamatória

destrutiva, que culminaria em dano do Sistema Nervoso Central (Lundberg *et al.*, 2008). Em modelos de infecção ocular por HSV-1, macrófagos são encontrados nos gânglios trigeminiais (Kodukula *et al.*, 1999; Marques, Cheeran, Palmquist, Hu e Lokensgard, 2008). Atribui-se aos mesmos a função de produzir citocinas inflamatórias nos gânglios infectados. No entanto, existem demonstrações que a depleção de macrófagos, neste modelo, não altera a produção de citocinas, bem como a replicação viral (Cathcart *et al.*, 2011). Nesta situação, apesar de haver um aumento da replicação viral do 1º ao 5º dpi, não há mudança significativa no estabelecimento de latência, bem como no desenvolvimento da doença ocular (Mott *et al.*, 2007). Possivelmente, a ausência dos macrófagos possa ser compensada pela atividade de outro tipo celular fagocitário, como os neutrófilos.

Os neutrófilos são detectados nos estágios iniciais da infecção e desempenham funções semelhantes às das dos macrófagos, promovendo a inflamação dos gânglios infectados. A depleção destes dois tipos celulares no modelo de encefalite herpética é capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos camundongos infectados, sugerindo que a letalidade neste modelo possa estar realmente associada com a resposta inflamatória destrutiva mediada por estes tipos celulares (Lundberg *et al.*, 2008). O recrutamento de neutrófilos para o sítio infectado depende da produção de MIP-2 via CXCR2. Estas células são proeminentes no infiltrado inflamatório da pele após infecção, podendo mediar reações de hipersensibilidade local (Watanabe *et al.*, 1999; Marques, Cheeran, Palmquist, Hu e Lokensgard, 2008).

#### **1.6.4 Papel dos linfócitos T CD4 e CD8 na resposta contra o HSV-1**

Os linfócitos T CD4 são importantes na elaboração da resposta contra o HSV-1 por ativarem linfócitos T CD8 efetores, por isso são encontrados no infiltrado de gânglios infectados. Estas células coordenam a expansão de linfócitos T CD8 produtores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos primeiros dias pós infecção (5 a 7 dpi), além de serem fundamentais na geração de células CD8 de memória, que se acumulam nos sítios infectados por HSV-1 e agem na

contenção da infecção (Bullido *et al.*, 2008; Rajasagi *et al.*, 2009). Além disso, participam ativamente da resposta contra o HSV-1, por meio da expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$ , características do padrão Th1 de resposta (Heiligenhaus *et al.*, 1999). Além disso, linfócitos T CD4 não específicos para o HSV-1 são capazes de elicitar uma resposta inflamatória na córnea de animais Tg-RAG (contendo somente linfócitos T CD4 específicos para OVA), sugerindo que os mesmos podem se tornar ativados somente com estímulos de citocinas pró-inflamatórias presentes na córnea (Gangappa, Deshpande e Rouse, 2000). Ainda, em modelos de infecção vaginal por HSV-1, os linfócitos T CD4 exercem papel fundamental na eliminação de vírus em gânglios e medula infectados, através da secreção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Johnson, Chu e Milligan, 2008). Alguns trabalhos também sugerem a regulação da resposta inflamatória em estágios tardios da infecção, nos quais os linfócitos T CD4 produzem IL-4 e IL-5, além de IFN- $\gamma$  (Heiligenhaus *et al.*, 1999). As células mais estudadas na infecção por HSV-1 são os linfócitos T CD8, os quais são detectados em gânglios trigeminiais infectados aproximadamente no 6 dpi, e se acumulam até o 8 dpi, culminando na completa eliminação de vírus ativos e o estabelecimento de latência (Liu *et al.*, 1996; Divito, Cherpes e Hendricks, 2006). No modelo de infecção pericutânea, precursores naives que dão origem a linfócitos CD8 específicos para HSV-1, são recrutados da circulação já nos 4 primeiros dias após a inoculação (Stock *et al.*, 2011). Entretanto, seu recrutamento na pele é tardio e o linfócito não consegue combater a passagem de vírus das células epiteliais para neurônios (Wakimk *et al.*, 2008). Na córnea de camundongos C57BL/6 infectados por HSV-1, somente 19 epítomos são reconhecidos por linfócitos T CD8, e cerca de metade destas células é específica para o epítomo gB<sub>498-505</sub> (Sheridan *et al.*, 2009; St Leger e Hendricks, 2011). O mecanismo de ação destes linfócitos compreendem duas atividades principais: a atividade citolítica, mediada por CTLs, e a de produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que controlam a replicação viral sem levar os neurônios à apoptose (Divito, Cherpes e Hendricks, 2006)( Jiang *et al.*, 2010). Na latência, o infiltrado de CD8 permanece, e é capaz de impedir a reativação de

neurônios do gânglio trigeminal de camundongos infectados por HSV-1, por meio da produção acentuada de IFN- $\gamma$  (Liu, Van Rooijen e Tracey, 2000; Liu *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2003). Em gânglios geniculados, vestibulares e trigeminais de humanos também é possível detectar a presença do infiltrado de células CD8 (Verjans *et al.*, 2007; Arbusow *et al.*, 2010). Tais fatos, além de outras evidências mostrando a importância da inflamação na infecção por HSV-1, levantam a hipótese que a hipernocicepção observada no modelo de dor pós-herpética se deve à inflamação e ação persistente de células e mediadores do Sistema Imune, que agem de maneira ainda desconhecida nos neurônios, culminando em sua hiperexcitabilidade.

## ***2 Objetivos***

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da resposta imune inflamatória em gânglios da raiz dorsal e medula na gênese e manutenção da hiperalgesia herpética e neuralgia pós-herpética induzida pelo HSV-1

## 2.2 Objetivos específicos

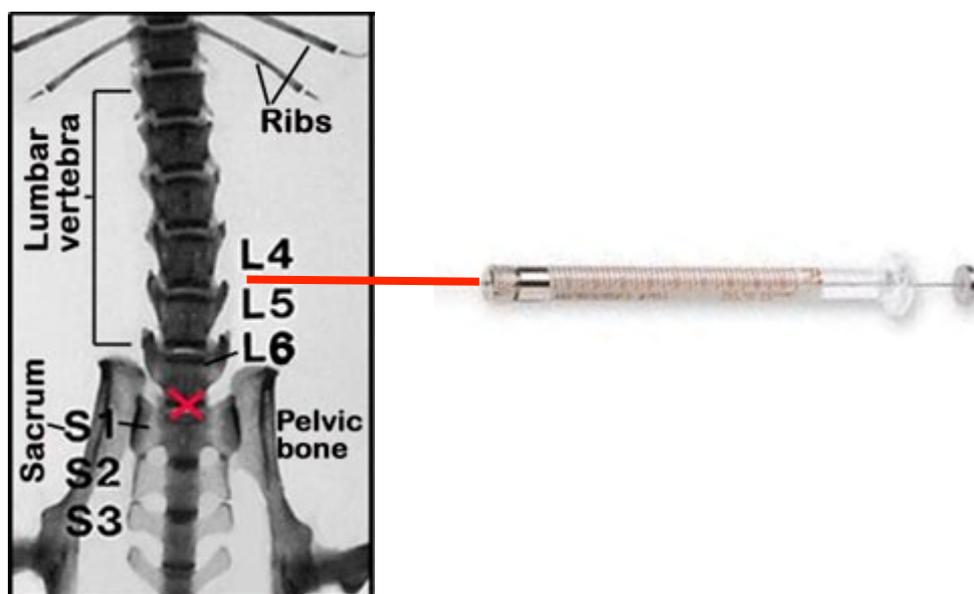
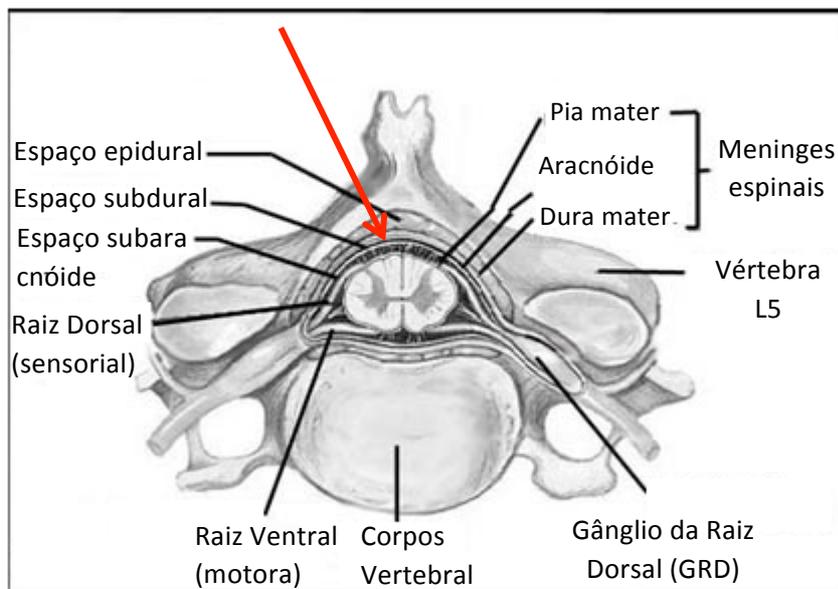
- 1) Caracterizar o modelo de hipernocicepção herpética e pós-herpética (NPH).
- 2) Caracterizar o efeito de drogas analgésicas nas duas fases do modelo, diferenciando o efeito na hiperalgesia herpética e na neuralgia pós-herpética (NPH).
- 3) Avaliar o papel da inflamação na hiperalgesia herpética e na neuralgia pós-herpética.
- 4) Avaliar a ativação temporal de células satélites do GRD na hiperalgesia herpética e na neuralgia pós-herpética.
- 5) Avaliar o papel do reconhecimento viral pelos TLRs (TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9) no desenvolvimento da hiperalgesia herpética.
- 6) Avaliar a participação dos mediador inflamatório TNF- $\alpha$  produzido após o reconhecimento viral, na gênese e desenvolvimento da hiperalgesia herpética.
- 8) Avaliar a participação dos neutrófilos e macrófagos no desenvolvimento da hiperalgesia herpética e na neuralgia pós-herpética.
- 9) Avaliar a participação temporal dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos GRDs.
- 10) Avaliar a produção e participação da COX2/PGE<sub>2</sub> no desenvolvimento da hiperalgesia herpética e na neuralgia pós-herpética.

### ***3 Material e Métodos***

### 3.1 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: morfina (agonista de receptores opióides), dexametasona (corticoesteróide – anti-inflamatório), indometacina (inibidor da ciclooxigenase – COX); Infliximab (anticorpo monoclonal inibidor do TNF- $\alpha$ ); fluorocitrato (inibidor da enzima aconitase, utilizado como ferramenta farmacológica de inibição da ativação glial), gabapentina (anticonvulsivante, análogo sintético do GABA), amitriptilina (antidepressivo tricíclico), xilocaína (anestésico local) e fucoidina (inibidor da L-selectina, bloqueia o processo de rolamento no endotélio vascular). Dexametasona, indometacina, RS504393 e amitriptilina foram administrados pela via intraperitoneal; a gabapentina foi administrada pela via oral; a xilocaína foi administrada pela via subcutânea. A fucoidina foi administrada pela via intravenosa. As drogas infliximab, fluorocitrato e, em alguns casos, dexametasona e indometacina foram administradas pela via intra-tecal. A administração intra-tecal foi realizada no espaço intravertebral L4-L5, próxima aos GRDs infectados, por um técnico experiente na realização do procedimento. Os animais foram previamente tricotomizados na região dorsal para melhor observação das projeções pélvicas, as quais foram utilizadas como marco anatômico para localização do espaço intravertebral L4-L5. Durante todo o procedimento, os animais estavam sob efeito da anestesia com isoflurano (2%/O<sub>2</sub>). Logo após a flexão da espinal lombar dos animais, em posição prona, foi realizada a administração do fármaco em um volume de 5 $\mu$ l com uma seringa de 50 $\mu$ l e agulha 30G (Hamilton, Reno, NV, USA) (Araujo et al, 2006; Chen et al, 2004; Cheng et al, 2012). Como forma de avaliar o sucesso da administração, utiliza-se a observação do movimento reflexo dos membros inferiores (*flinch* ou *dragging*) ou da cauda (Figura 1). Através deste tratamento, é possível realizar uma intervenção farmacológica local, diretamente na medula espinal e nos GRDs, com pequenas quantidades de fármaco e reduzidos efeitos sistêmicos.

## Secção Transversal da Região Lombossacral



**Figura 1.** Diagrama esquemático da coluna vertebral (L=lombar, S=Sacral) e do procedimento de administração de drogas pela via intratecal. Seta vermelha indica o local da injeção. Adaptado de Mogil1 projetct protocol 18/12/13 ([http://phenome.jax.org/db/q?rtn=projects/docstatic&doc=Mogil1/Mogil1\\_Protocol#Figure1](http://phenome.jax.org/db/q?rtn=projects/docstatic&doc=Mogil1/Mogil1_Protocol#Figure1)).

### 3.2 Animais

Nos experimentos, foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, machos e fêmeas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto. Além destes, foram utilizados camundongos geneticamente deficientes para o receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1<sup>-/-</sup>), para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>), para TLR2

(TLR2<sup>-/-</sup>), para TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>), para TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>), para TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>), para o receptor de IL-1 (IL-1R<sup>-/-</sup>), os quais foram comparados à sua linhagem controle (C57BL/6), provenientes do biotério do Departamento de Genética e do Departamento de Imunologia da USP, Campus de Ribeirão Preto. Foram utilizados, no mínimo, cinco (5) animais por grupo experimental. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

### **3.3 Amostras virais**

#### **3.3.1 Vírus**

Nos procedimentos de inoculação, o vírus HSV-1, isolado de um paciente com herpes orolabial atendido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP), foi utilizado. Este vírus é parte do banco de vírus do Centro de Pesquisa em Virologia (CPV) – FMRP – USP.

#### **3.3.2 Preparo das sementes virais**

Os vírus foram propagados em células humanas epiteliais alveolares basais de adenocarcinoma (A549) e células Vero, as quais foram cultivadas em meio DMEM completo. No momento em que as células atingiram monoconfluência de 80%, o meio foi retirado, foram realizadas 2 lavagens com PBS, e o vírus foi inoculado diretamente sobre a monocamada celular. Após observação de 80% de efeito citopático nas células, o sobrenadante foi retirado, aliquotado e congelado a -70°C, para uso em passagens subsequentes ou para a realização de titulação viral.

#### **3.3.3 Titulação viral**

Os vírus obtidos nas passagens foram titulados para determinação da concentração viral utilizada nos experimentos com camundongos. Suspensões do vírus foram preparadas a partir da diluição 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-10</sup>, em PBS estéril, e foram adicionadas aos poços de placas contendo células Vero. Após 1:30 h, o inóculo foi retirado e o meio overlay adicionado. As placas foram incubadas a 37°C, por 1 a 2 dias, para observação dos efeitos citopáticos e

formação de placas de lise nas culturas. Após esse período, os poços foram revelados com solução de preto de naftaleno a 10% (5% de ácido acético), e as placas foram contadas para cálculo das PFUs (Plaque Forming Unities) dos vírus.

### **3.4 Modelo de hiperalgesia herpética**

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2%/O<sub>2</sub>) e depilados com auxílio de depilador químico (Veet) na região dorsal e patas traseiras. Três dias após a depilação, os animais foram anestesiados com a associação cetamina/xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente) e foi feita escarificação em uma área de 25 mm<sup>2</sup> na coxa direita dos animais, com auxílio de lixa. A coxa esquerda não foi escarificada e constituiu o controle contralateral. Após este procedimento, 20 µl de solução contendo 2x10<sup>5</sup> PFU do HSV-1 foram inoculados diretamente sobre a escara do animal. Para caracterizar o modelo de hiperalgesia herpética e pós-herpética, a nocicepção mecânica de animais infectados foi avaliada. Os animais foram observados diariamente para avaliação da hipernocicepção, sendo acompanhados até o 40º dpi. Em alguns experimentos, o vírus HSV-1 inativado (a 60°C, por 60 minutos) foi utilizado como controle, sendo inoculado da mesma forma que o vírus ativo. Também foram utilizados camundongos não infectados (naive) como controles negativos. Estes parâmetros foram avaliados em animais wild-type (WT) e, posteriormente, após caracterização do modelo, em animais tratados com as drogas citadas no item 3.1 e nos animais geneticamente modificados citados no item 3.2.

### **3.5 Avaliação da nocicepção mecânica - Teste com Von Frey de filamento**

A avaliação da hipernocicepção mecânica em camundongos foi realizada como previamente descrito (Cunha et al., 2004). Uma série de filamentos de Von Frey (Stoelting, Chicago, IL, USA) com aumento da rigidez (0,008 a 2 g de força) foi aplicada no centro da pata posterior direita. O estímulo foi interrompido após a observação da resposta nociceptiva, caracterizada por flexão seguida de retirada da pata, o “flinch”. Cada um dos filamentos de von Frey foi aplicado uma vez por aproximadamente 3 seg. O primeiro filamento testado foi o

de 3,22 que corresponde a 0,16 da força (g) o qual está no meio da série de filamentos. O filamento de menor força capaz de induzir resposta foi determinado como sendo o limiar mecânico (g). Os resultados foram expressos como limiar de retirada da pata (g).

### **3.6 Quantificação da carga viral em GRDs**

A quantificação absoluta da carga viral foi feita por meio de PCR em tempo real. Brevemente, os camundongos infectados ou não foram anestesiados e submetidos à eutanásia por exsanguinação seguida de perfusão com solução PBS. Os gânglios da raiz dorsal L2, L3, L4, L5 e L6 ipsilaterais à infecção, bem como medula espinhal e gânglios da raiz dorsal contralaterais à infecção foram removidos e homogeneizados em água estéril, livre de DNA e RNA exógeno e de DNases (Sigma). A extração do DNA viral foi feita mediante uso de kit comercial (Qiagen), e a carga viral foi determinada por quantificação absoluta, utilizando como padrão de referência uma curva de plasmídeo contendo o gene da polimerase do HSV-1. Para tal, foi realizada uma diluição seriada (ordem de 10) dos plasmídeos recombinantes, e uma curva padrão foi montada, com 1 cópia viral por  $\mu\text{l}$  até  $1 \times 10^8$  cópias virais por  $\mu\text{l}$ . O cálculo para expressão dos resultados como número de cópias do gene da polimerase do HSV-1 por GRD foi, então, realizado. O material genômico extraído dos GRDs foi amplificado utilizando os iniciadores Sense: 5'-GCTCGAGTGCGAAAAACGTTC-3' e antisense: 5'-TGCGGTTGATAAACGCGCAGT-3', específicos para o gene da polimerase do HSV-1, e o sistema Applied Biosystem 7500 utilizando Syber Green como indicador de amplificação por fluorescência. Os plasmídeos recombinantes que foram utilizados na curva padrão foram construídos e padronizados previamente pelo grupo do Prof. Benedito Antônio Lopes da Fonseca a partir de ensaios já descritos na literatura (Ramaswamy M, 2005).

### **3.7 Análise da presença de células T CD8<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup>high CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>), T CD4<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup>high CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>), Neutrófilos (CD45<sup>+</sup>high GR-1/Ly-6G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>), macrófagos/monócitos (CD45<sup>+</sup>high F4/80<sup>+</sup> GR-1/Ly-6G<sup>-</sup>) por citometria de fluxo (FACS)**

Para a caracterização fenotípica das células infiltradas nos GRDs, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com células isoladas de um pool de 3 GRDs da região lombar (L4, L5 e L6) e fragmento da medula espinal correspondente, segundo método já padronizado em nosso laboratório. Para tal, em um tubo,  $5 \times 10^5$  células isoladas foram suspensas com o anticorpo anti-Fc, para evitar ligação inespecífica dos anticorpos monoclonais. Em seguida, as suspensões celulares foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (anti-CD45, anti-Gr1/Ly/6G, anti-F4/80, anti-CD8 e anti-CD4) ou controles isotípicos específicos. Após lavagem das células, estas foram fixadas em uma solução de formaldeído a 1%. As amostras foram adquiridas em um citômetro de fluxo FACS CANTO<sup>TM</sup> (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ). A análise da aquisição foi realizada utilizando o software FlowJow. Para controle positivo de detecção dos tipos celulares do sistema imune, foram utilizadas células obtidas dos linfonodos inguinais de camundongos infectados.

### **3.8 Análise de expressão relativa de mRNA**

A expressão relativa de mRNA dos genes que codificam GFAP, TNF- $\alpha$ , e COX-2 nos GRDs dos grupos experimentais foi realizada seguindo protocolos já estabelecidos em nosso laboratório. Brevemente, o RNA total das células dos GRDs isolados foi extraído e purificado utilizando o método de fenol-clorofórmio TRIZOL (Invitrogen). O RNA extraído foi quantificado e a qualidade da extração aferida utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop observando-se as razões dos comprimentos de onda 260/230 e 260/280. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do mRNA extraído, através de transcrição reversa (RT-PCR) com oligo d(T)16 (SIGMA). O cDNA sintetizado foi utilizado para a

quantificação da expressão dos genes de interesse utilizando iniciadores específicos estabelecidos previamente no laboratório e o sistema Applied Biosystem 7500 pelo método de Syber Green. Amostras de RNA sem a transcrição reversa tratadas com RNase foram utilizadas para verificar a ausência de DNAg nas amostras. Para normalização dos resultados, o gene GAPDH de expressão constitutiva foi utilizado. Os resultados foram expressos como alteração da expressão, relativa ao controle não infectado, segundo método de Livak,  $2^{-\Delta CT}$  (LIVAK, KJ, 2001). Os pares de primers utilizados foram:

Tnf sense: 5'- TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA -3'

Tnf antisense: 5'- CTTGATGGTGGTGCATGAGA -3'

Ptgs2 sense: 5'- GTGGAAAACCTCGTCCAGA - 3'

Ptgs antisense: 5'- GCTCGGCTTCCAGTATTGAG - 3'

Gapdh sense: 5' - CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'

Gapdh antisense:5' - CGGCCAAATCCGTTTAC-3'

### **3.9 Quantificação da expressão proteica da COX-2 e GFAP por Western blot**

O homogenato em tampão de lise específico de amostras de GRDs foi utilizado para a quantificação da expressão de COX-2 e GFAP por eletroforese e Imuno Blot. Para a detecção da expressão de COX-2 e GFAP ,os anticorpos primários específicos para ambos foram utilizados e um anticorpo secundário anti-anticorpo primário, segundo protocolo já padronizado no laboratório.

### **3.10 Análise Estatística**

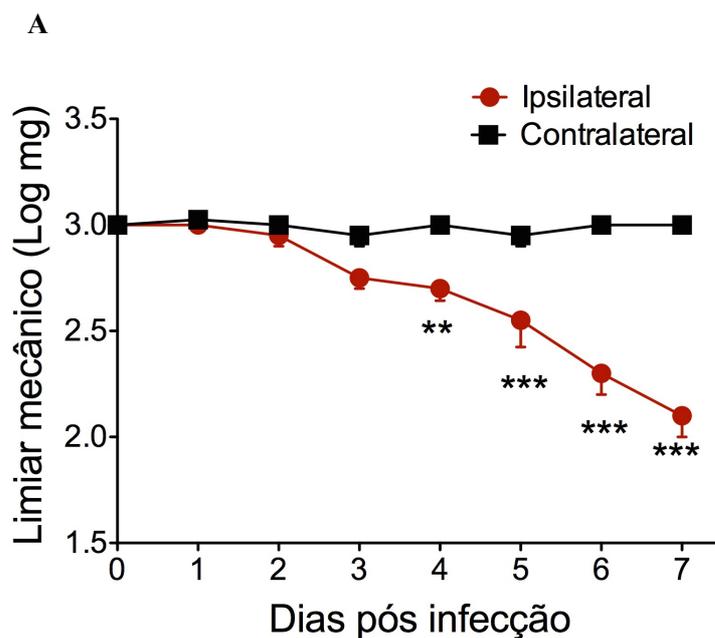
As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo que as diferenças consideradas significativas para valores de  $P < 0,05$ .

## ***4 Resultados***

## **4.1 Caracterização do modelo de hiperalgesia herpética e pós-herpética**

### **4.1.1 Determinação da hiperalgesia herpética em camundongos infectados**

Os estudos de determinação da hiperalgesia herpética foram conduzidos utilizando-se o modelo previamente descrito no projeto. Camundongos BALB/c e C57BL/6 (n=5) foram utilizados nos experimentos. Animais da linhagem BALB/c desenvolveram hiperalgesia herpética (redução significativa no limiar nociceptivo mecânico) a partir do 3º dia pós-infecção (dpi) nas patas ipsilaterais. A redução do limiar nociceptivo mecânico progrediu até o 7º dpi (Figura 2A). Nas patas contralaterais à infecção, não foi observada redução do limiar nociceptivo mecânico, ou seja, a hipernocicepção é dependente da infecção do neurodermatomo correspondente. Em 100% dos animais da linhagem BALB/c, o quadro hiperalgésico agudo é acompanhado pelo surgimento de lesões zoosteriformes no 5º dpi, que acentuam-se até o 8º dpi (Figura 2B).

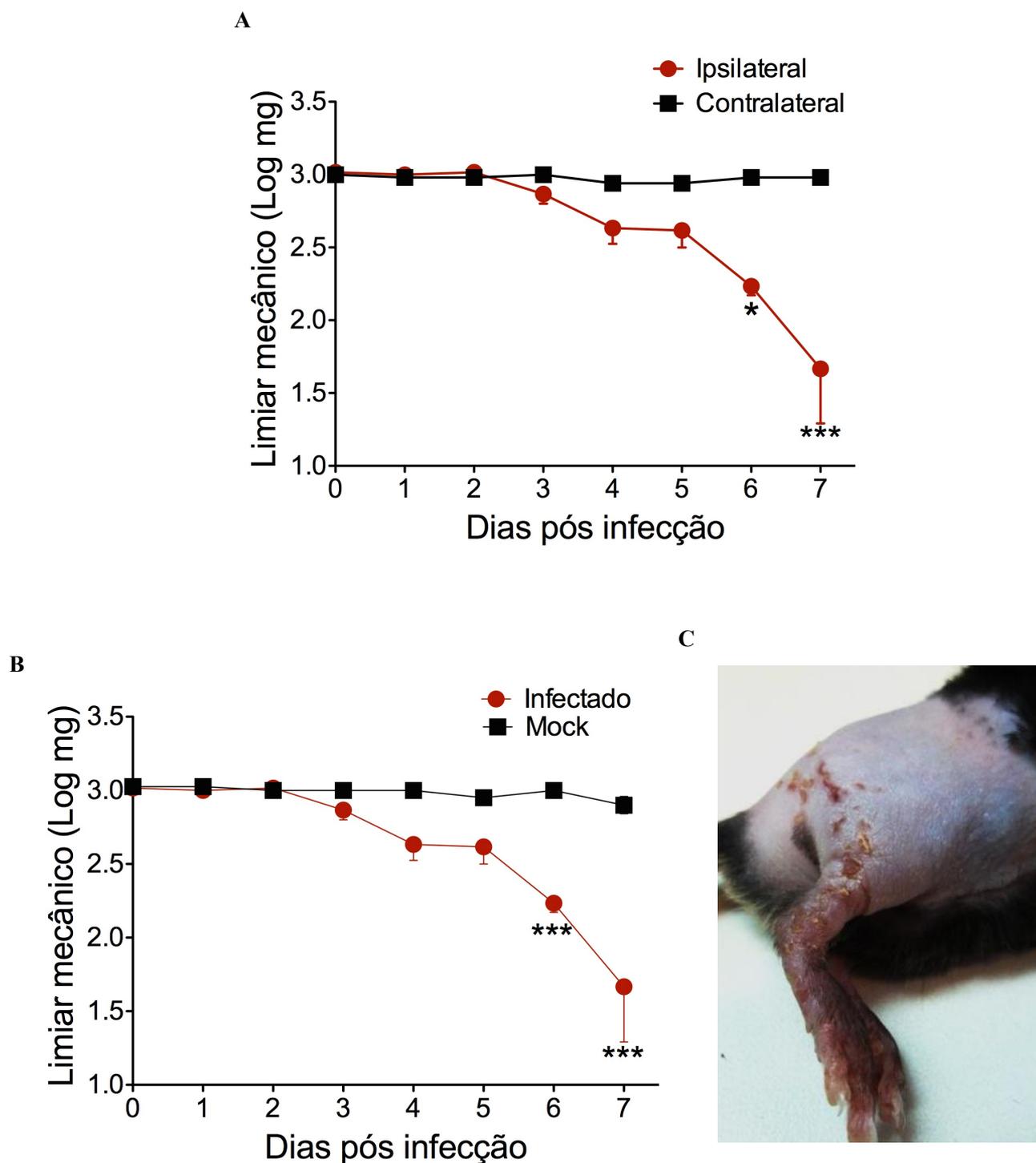


B



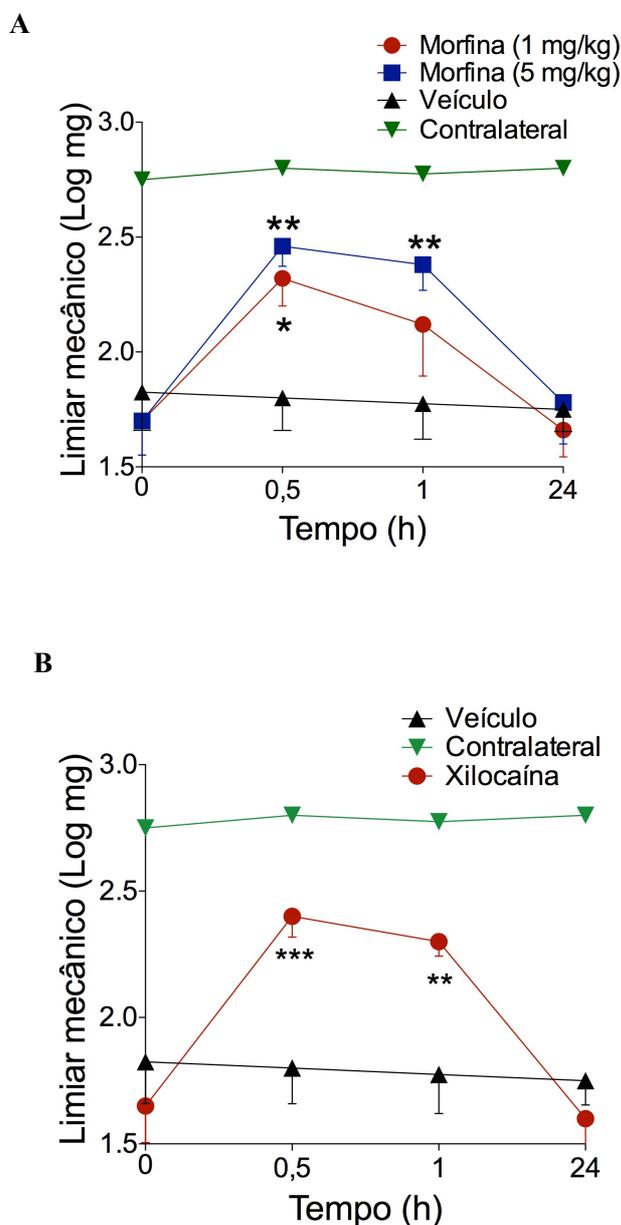
**Figura 2.** A infecção pericutânea por HSV-1 resulta no desenvolvimento de lesão e hiperalgesia em camundongos. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com HSV-1 na coxa direita, e foram observados por até 7 dpi. (A) Avaliação da hipernocicepção mecânica em camundongos da linhagem BALB/c no decurso temporal de 7 dias. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais e contralaterais de animais infectados. (B) Foto representativa da lesão zosteriforme no 7º dpi. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . B = foto representativa da lesão zosteriforme no 8º dpi.

De maneira semelhante, animais da linhagem C57BL/6 desenvolveram hiperalgesia herpética a partir do 3º dia pós-infecção (dpi) nas patas ipsilaterais, que progrediu até o 7º dpi. Não foi observada redução dos limiares nociceptivos nas patas contralaterais destes camundongos (Figura 3A). Animais “mock” não apresentaram redução dos limiares nociceptivos mecânicos, sendo a hiperalgesia herpética diretamente relacionada à infecção ativa pelo HSV-1 (Figura 3B). Em 40% dos animais da linhagem C57BL/6, o quadro hiperalgésico agudo é acompanhado pelo surgimento de lesões zoosteriformes no 5º dpi que acentuam-se até o 8º dpi (Figura 3C).



**Figura 3.** A infecção pericutânea por HSV-1 resulta no desenvolvimento de lesão e hiperalgesia em camundongos. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com HSV-1 na coxa direita, e foram observados por até 7 dpi. (A) Avaliação da hipernocicepção mecânica em camundongos da linhagem C57BL/6 no decorso temporal de 7 dias. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais e contralaterais de animais infectados. (B) limiares mecânicos nociceptivos das patas ipsilaterais de animais infectados e animais mock. (C) Foto representativa da lesão zosteriforme no 7º dpi. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Para avaliação do efeito de drogas analgésicas ou anestésicas na hiperalgesia herpética, camundongos C57BL/6 infectados (7 dpi) foram tratados com as drogas morfina e xilocaína. A morfina é um opióide analgésico, que age ativando receptores opióides, os quais são importantes na regulação da transmissão da nocicepção. O modo de ação proposto para a xilocaína é via inibição não-seletiva de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes em neurônios aferentes, resultando em descarga ectópica reduzida e, conseqüentemente, propagação do sinal reduzida. O tratamento dos animais infectados com morfina (1 e 5 mg/kg) e xilocaína (20 ng/10 ul/pata) resultou na redução significativa do comportamento de hiperalgesia, quando comparados a animais do grupo veículo (Figuras 4A e B). A ação analgésica da morfina é dose-dependente, visto que a redução da hiperalgesia observada nos camundongos que receberam a dose de 5 mg/kg foi mais duradoura, quando comparados aos animais que receberam o tratamento com a dose de 1mg/kg. Tais reduções, observadas para a morfina (ambas doses) e xilocaína são transientes, não sendo mais observadas 24 h após o tratamento.

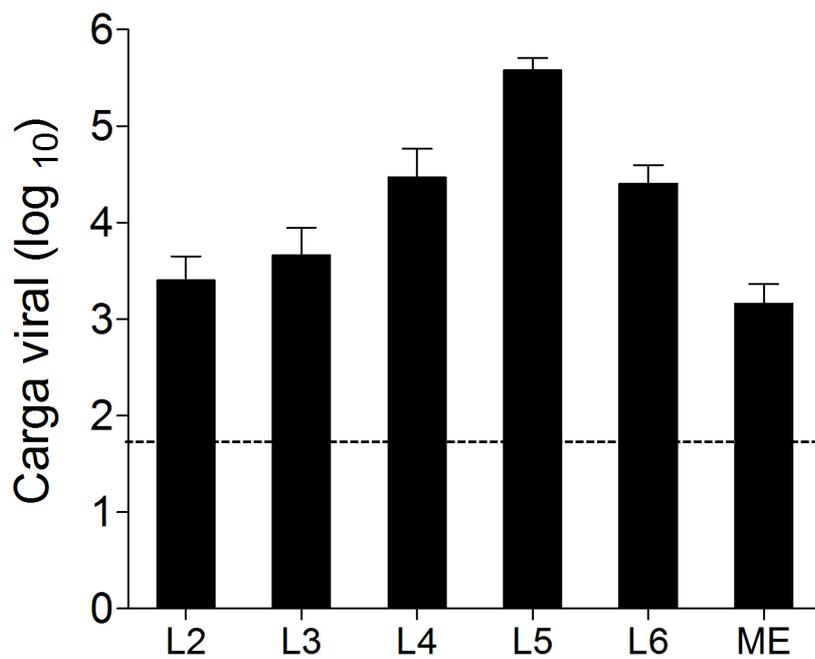


**Figura 4.** Drogas analgésicas/anestésicas são eficazes durante a hiperalgesia herpética. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com HSV-1 e, no 7 dpi, foram tratados com morfina ou xilocaína (20 ng/pata). A avaliação dos limiares nociceptivos mecânicos foi realizada 0,5, 1 ou 24 h após os tratamentos. (A) Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de camundongos tratados com morfina (1 e 5 mg/kg). (B) Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de camundongos tratados com xilocaína (20 ng/pata). Os valores de patas contralaterais referem-se à média dos valores obtidos de todos os animais avaliados. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.1.2 Determinação da carga viral nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) de camundongos infectados**

Nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) encontram-se os corpos neuronais dos nociceptores responsáveis pela percepção de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Os neurônios do GRD fazem sinapses com neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula, e são, portanto, responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva ao Sistema Nervoso Central. Em modelos de hiperalgesia estéril, alterações nas células que compõem os GRDs têm sido associadas com a manutenção da nocicepção (neuralgia crônica) (Liu et al, 2012). Sendo o HSV-1 capaz de alcançar os corpos neuronais localizados nos GRDs através de transporte retrógrado pelo nervo atingido, investiguou-se a possível relação entre a infecção dos neurônios presentes nos GRDs e o desenvolvimento da hipersensibilidade herpética.

Para isto, determinou-se a carga viral nos GRDs de camundongos infectados. Animais da linhagem C57BL/6 foram infectados (n=5), conforme anteriormente descrito. Em camundongos C57BL/6, foi observada a presença de cópias virais em todos os gânglios analisados (L2 a L6) e na medula. No entanto, a maior quantidade de cópias virais foi observada nos gânglios L4, L5 e L6 (Figura 5).



**Figura 5.** O HSV-1 é capaz de alcançar os GRDs de camundongos infectados. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados e, no 7 dpi, os GRDs L2, L3, L4, L5 e L6 foram coletados para quantificação viral absoluta por qPCR. Carga viral dos GRDs ipsilaterais e medula espinal de camundongos infectados. A linha horizontal delimita o background da reação. ME= medula espinal.

## **4.2 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento da hiperalgesia herpética**

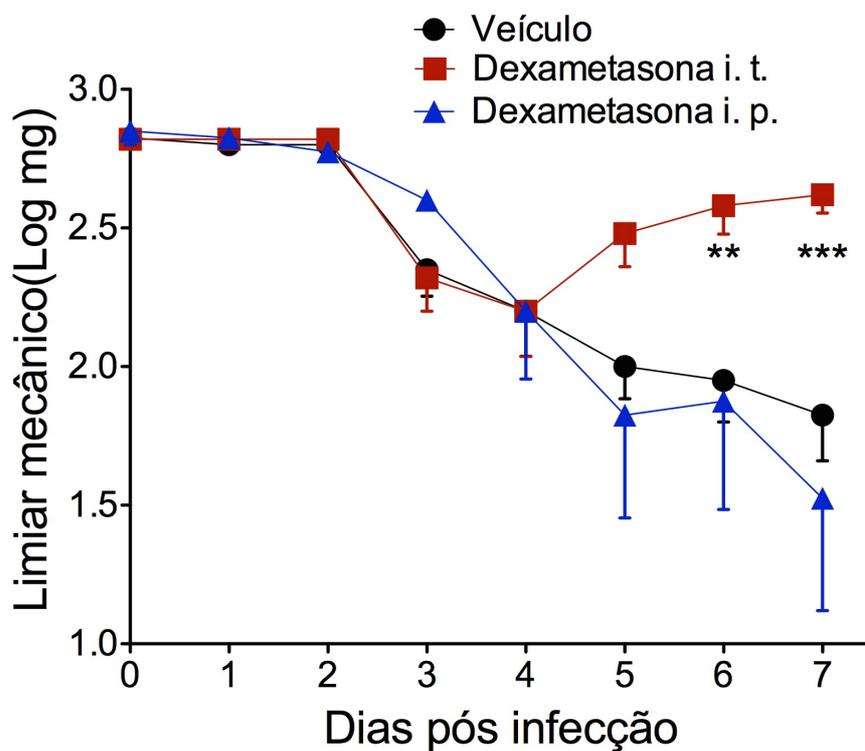
### **4.2.1. Papel da inflamação nos GRDs e medula na manutenção da hiperalgesia herpética**

Inicialmente, a investigação do papel da inflamação na gênese e manutenção da hiperalgesia herpética foi realizada através de abordagem farmacológica, utilizando, para tal, o tratamento de animais infectados com o anti-inflamatório esteroide dexametasona. Brevemente, animais infectados com o HSV-1 foram tratados diariamente, a partir do 2º dpi (primeiro dia antes do desenvolvimento da hiperalgesia herpética), com dexametasona (5ug/5ul/animal – via intratecal). Cabe ressaltar que nenhum dos animais tratados por via intratecal com dexametasona, ou com solução fisiológica 0.9%, apresentou comprometimento locomotor, demonstrando que a técnica não promove alteração funcional no animal.

Para avaliar se os efeitos observados não seriam resultado de passagem do fármaco da região de administração para a circulação sistêmica, outro grupo de animais infectados foi tratado diariamente com a mesma quantidade do fármaco (5ug/animal; correspondente à dose de 0.25mg/Kg) por via intraperitoneal. Este tratamento não reduziu a hiperalgesia herpética, tal qual observado para o tratamento intratecal (Figura 6). Cabe ressaltar que esta é uma dose baixa de dexametasona, a qual não possui efeitos anti-inflamatórios quando administrada sistemicamente.

Observou-se que o tratamento por via intratecal não foi capaz de impedir o surgimento do quadro de hipersensibilidade nociceptiva. No entanto, a partir do 5º dpi, os animais tratados com dexametasona pela via intratecal começaram a apresentar aumento dos valores de limiares mecânicos nociceptivos, o qual progrediu até o 7 dpi. Animais submetidos ao tratamento com a mesma quantidade da droga, porém pela via intraperitoneal, não apresentaram aumento dos valores de limiares mecânicos nociceptivos significativos. Isto sugere que: 1- a gênese da hiperalgesia herpética não é dependente de um processo

inflamatório nos GRDs/medula; 2- a resposta inflamatória nestes tecidos passa a ser importante para a manutenção da hiperalgesia herpética após o 5dpi (Figura 6).



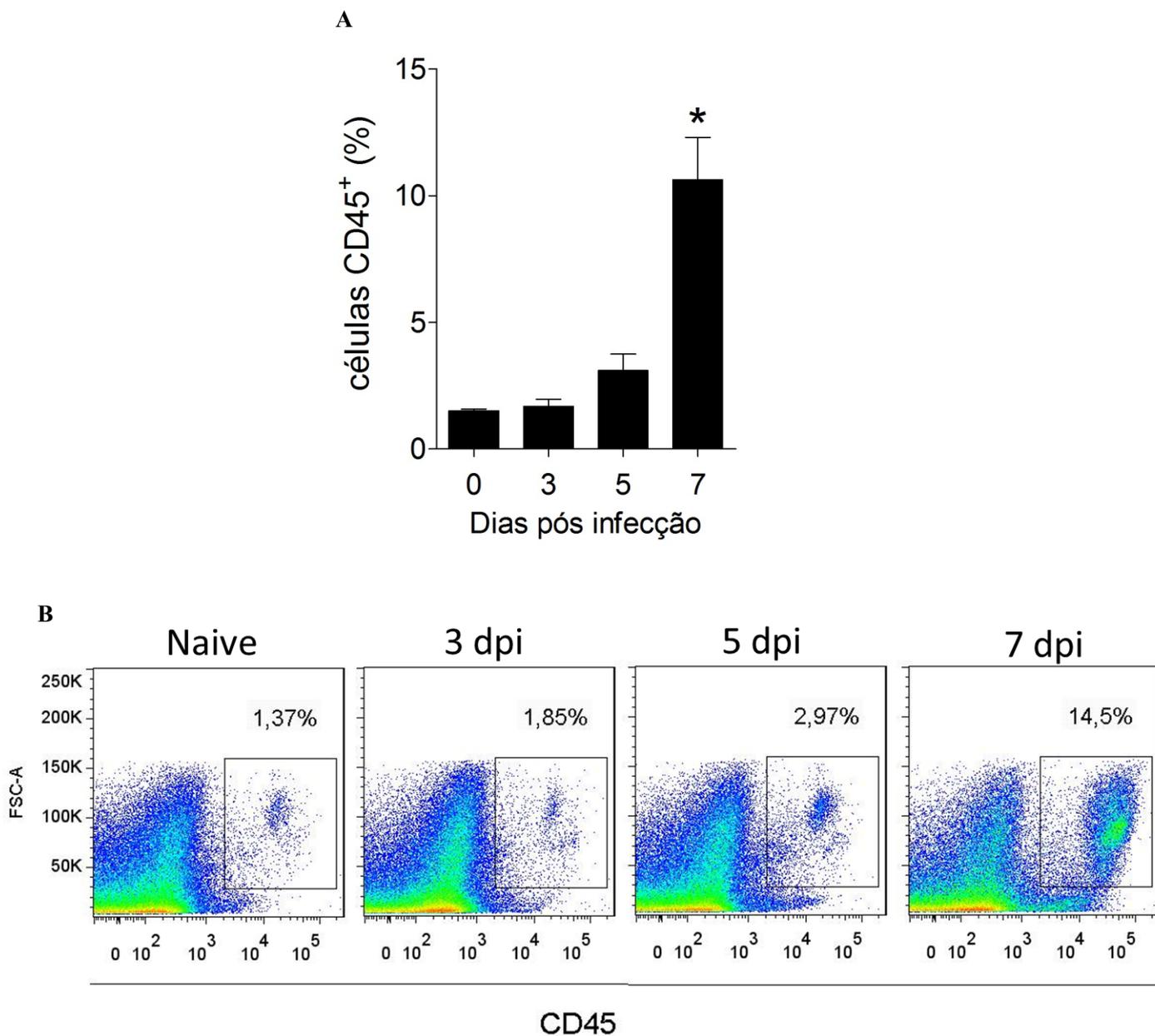
**Figura 6.** A inflamação do sistema nervoso contribui para a manutenção da hiperalgesia herpética. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados e tratados com a droga dexametasona (5 $\mu$ g, pelas vias intratecal ou intraperitoneal) do 2 ao 7 dpi. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de camundongos tratados ou veículo. i. t. =intratecal; i. p. = intraperitoneal. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### **4.2.2 Caracterização do perfil temporal de infiltração de células do sistema imune nos GRDs e na medula durante a infecção por HSV-1**

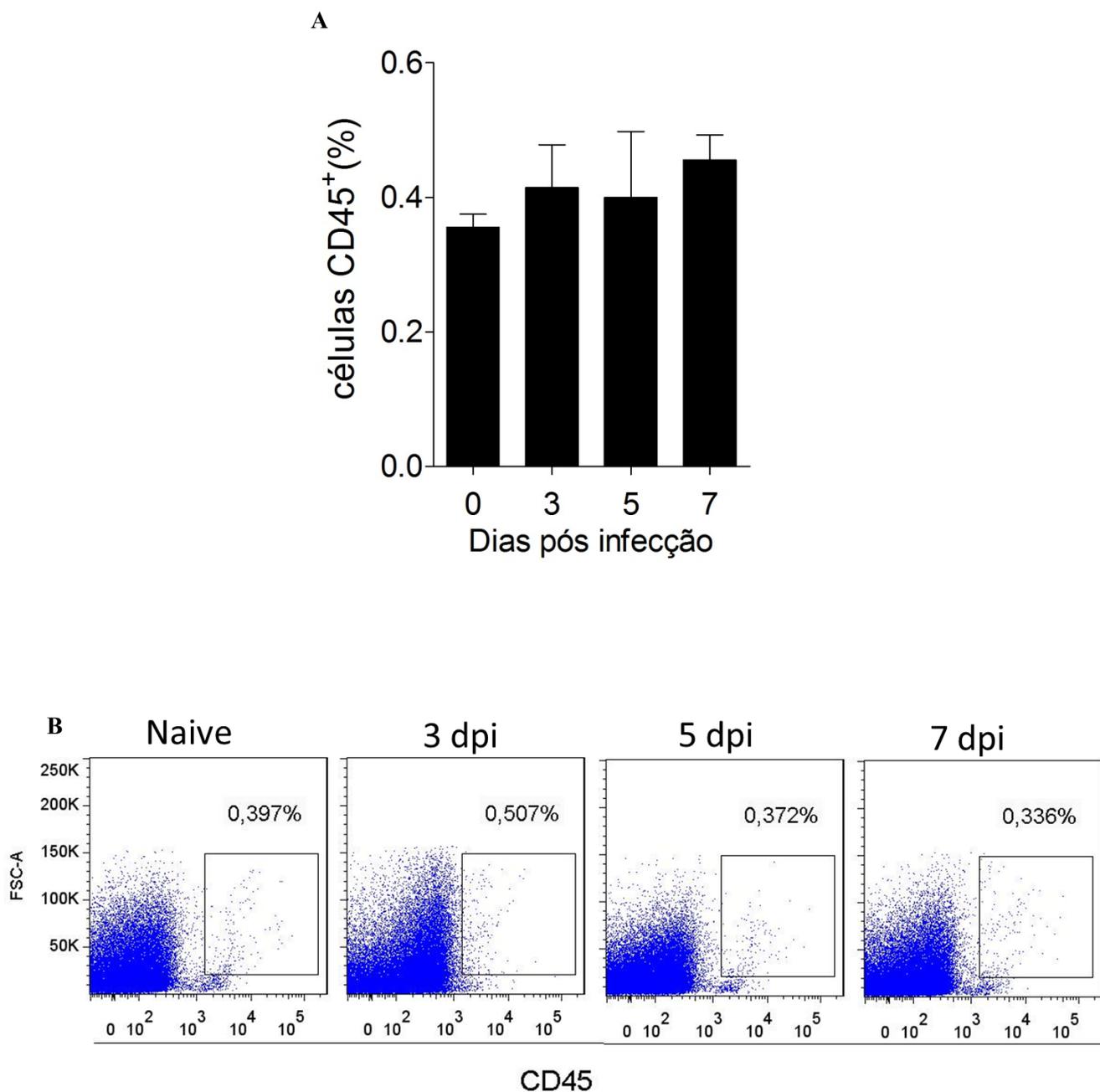
Para caracterizar o perfil temporal do infiltrado celular inflamatório presente nos GRDs e na medula espinal de animais infectados, experimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando estes tecidos, coletados nos dias 3, 5 e 7 pós infecção.

A presença de leucócitos (células CD45+) não foi observada nos GRDs de animais infectados na fase inicial da hiperalgisia herpética (3dpi). Porém, observou-se o surgimento de um infiltrado de células CD45+ (leucócitos) neste local a partir do 5 dpi, o qual tornou-se intenso no 7º dpi (Figura 7 A e B), corroborando os dados de que a resposta inflamatória passa a ser importante nestes tecidos a partir do 5ºdpi. A migração de células do sistema imune para os GRDs acontece, portanto, em uma fase mais tardia à infecção, confirmando os resultados do papel tardio da inflamação nestes tecidos para a manutenção da hiperalgisia herpética.

Interessantemente, não foi observado um infiltrado significativo de leucócitos na medula espinal até o 7ºdpi, o que sugere que, neste período, os GRDs, e não a medula, são o principal sítio inflamatório da infecção, e conseqüentemente, da manutenção da hiperalgisia herpética (Figuras 8 A e B).



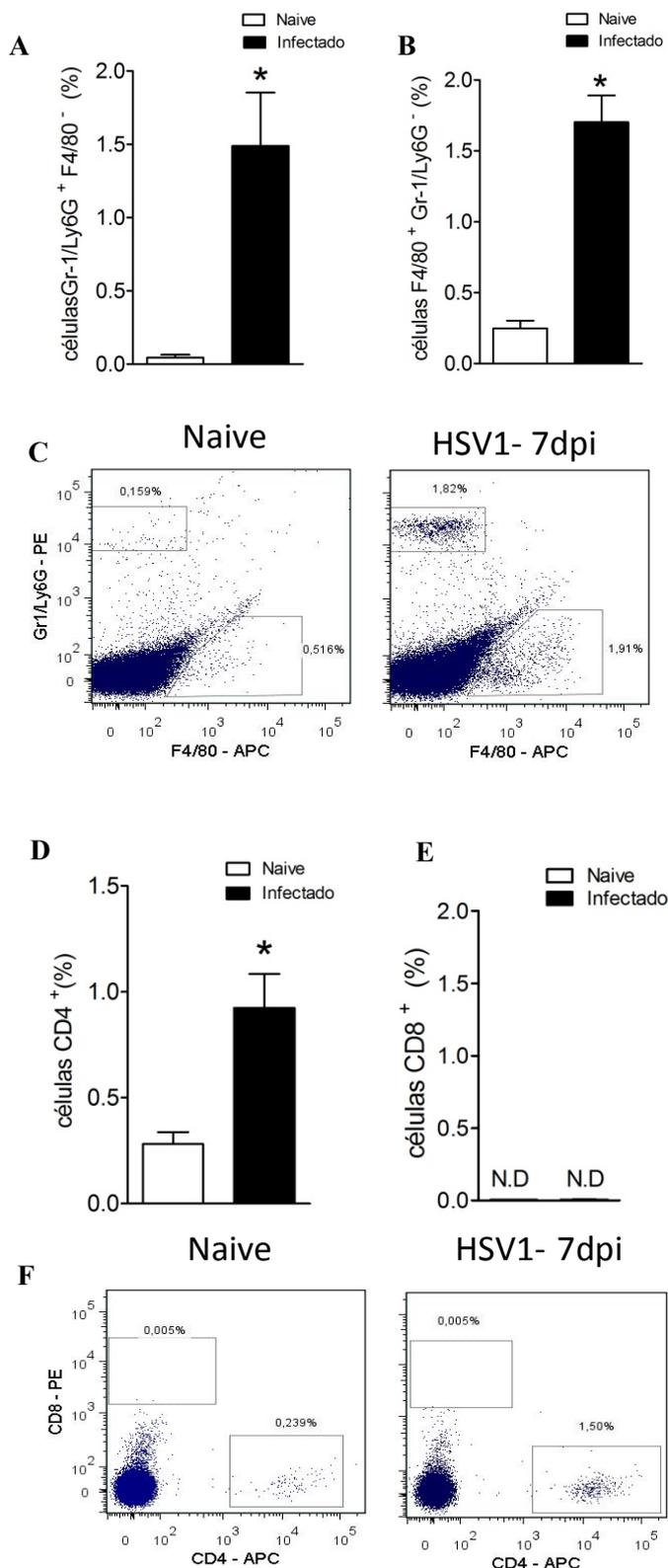
**Figura 7.** Leucócitos migram aos GRDs infectados a partir do 5 dpi. Camundongos C57BL/6 foram infectados os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados no 3, 5 e 7 dpi. Avaliação da migração de leucócitos (células CD45+) aos GRDs de animais infectados com HSV-1 após 0, 3, 5 e 7 dpi. A = representação gráfica da frequência de células CD45+ nos GRDs dos animais infectados. B = *dotplot* representativo da migração de leucócitos aos GRDs. \* =  $p < 0,001$



**Figura 8.** Leucócitos não migram à medula espinal de animais infectados por HSV-1. Camundongos C57BL/6 foram infectados e fragmentos da medula espinal foram coletados no 3, 5 e 7 dpi. Avaliação da migração de leucócitos (células CD45<sup>+</sup>) à medula espinal de animais infectados com HSV-1 após 0, 3, 5 e 7 dpi. A = representação gráfica da frequência de células CD45<sup>+</sup> na medula espinal dos animais infectados. B = *Dot plot* representativo da migração de leucócitos à medula espinal.

### **4.2.3 Caracterização do perfil de leucócitos que infiltram os GRDs durante a infecção herpética**

Através da marcação específica dos subtipos de leucócitos que migram aos GRDs, observou-se um intenso infiltrado de neutrófilos (células Gr-1/Ly6-G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>), macrófagos (células F4/80<sup>+</sup> Gr-1/Ly6-G<sup>-</sup>) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos GRDs de animais infectados no 7<sup>o</sup> dpi, mas não de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 9). Ademais, a presença de fagócitos e linfócitos não foi detectada na medula espinal de animais infectados.

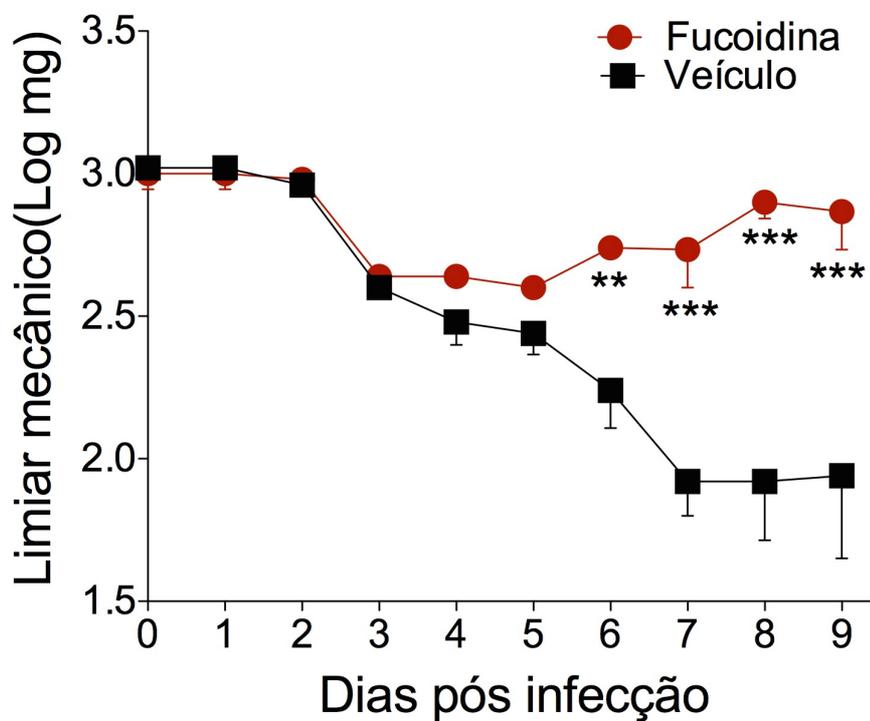


**Figura 9.** Análise do tipo de leucócitos que infiltraram os GRDs de animais infectados. (A) Percentual de Neutrófilos que infiltraram os GRDs de animais infectados com HSV-1 7dpi. (B) Percentual de Monócitos/Macrófagos que infiltraram nos GRDs de animais infectados com HSV-1 7dpi. (C) *Dot Plot* representativo do Infiltrado de Neutrófilos (células GR1/Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>) e Monócitos/Macrófagos (células GR1/Ly6G<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup>) em GRDs. (D) Percentual de Linfócitos T CD4 que infiltraram nos GRDs de animais infectados com HSV-1 7dpi. (E) Percentual de Linfócitos T CD8 que infiltraram nos GRDs de animais infectados com HSV-1 7dpi. (F) *Dot Plot* Representativo do Infiltrado de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos GRDs. \* = p<0,001.

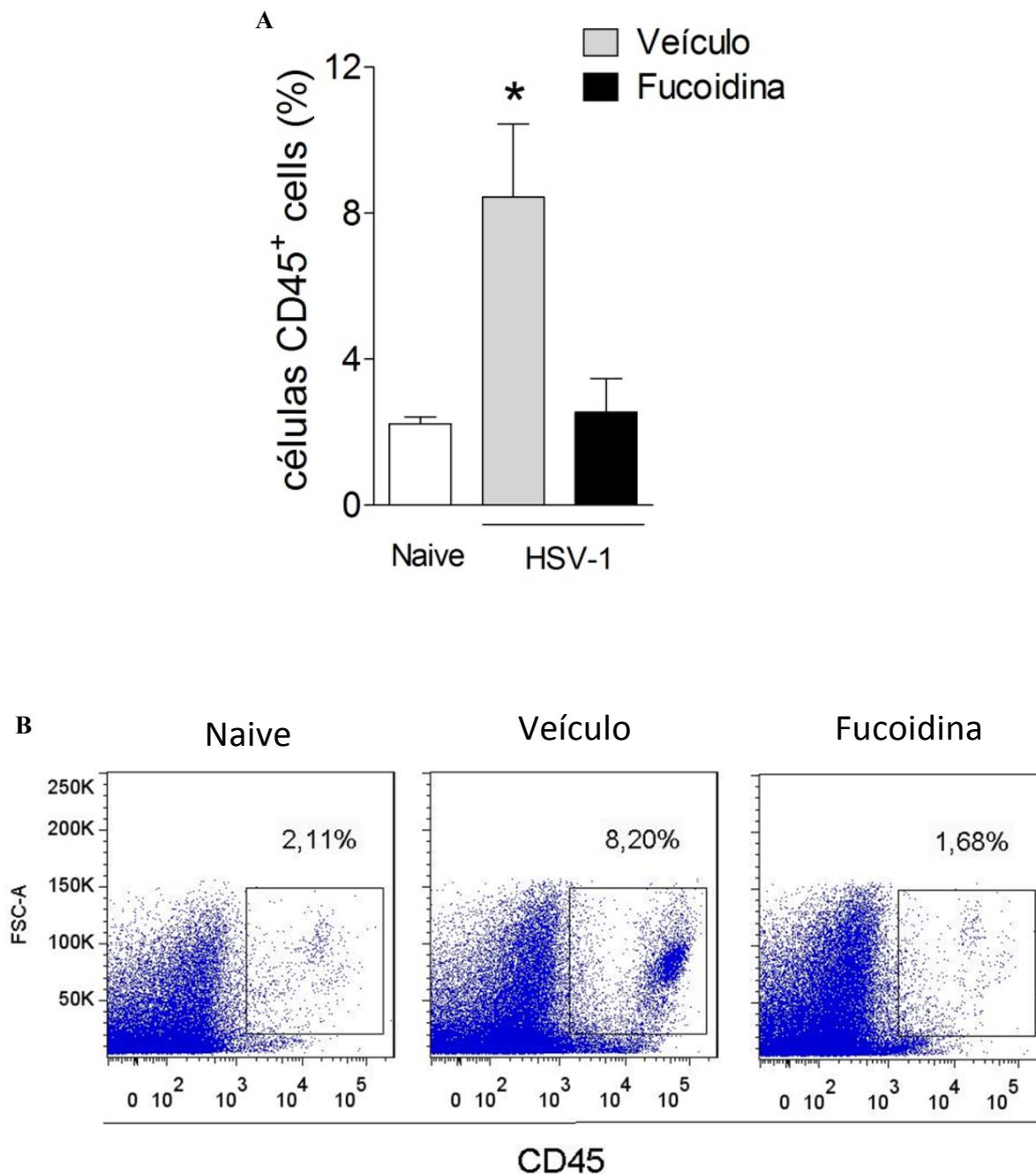
#### **4.2.4 Leucócitos que infiltram nos GRDs tem um papel importante na amplificação, mas não na gênese da hiperalgisia herpética**

Para a avaliação do papel das células do sistema imune no processo de hiperalgisia herpética, camundongos foram infectados, conforme previamente descrito, e divididos em dois grupos: animais tratados com Fucoidina (n=5/grupo; 20mg/Kg, via intravenosa) a partir do 2º até o 9º dpi, ou animais tratados com salina 0.9% (grupo Veículo). Conforme anteriormente mencionado, a Fucoidina é um potente inibidor da migração de leucócitos.

Os animais tratados apresentaram o início do quadro hiperalgésico no 3º dpi, de forma semelhante aos não tratados, o qual perdurou até o 5º dpi. No entanto, a partir deste ponto, foi possível observar redução significativa da hiperalgisia até o 9 dpi (Figura 10). A eficácia da Fucoidina em inibir o recrutamento de células do sistema imune para os GRDs foi comprovada por citometria de fluxo no 7dpi (Figura 11 A e B). Logo, a infiltração de células do sistema imune nos GRDs revelou-se importante na manutenção da hiperalgisia herpética, mas não na sua gênese.

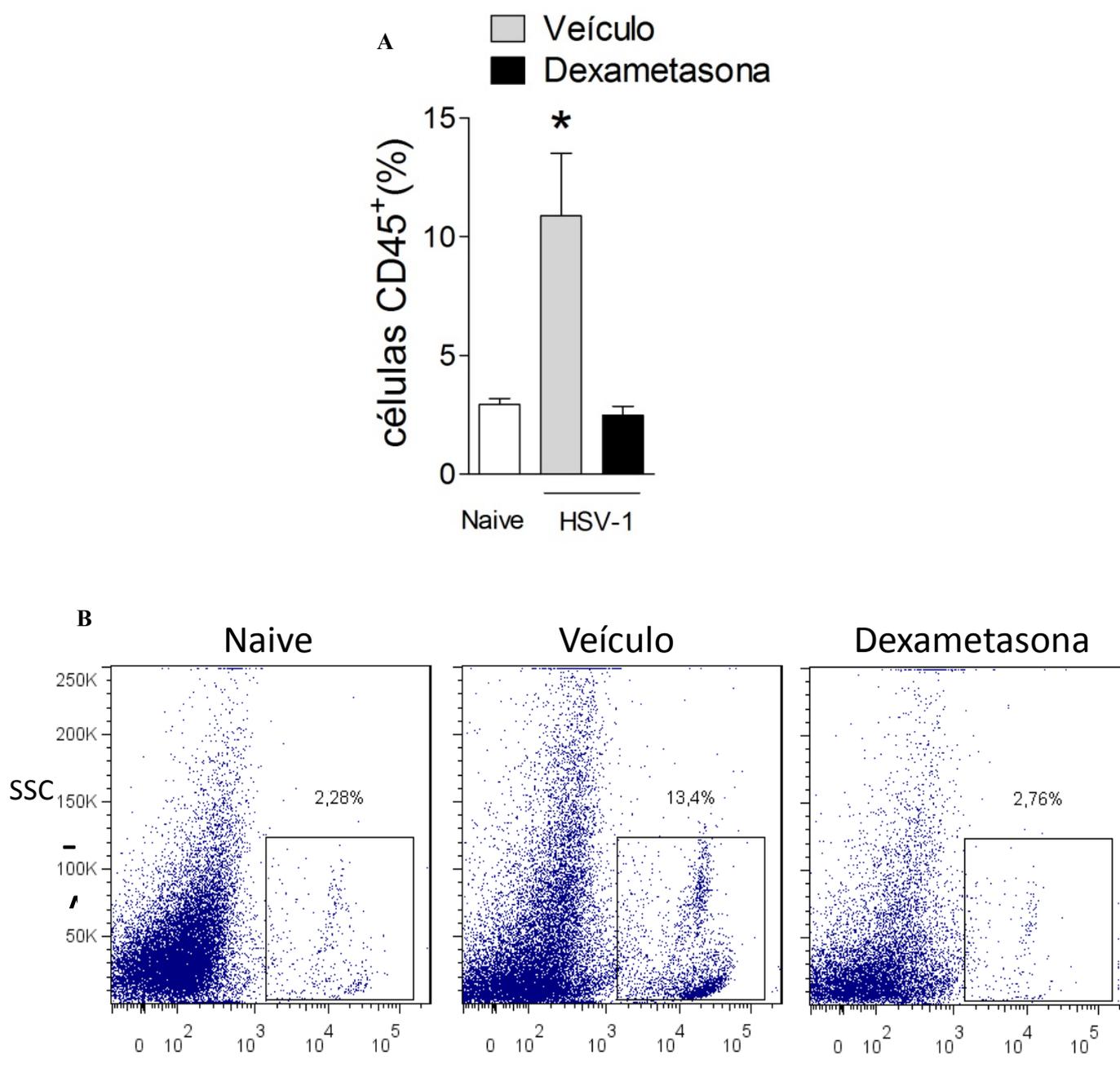


**Figura 10.** Leucócitos que infiltram os GRDs são importantes para a manutenção da hiperalgesia herpética. Camundongos C57BL/6 foram infectados com HSV-1 e tratados com fucoïdina (20 mg/kg, intravenoso) a do 2 ao 9 dpi. Avaliação da hipernociceção mecânica em camundongos no decurso temporal de 9 dias. Limiares nociceptivos mecânicos (Log ms) das patas ipsilaterais de animais infectados não tratados ou tratados com fucoïdina. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Figura 11.** A fucoidina inibe a migração de leucócitos aos GRDs. Camundongos C57BL/6 foram infectados com HSV-1 e tratados com fucoidina (20 mg/kg, intravenoso) a do 2 ao 7 dpi. Os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados no 7 dpi. Avaliação da migração de leucócitos (células CD45<sup>+</sup>) aos GRDs de animais infectados tratados com Fucoidina ou veículo. A = representação gráfica da frequência de células CD45<sup>+</sup> nos GRDs dos animais infectados tratados com Fucoidina ou veículo. B = *Dot plot* representativo da migração de leucócitos aos GRDs destes animais. \*= p<0,001.

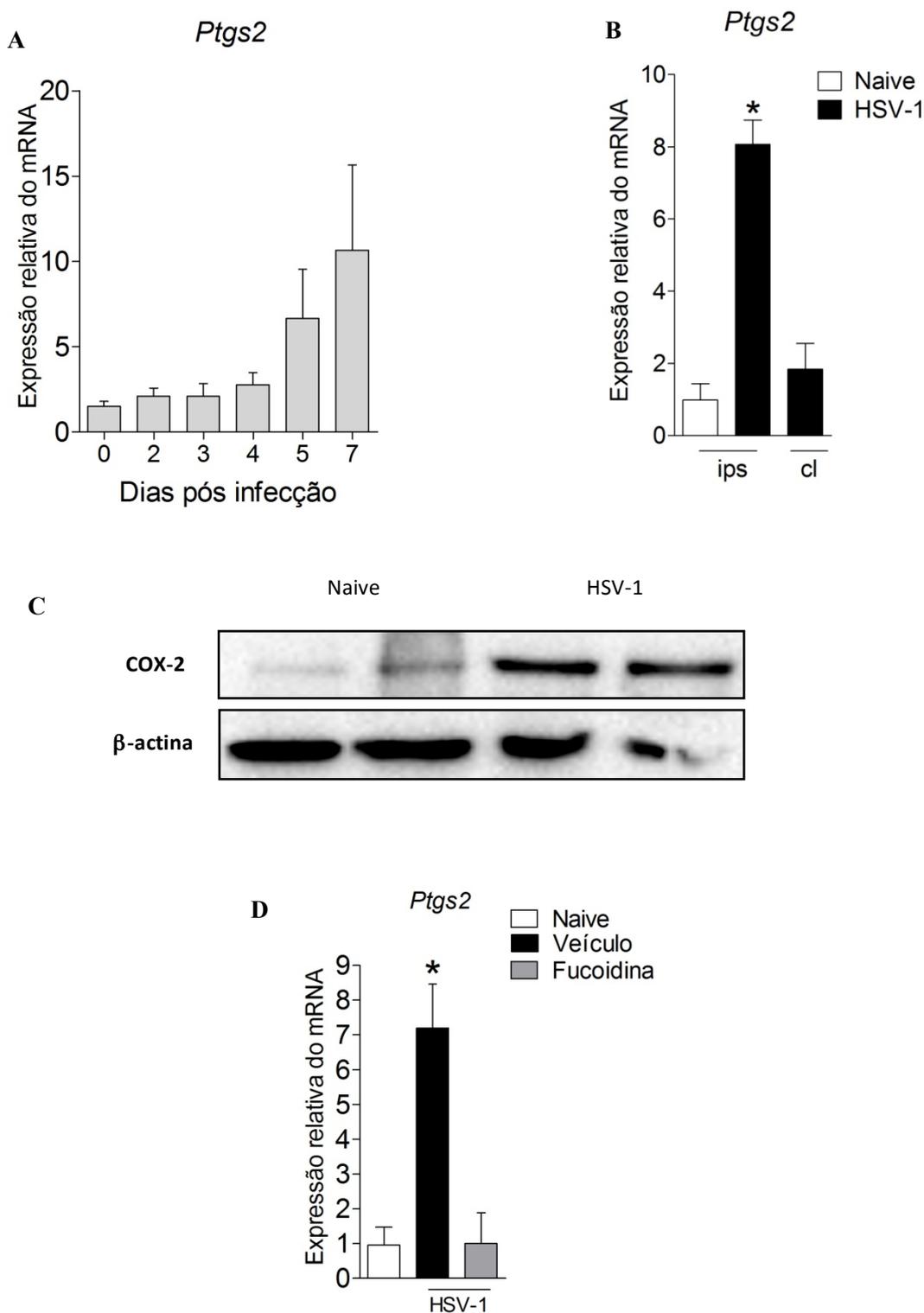
Ademais, a fim de corroborar os dados obtidos com a avaliação comportamental de camundongos tratados com o anti-inflamatório esteroide dexametasona, animais infectados com o HSV-1 foram tratados diariamente a partir do 2 dpi por via intratecal com dexametasona (5ug/5ul/animal), e os GRDs foram analisados através de citometria de fluxo. De maneira semelhante ao ocorrido para o tratamento com Fucoïdina, a administração de dexametasona intratecal foi capaz de reduzir a infiltração de leucócitos aos GRDs infectados, demonstrando o papel de células do sistema imune que migram ao Sistema Nervoso na manutenção do quadro de hiperalgesia herpética (Figura 12).



**Figura 12.** A dexametasona inibe a migração de leucócitos aos GRDs. Camundongos C57BL/6 foram infectados com HSV-1 e tratados com dexametasona (5  $\mu$ g, intratecal) a do 2 ao 7 dpi. Os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados no 7 dpi. Avaliação da migração de leucócitos (células CD45+) aos GRDs dos animais infectados tratados com dexametasona ou veículo. A = representação gráfica da frequência de células CD45+ nos GRDs dos animais infectados tratados com dexametasona ou veículo. B = *Dot plot* representativo da migração de leucócitos aos GRDs destes animais. \*=  $p < 0,001$ .

#### **4.2.5 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios nos GRDs durante a infecção por HSV-1 e o seu papel na hiperalgesia herpética – Papel da PGE<sub>2</sub> / COX-2**

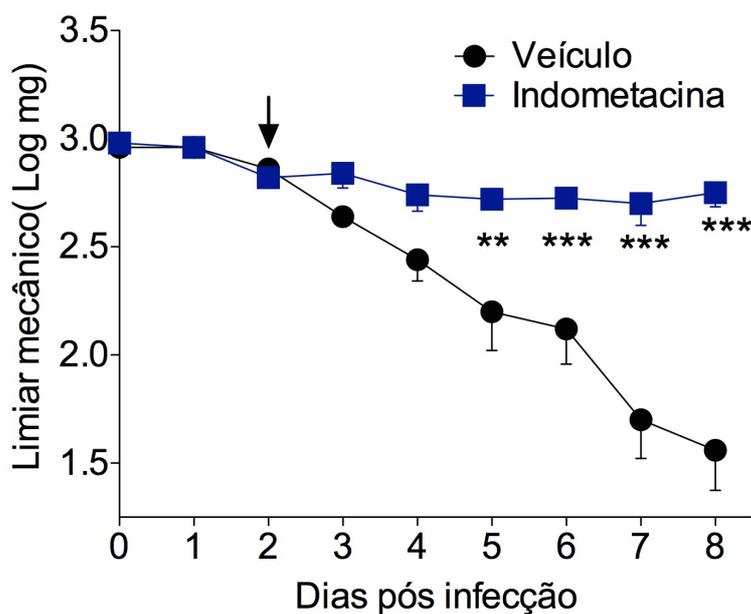
Para estudar o papel do mediador nociceptivo PGE<sub>2</sub> no modelo de hiperalgesia herpética, inicialmente avaliou-se a expressão de mRNA da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2, ou prostaglandina-endoperoxidase sintase tipo 2, *Ptgs2*), que é a enzima importante na síntese de PGE<sub>2</sub>. A reação de PCR em tempo real foi realizada conforme anteriormente descrito, utilizando primers específicos para a *Ptgs2* murina. No decorrer da infecção por HSV-1, é possível observar aumento dos níveis de expressão de *Ptgs2* a partir do 5 dpi em GRDs infectados, com o pico da expressão ocorrendo no 7 dpi (Figura 13A). Este aumento da expressão somente é observado nos GRDs ipsilaterais à infecção dérmica com HSV-1, quando comparados com os GRDs de animais não infectados ou com os GRDs das patas contralaterais à infecção (Figura 13B). Corroborando os achados de expressão de mRNA, observou-se, através de Western blot, que no 7º dpi há uma intensa produção da COX-2 em GRDs de animais infectados em comparação aos GRDs de animais não-infectados (Figura 13 C). Além disso, foi possível observar a redução da expressão de *Ptgs2* em animais infectados tratados com Fucoïdina (20 mg/kg), quando comparados a animais não-tratados ou naive (Figura 13 D). Os leucócitos que migram aos GRDs são, portanto, importantes para a produção de PGE<sub>2</sub> neste local.



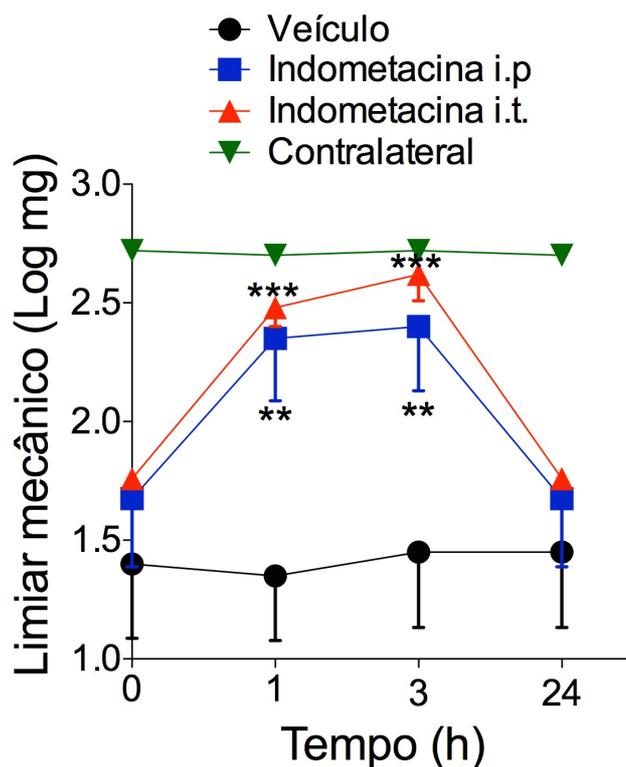
**Figura 13.** Durante a infecção por HSV-1, há aumento da expressão da enzima COX-2. Camundongos C57BL/6 foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados para análise. (A) Expressão da enzima nos GRDs ipsilaterais no decorrer da infecção cutânea com HSV-1. (B) Expressão da COX-2 nos GRDs ipsilaterais e contralaterais de animais infectados (7 dpi) e nos GRDs de animais não-infectados (naive). (C) Expressão de COX-2 nos GRDs de animais infectados no 7º dpi. A figura acima mostra 4 linhas de corridas paralelas de extrato dos GRDs marcados transferidos para uma membrana e incubados com anticorpos específicos para COX-2 (69kD) e β-actina (41kD). (D) Expressão da COX-2 nos GRDs de animais infectados tratados com Fucoïdina e veículo, ou animais não-tratados (naive). Ips= ipsilateral; cl = contralateral. \* $p < 0,001$ .

A avaliação do papel da PGE<sub>2</sub> nos GRDs, no modelo de hiperalgesia herpética, foi realizada através da análise comportamental de camundongos infectados e tratados com indometacina, inibidor não seletivo de COX e, conseqüentemente da síntese de PGE<sub>2</sub>. Brevemente, a partir do 2º dpi, os animais foram tratados diariamente por via intratecal com indometacina, (dose de 10ug/5ul/animal) até o 8º dpi. Os animais tratados com veículo (não tratados) desenvolveram o comportamento hiperalgésico a partir do 3º dpi, que perdurou durante o período analisado. A comparação entre os grupos tratado e veículo revelou que a partir do 5 dpi, o bloqueio da produção da PGE<sub>2</sub> nos GRDs é capaz de inibir a hiperalgesia herpética (Figura 14A). De maneira semelhante, o tratamento no 7º dpi com uma única dose da droga pelas vias intratecal (10ug/5ul/animal) ou sistêmica (5 mg/kg) resultou na redução transitória da hiperalgesia herpética (Figura 14B). Estes resultados demonstram que a via PGE<sub>2</sub>/COX-2 tem um papel importante na gênese e manutenção da hiperalgesia herpética.

A



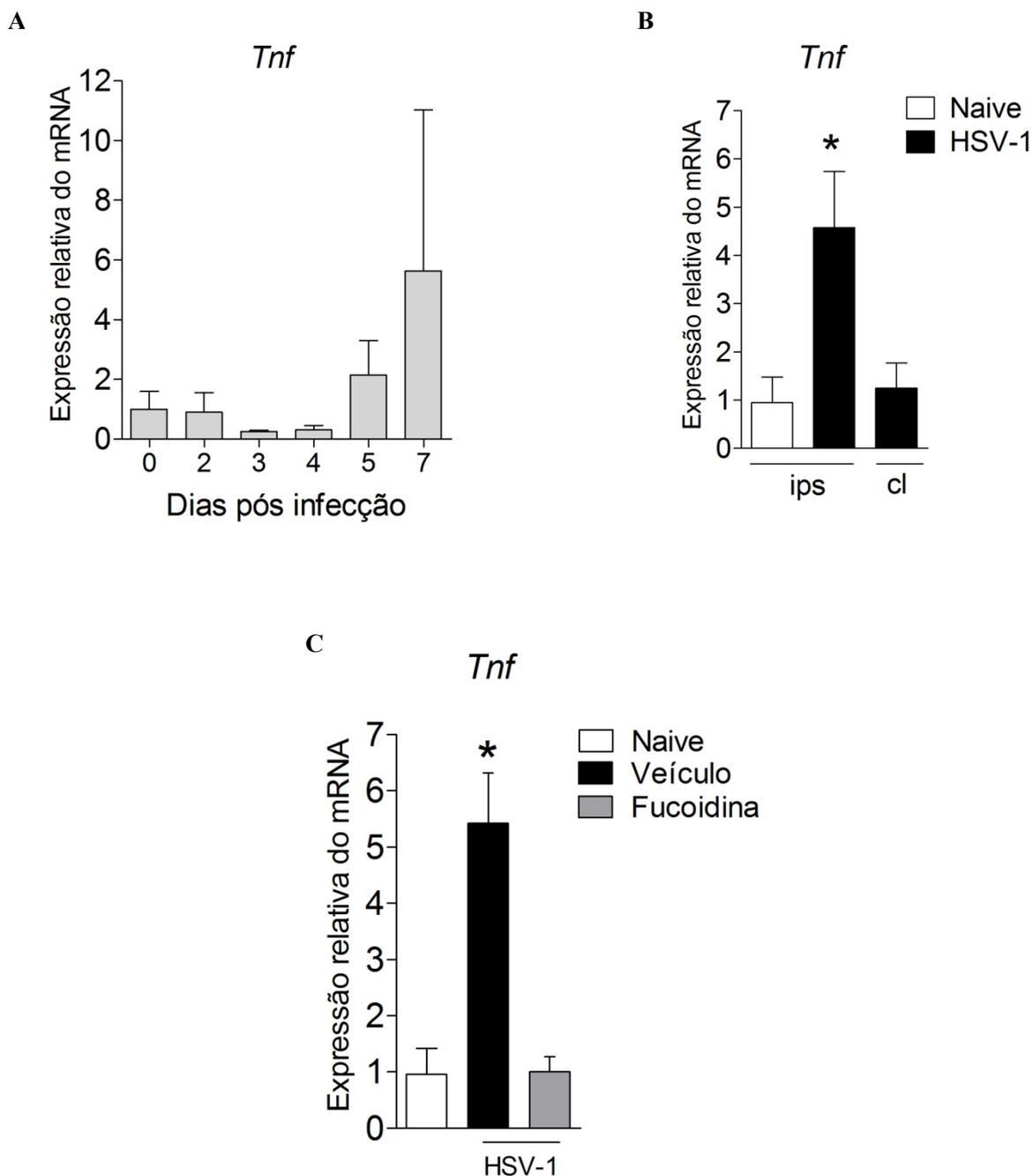
B



**Figura 14.** A COX-2/Ptgs2 é importante para a gênese e manutenção da hiperálgia herpética. (A) Camundongos C57BL/6 foram infectados e tratados com indometacina (10  $\mu$ g, intratecal) do 2 ao 8 dpi. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) de animais tratados e veículo. (B) Camundongos C57BL/6 foram infectados e tratados com indometacina (10  $\mu$ g, intratecal ou 5mg/kg, intraperitoneal) no 7 dpi. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) de animais tratados e veículo. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

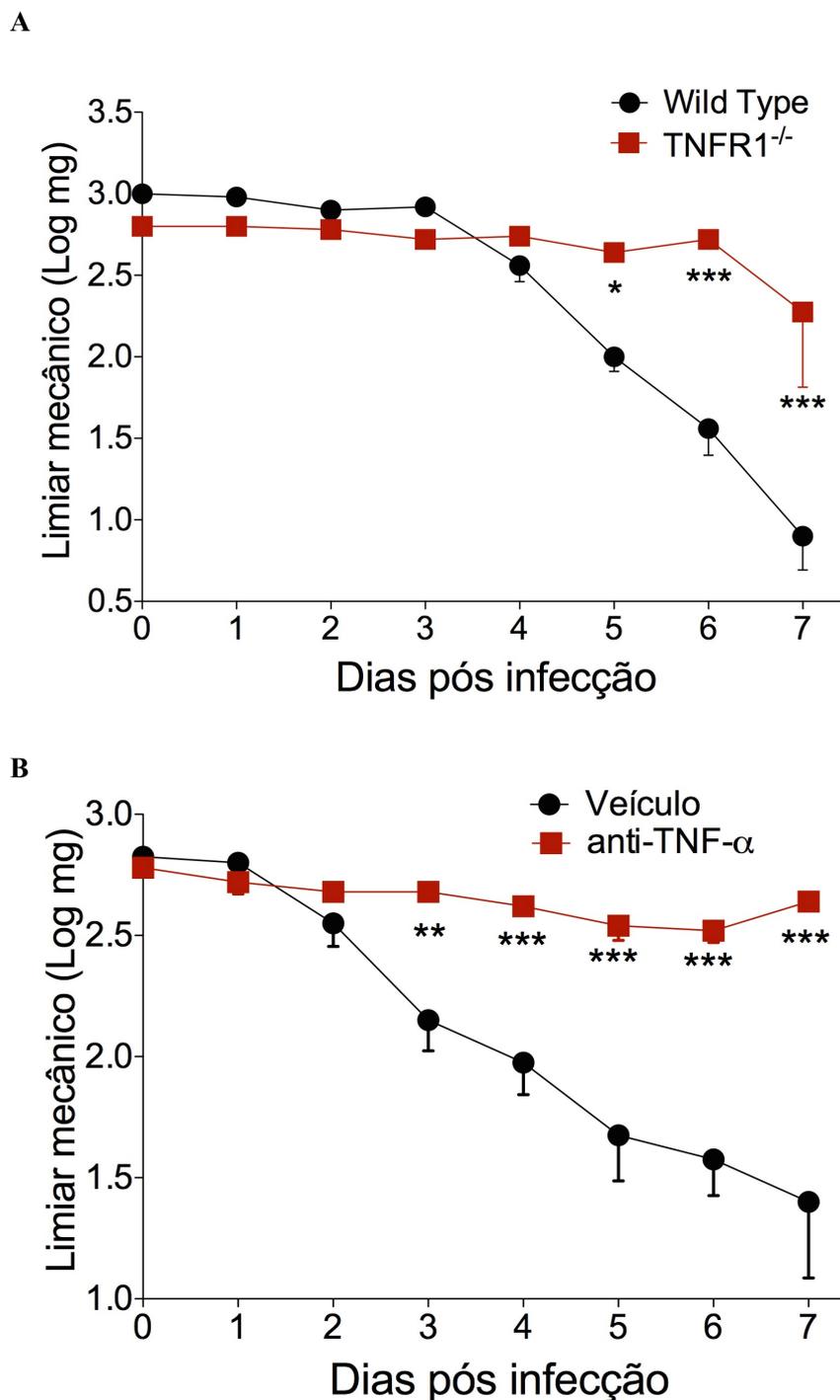
#### **4.2.6 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios nos GRDs durante a infecção por HSV-1 e o seu papel na hiperalgesia herpética – Papel do TNF- $\alpha$**

Para estudar o papel do TNF- $\alpha$  no modelo de hiperalgesia herpética, inicialmente avaliou-se a expressão temporal do mRNA de *Tnfa* nos GRDs ipsilaterais e medula espinal de animais previamente infectados. Foi possível observar um discreto aumento da expressão relativa de *Tnf* nos GRDs infectados a partir do 5 dpi, com o pico de expressão desta citocina ocorrendo no 7 dpi (Figura 15A). O aumento da expressão de *Tnf* foi detectado somente em GRDs ipsilaterais à infecção dérmica, quando comparados com os GRDs de animais não infectados ou com os GRDs das patas contralaterais à infecção (Figura 15B). Ademais, em animais tratados com Fucoïdina (20 mg/kg) observou-se a redução da expressão de *Tnf $\alpha$*  nos GRDs infectados, quando comparados a animais não-tratados ou naive (Figura 15C), o que sugere que, de maneira semelhante ao ocorrido para COX-2/PGE<sub>2</sub>, leucócitos que migram aos GRDs são importantes para a produção desta citocina no local.



**Figura 15.** Durante a infecção por HSV-1, há aumento da expressão de TNF- $\alpha$ . Camundongos C57BL/6 foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados para análise. (A) Expressão da citocina nos GRDs ipsilaterais no decorrer da infecção cutânea com HSV-1. (B) Expressão do TNF- $\alpha$  nos GRDs ipsilaterais e contralaterais de animais infectados (7 dpi) e nos GRDs de animais não-infectados (naive). (C) Expressão do TNF- $\alpha$  nos GRDs de animais infectados tratados com Fucoidina (20mg/kg) e veículo, ou animais não-tratados (naive). Ips= ipsilateral; cl = contralateral. \* $p < 0,001$ .

Para avaliação do papel desta citocina no modelo de hiperalgesia herpética, camundongos geneticamente deficientes para o receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1<sup>-/-</sup>) ou animais C57BL/6 (*Wild Type* - WT) foram infectados (n=5; machos), conforme previamente descrito. Observou-se que os animais TNFR1<sup>-/-</sup> não desenvolveram a hiperalgesia herpética quando comparados aos animais WT (Figura 16 A). Para melhor visualização do comportamento apresentado pelos animais TNFR1<sup>-/-</sup>, a análise da hiperalgesia apresentada na Figura 16 A está também representada em valores transformados para a escala logarítmica na base 10 ( $\log_{10}$ ) (Figura 16 B). Adicionalmente, os camundongos infectados foram tratados por via intratecal com anticorpo neutralizante anti-TNF- $\alpha$  (capaz de ligar-se ao TNF- $\alpha$  solúvel e de membrana e neutralizar sua ação) na dose de 1 $\mu$ g/5 $\mu$ l/animal. A comparação entre os grupos tratado e veículo revelou que o bloqueio do TNF- $\alpha$  é capaz de reduzir de maneira significativa a hiperalgesia herpética (Figura 16 C). Isto sugere que a ativação do receptor de TNF- $\alpha$  é importante para a gênese e manutenção da hiperalgesia herpética.

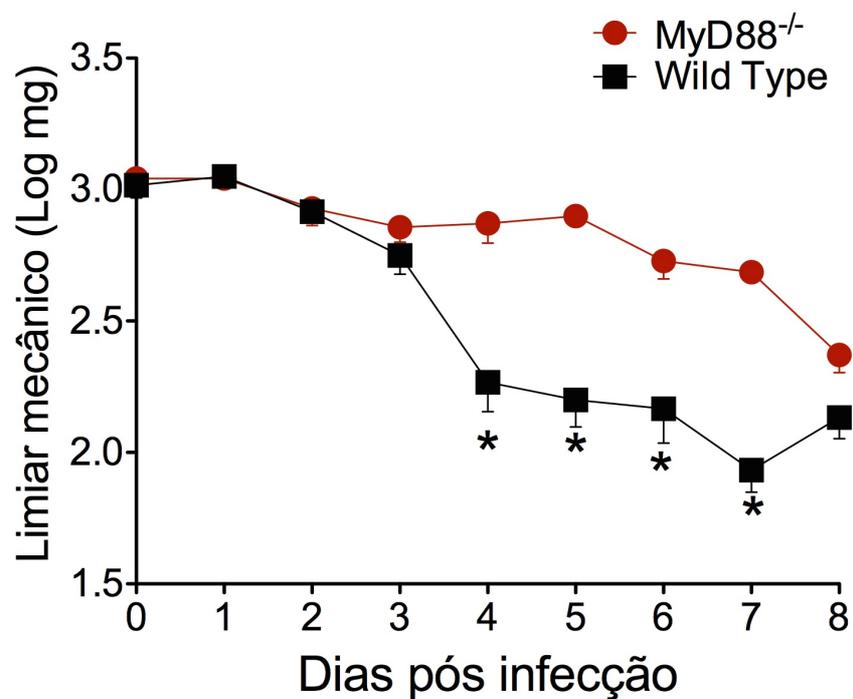


**Figura 16.** O TNF- $\alpha$  é importante para a gênese e manutenção da hiperalgesia herpética. (A) Camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para o TNFR1 ou selvagens (Wild Type) foram infectados com HSV-1. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) de animais geneticamente deficientes para o TNFR1 e veículo. (B) Camundongos C57BL/6 foram infectados e tratados com infliximab (1  $\mu$ g, intratecal) do 2 ao 7 dpi. Valores dos limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) de animais tratados e veículo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.2.7 A molécula adaptadora de sinalização MyD88 tem um papel importante na fase inicial da hiperalgesia herpética, mas não nos eventos mais tardios**

O reconhecimento inicial das partículas virais pelo sistema imune pode ser feito por receptores de reconhecimento padrão, principalmente os receptores do tipo TLRs, dentre os quais TLR2 e TLR9, além dos TLR3, TLR7 e TLR8. O MyD88 é uma molécula adaptadora comum a todas as vias sinalizadoras de receptores do tipo Toll, com exceção do TLR3, além de também participar na via de sinalização do receptor de IL-1 (IL-1R). Esta molécula adaptadora poderia ser crucial para a sinalização do reconhecimento do HSV-1 e consequente desenvolvimento da hiperalgesia herpética. Para avaliar tal hipótese, animais geneticamente deficientes para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>; n=7) foram utilizados nos experimentos de infecção pericutânea, conforme anteriormente descrito. Animais da linhagem C57BL/6 (WT; n=7), foram infectados de maneira idêntica e utilizados como controles.

Com relação à hiperalgesia herpética, é possível observar um atraso no desenvolvimento do comportamento hiperalgésico nos MyD88<sup>-/-</sup>, em relação aos animais WT (Figura 17), o que evidencia um papel importante desta via de sinalização na gênese da hiperalgesia herpética. Apesar do valor máximo de redução do limiar nociceptivo mecânico ser igual no 8º dpi para ambos grupos, em animais WT a hiperalgesia começa a se desenvolver no 3º dpi, enquanto em animais MyD88<sup>-/-</sup> a redução dos limiares nociceptivos mecânicos passa a ocorrer a partir do 6º dpi (Figura 17). Isto sugere que a sinalização via MyD88 é importante na gênese da hiperalgesia herpética. Porém, a sinalização por esta via não é importante para o desenvolvimento da fase tardia da hiperalgesia herpética, a saber, a fase relacionada com a inflamação nos GRDs.

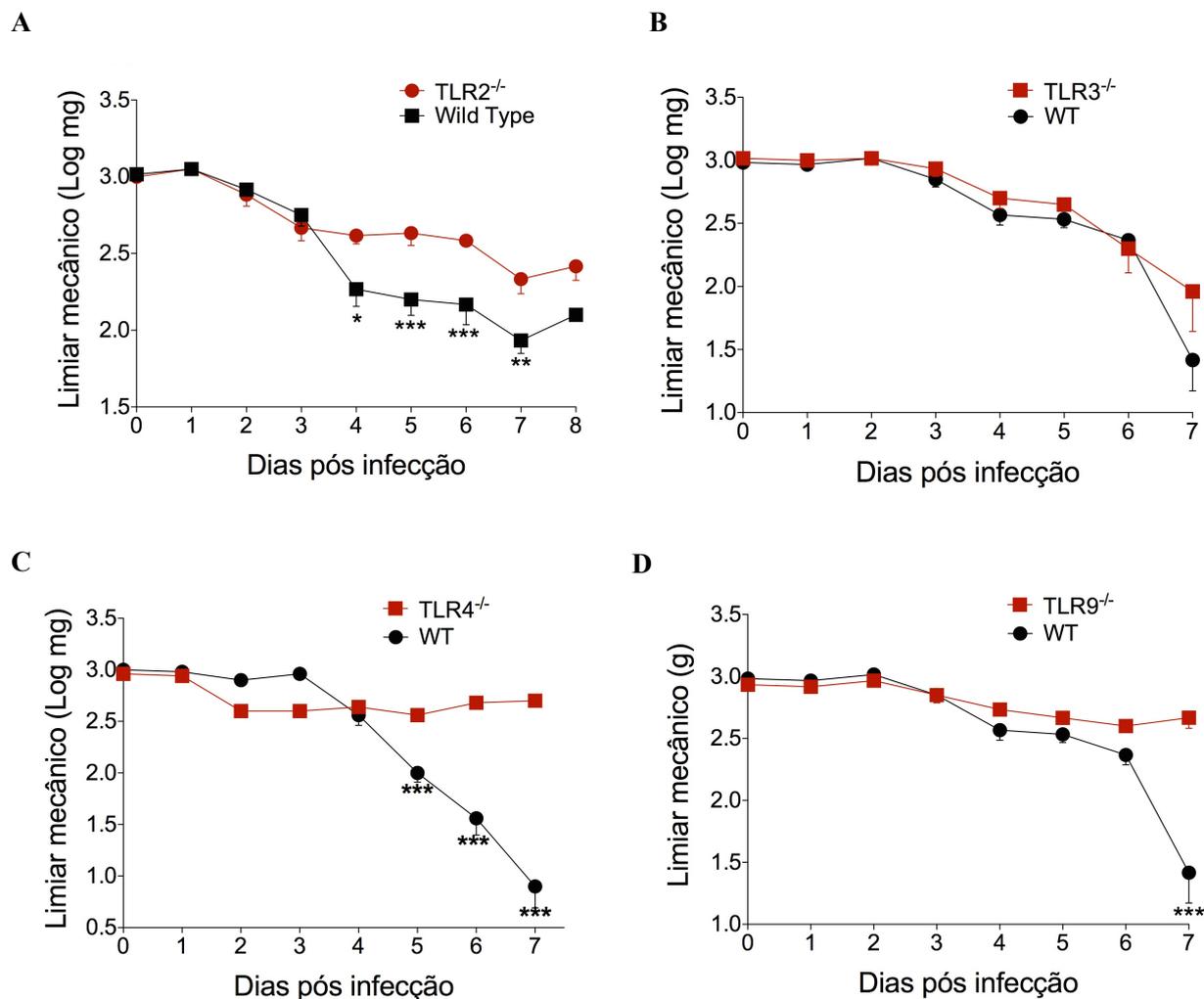


**Figura 17.** O MyD88 é importante nas fases iniciais da hiperalgesia herpética. Avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos geneticamente deficientes para o MyD88 ou selvagens (WT= Wild Type) no decurso temporal de 8 dias. Limiare nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de ambos os grupos. \*=  $p < 0,001$ .

#### 4.2.8 Papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na fase inicial da hiperalgesia herpética

Para avaliação da possível contribuição dos TLRs na hiperalgesia herpética, animais geneticamente deficientes para os receptores TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>, n=7), TLR3 (TLR3<sup>-/-</sup>, n=7), TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>, n=7) e TLR9 (TLR9<sup>-/-</sup>, n=6) foram utilizados nos experimentos de infecção pericutânea, conforme anteriormente descrito. Animais selvagens da linhagem C57BL/6 (WT, n=7) foram infectados de maneira idêntica e utilizados como controles.

A deficiência do TLR2 assemelha-se ao fenótipo observado na deficiência do MyD88, sugerindo que a sinalização via TLR2 pode ser responsável pela ativação do MyD88 na fase inicial da hiperalgesia herpética (Figura 18 A). Foi possível observar que o desenvolvimento do comportamento hiperalgésico em animais deficientes para os receptores TLR3 ocorre de maneira semelhante aos animais WT (Figuras 18 B). Ainda, o TLR3 não participa da gênese ou manutenção da hiperalgesia herpética murina induzida por HSV-1. O desenvolvimento do comportamento hiperalgésico em animais TLR4<sup>-/-</sup> ocorre de maneira semelhante aos animais WT até o 4° dpi (Figura 18 C). No entanto, a partir do 5° dpi, ocorre redução significativa dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais selvagens (WT), quando comparados aos animais TLR4<sup>-/-</sup>, a qual permanece até o 7° dpi. Logo, o TLR4 parece desempenhar um papel parcial na manutenção da hiperalgesia herpética, em estágios mais tardios da infecção (a partir do 5° dpi). Em animais TLR9<sup>-/-</sup>, o desenvolvimento do comportamento hiperalgésico ocorre de maneira semelhante aos animais WT (Figura 18 D). No entanto, a partir do 7° dpi, os animais TLR9<sup>-/-</sup> apresentaram redução na hiperalgesia herpética quando comparados aos animais WT, sugerindo que este receptor pode ter um papel na fase tardia da hiperalgesia herpética, a saber, na inflamação nos GRDs. Cabe ressaltar que o fenótipo observado em animais TLR4<sup>-/-</sup> e TLR9<sup>-/-</sup> não mimetiza aquele dos animais MyD88<sup>-/-</sup>, sugerindo que a sinalização destes receptores não é responsável pela ativação do MyD88 na fase inicial da hiperalgesia herpética.



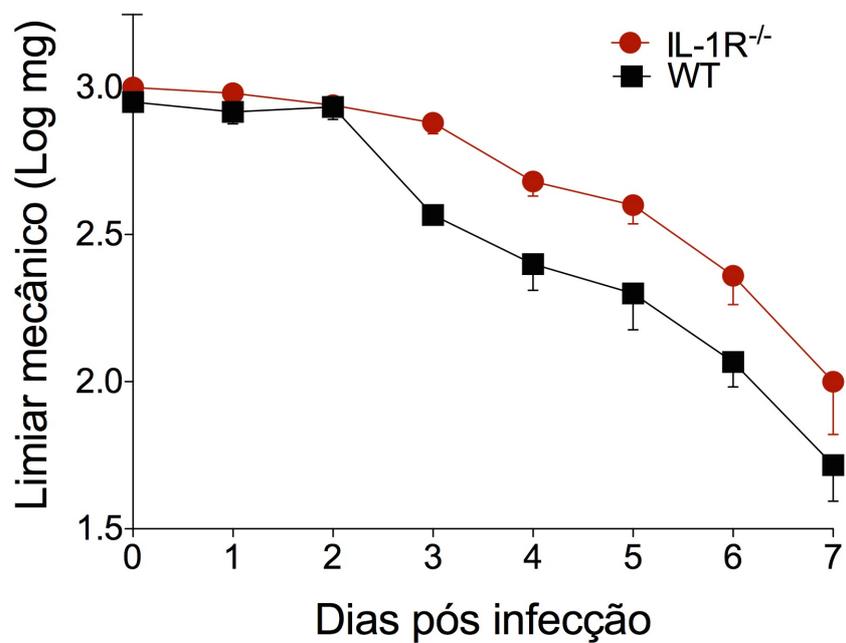
**Figura 18.** A diferente participação dos TLRs na hiperalgesia herpética. Camundongos selvagens (C57BL/6) e animais geneticamente deficientes para os receptores TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 foram infectados com HSV-1. Avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos geneticamente deficientes para os TLR2 (A), TLR3(B), TLR4(C) e TLR9(D) ou selvagens (WT=Wild Type) no decurso temporal de 7 dias. Limiares nociceptivos mecânicos das patas ipsilaterais de ambos os grupos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.2.9 Papel dos receptores do tipo IL-1 (IL-1RI) na fase inicial da hiperalgesia herpética

Além de mediar a sinalização de TLRs, o MyD88 é uma molécula adaptadora da sinalização de outros receptores como o IL-1R e o IL-18R. O IL-1RI é um receptor que transduz o sinal de duas citocinas relacionadas, a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Logo, investigou-se se a ativação do IL-1RI poderia estar relacionada com a fase inicial da hiperalgesia herpética, ou seja, a mesma fase na qual o MyD88 demonstrou ser importante. Para tal, animais geneticamente deficientes para o receptor tipo I da IL-1 (IL-1RI<sup>-/-</sup>, n=5) foram utilizados nos experimentos de infecção pericutânea, conforme anteriormente descrito. Animais selvagens da linhagem C57BL/6 (WT, n=5; 6 semanas) foram infectados de maneira idêntica e utilizados como controles.

Pode-se observar um atraso no desenvolvimento do comportamento hiperalgésico nos IL-1RI<sup>-/-</sup> em relação aos animais WT (Figura 19), o que evidencia um papel desta via de sinalização na fase inicial da hiperalgesia herpética. Porém a redução na hiperalgesia só foi observada nos 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dpi. Possivelmente, o fenótipo observado no MyD88 KO está ocorrendo pela inibição de múltiplas vias relacionadas com a infecção herpética. Logo, a ação sinérgica da ativação de múltiplos TLRs (como o TLR2) e do IL-1RI seria um importante mecanismo na hiperalgesia herpética. Ainda, possivelmente, a via de sinalização da IL-18, que também requer a ativação do MyD88, poderia estar relacionada com a fase inicial da hiperalgesia herpética.

Vale ressaltar que o IL-1RI não tem nenhum papel na manutenção da hiperalgesia herpética, a saber, com a nocicepção relacionada à fase inflamatória nos GRDs, visto que no 7<sup>o</sup> dpi os animais IL-1RI KO apresentaram valores de limiares nociceptivos mecânicos similares aos observados em animais WT.

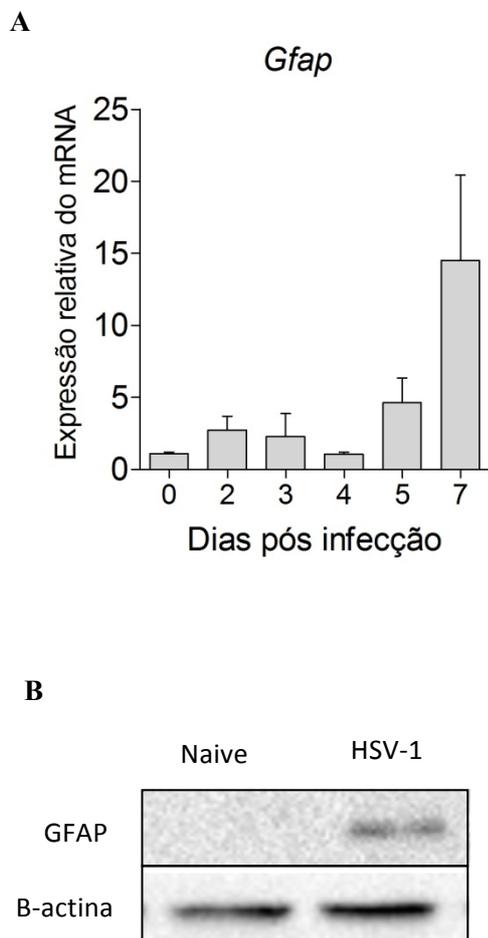


**Figura 19.** A sinalização via IL-1R não participa da hiperalgesia herpética. Camundongos selvagens (C57BL/6) ou geneticamente deficientes para IL-1R foram infectados com HSV-1. Avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos IL-1R<sup>-/-</sup> ou selvagens (WT = Wild Type) no decurso temporal de 7 dias. Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de ambos os grupos.

#### 4.2.10 Ativação de células satélites gliais dos GRDs durante a infecção por HSV-1

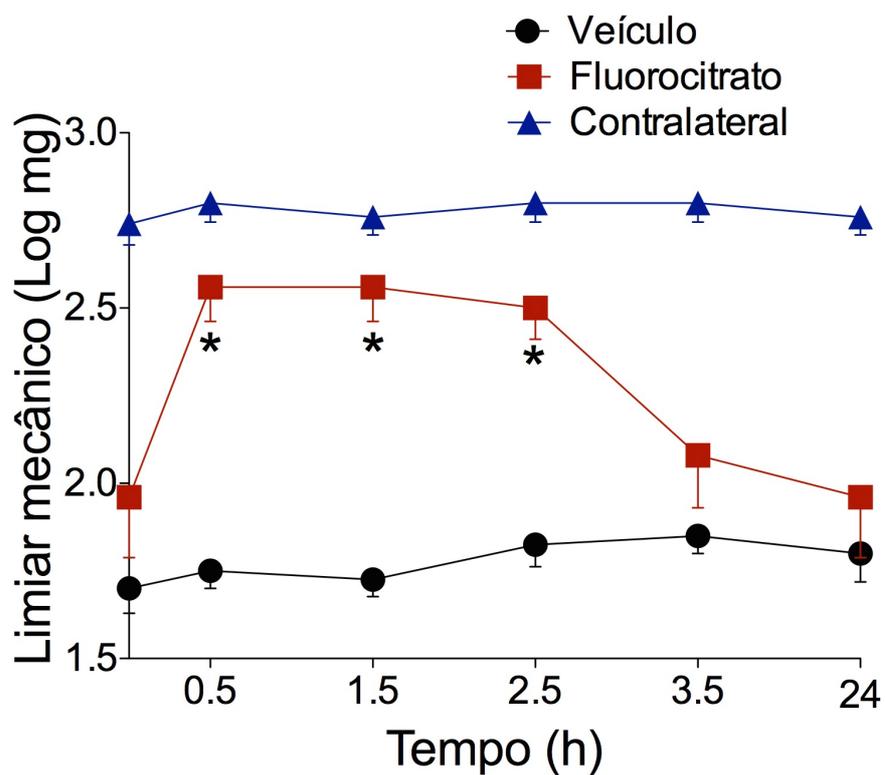
Inicialmente, decidiu-se avaliar se as células satélites da glia (CSGs) estariam ativadas na hiperalgesia herpética. Avaliou-se a expressão temporal do mRNA de *Gfap* nos GRDs ipsilaterais de animais previamente infectados. Ademais, amostras coletadas no 7º dpi foram processadas para realização da técnica de western-blot e quantificação relativa da expressão de GFAP.

No decorrer da infecção por HSV-1, é possível observar aumento dos níveis de expressão de *Gfap* no 7º dpi em GRDs infectados (Figura 20A). Ademais, corroborando os dados de expressão gênica, constatou-se, através de Western-blot, que há uma intensa ativação das CSGs em animais infectados 7º dpi, quando comparados aos animais não-infectados, demonstrando que a infecção pelo HSV-1 resulta na ativação de células satélite dos GRDs (Figura 20B).



**Figura 20.** As células satélites gliais são ativadas no decorrer da infecção por HSV-1. Camundongos C57BL/6 foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados para análise. (A) Expressão do mRNA do GFAP nos GRDs ipsilaterais no decorrer da infecção cutânea com HSV-1. (B) Ativação de células satélites nos GRDs de animais infectados no 7º dpi. A figura acima mostra 4 linhas de corridas paralelas de extrato dos GRDs marcados transferidos para uma membrana e incubados com anticorpos específicos para GFAP (50kD) e  $\beta$ -actina (41kD).

Para avaliação do papel da ativação de células satélite nos GRDs durante a hiperalgesia herpética, camundongos infectados (n=5), conforme previamente descrito, foram tratados, por via intratecal, com fluorocitrato, (0,2 nmol/5ul/animal). Os animais tratados com salina (veículo) não apresentaram redução do comportamento de hiperalgesia. No entanto, em animais do grupo tratado, pode-se observar redução significativa do comportamento de hiperalgesia herpética (Figura 21), Tal redução é transiente, não sendo mais observada 3,5 e 24 h após o tratamento.

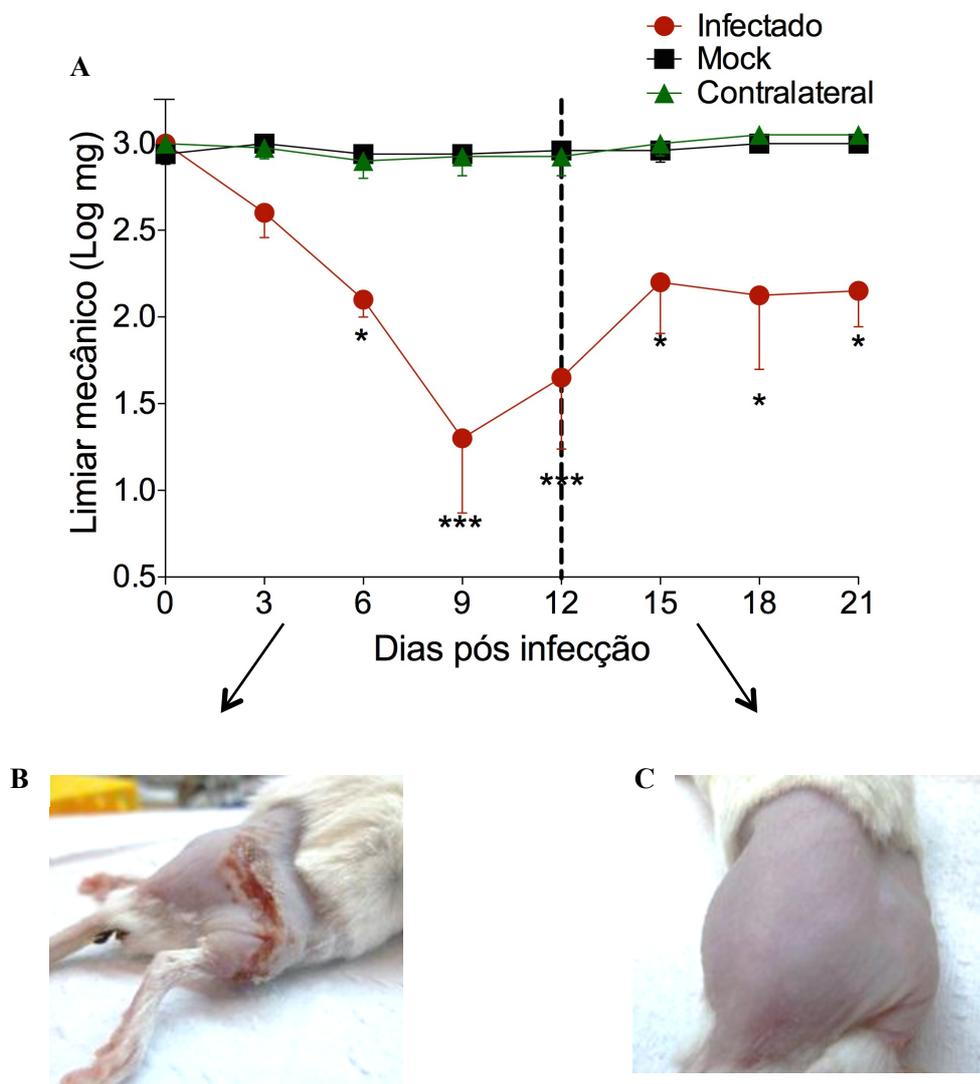


**Figura 21.** A ativação de células satélites gliais é importante para a manutenção da hiperalgesia herpética. Camundongos C57BL/6 foram infectados com HSV-1 e foram tratados com fluorocitrato (0,2 nmol/5 ul/animal) ou salina (veículo) no 7 dpi. Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais dos grupos tratado ou veículo, pós-tratamento.

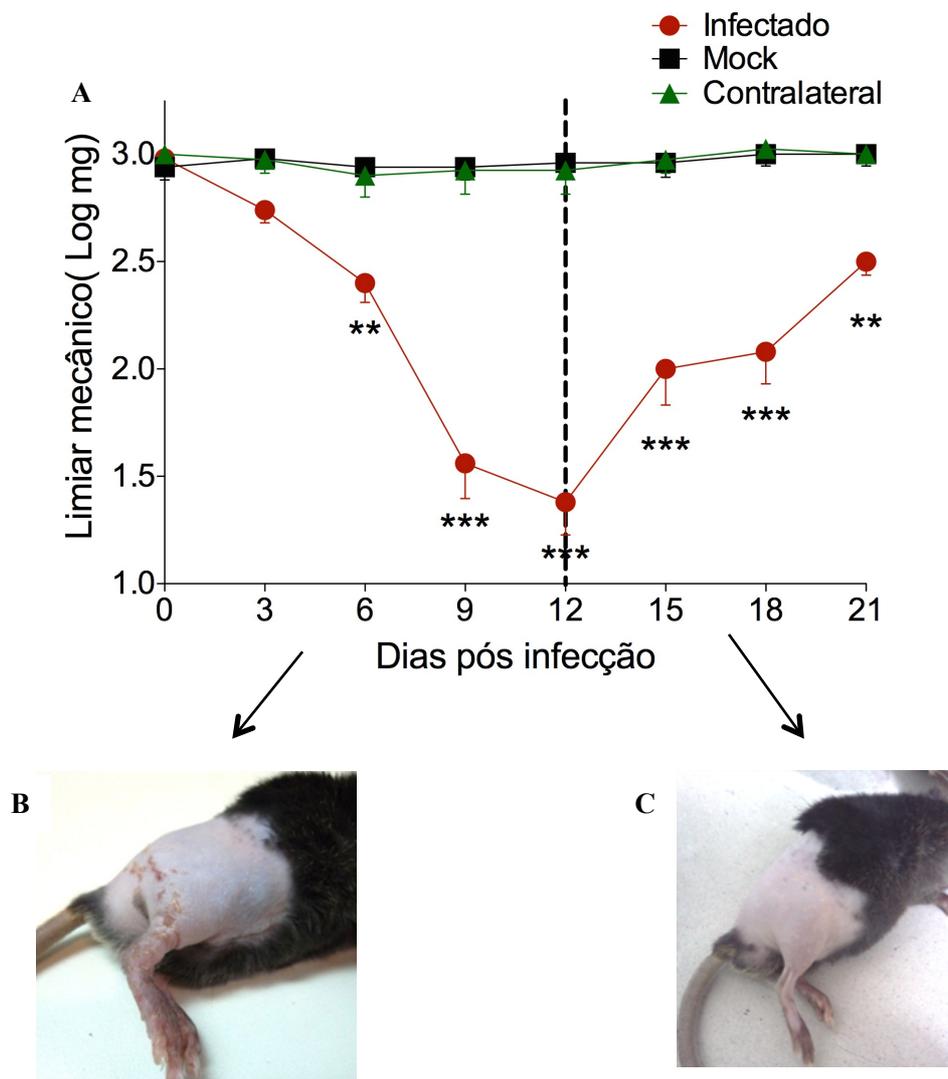
### **4.3 Avaliação da Neuralgia Pós-Herpética (NPH) em camundongos infectados**

#### **4.3.1 Avaliação temporal dos camundongos infectados**

Com o intuito de avaliar a cinética do desenvolvimento do comportamento hiperalgésico na infecção por HSV-1, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados e observados pelo período de 21 dias após a infecção. Em ambas as linhagens de animais infectados, foi possível observar o desenvolvimento do comportamento hiperalgésico a partir do 3º dpi nas patas ipsilaterais à infecção. Animais “mock”, de ambas as linhagens, não apresentaram redução do limiar nociceptivo mecânico (Figuras 22A e 23A). Novamente, o desenvolvimento de lesões zoosteriformes ocorreu em 100% dos animais da linhagem BALB/c e em 40% dos animais da linhagem C57BL/6, as quais surgiram no 5º dpi e persistiram até, aproximadamente, o 12º dpi (Figuras 22B e C e Figuras 23B e C). As patas contralaterais de animais de ambas as linhagens não foram afetadas, mostrando que, neste modelo, a hiperalgesia é restrita ao neurodermatomo infectado (Figuras 22A e 23A).



**Figura 22.** Avaliação da hiperalgesia mecânica em camuindongos da linhagem BALB/c no decurso temporal de 21 dias. A= limiares mecânicos nociceptivos das patas ipsilaterais de animais infectados e mock. \*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ . B e C= fotos da lesão zosteriforme no período da hiperalgesia herpética (7 dpi; figura B) e pós-herpética (12 dpi; figura C).



**Figura 23.** Avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos da linhagem C57BL/6 no decurso temporal de 21 dias. A= limiares mecânicos nociceptivos das patas ipsilaterais de animais infectados e mock. \*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ . B e C= fotos da lesão zosteriforme no período da hiperalgesia herpética (7 dpi; figura B) e pós-herpética (12 dpi; figura C).

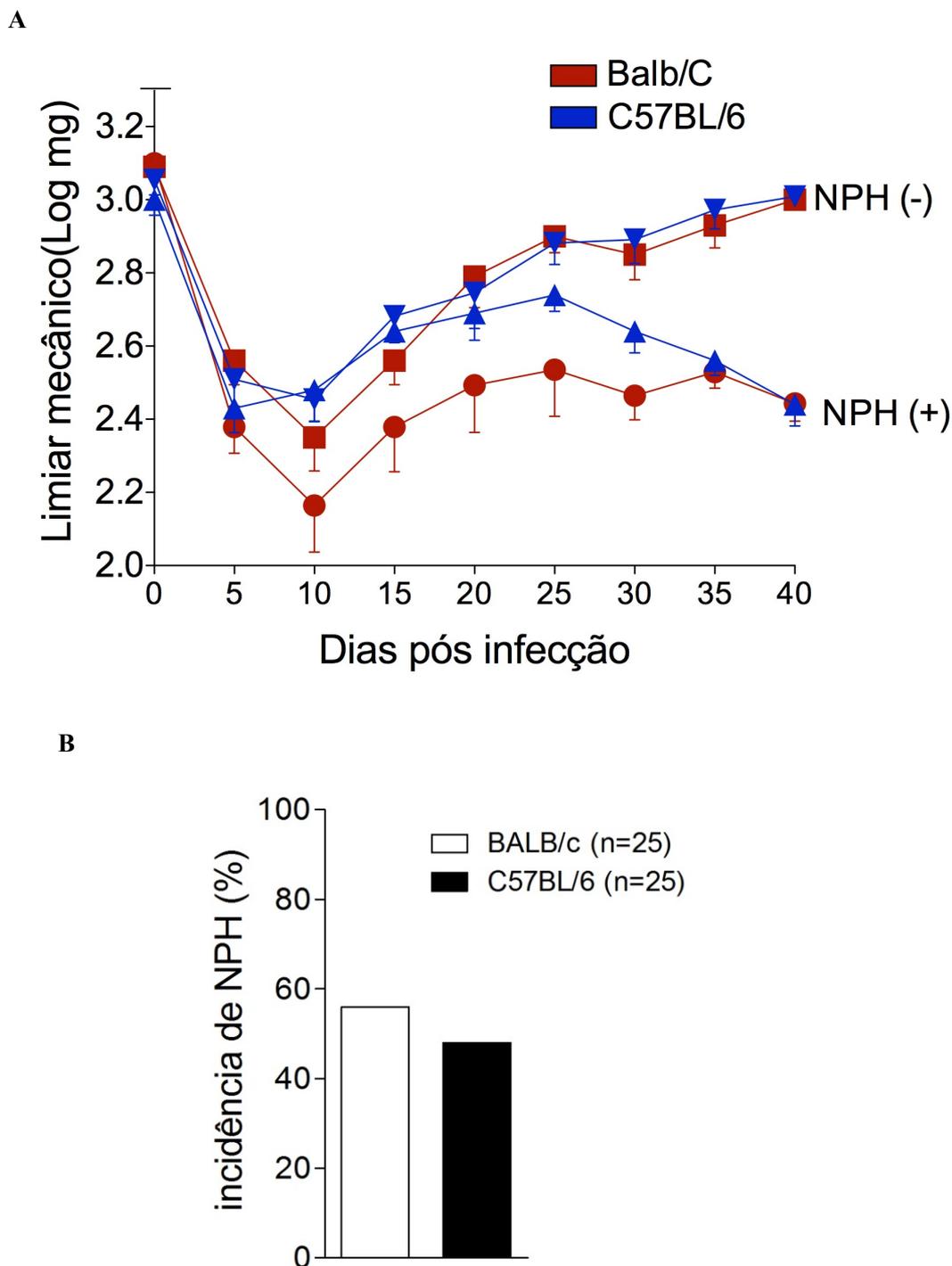
A avaliação dos valores médios dos limiares mecânicos dos animais infectados revelou que há persistência do comportamento hiperalgésico (hiperalgesia crônica), em animais de ambas linhagens após o desaparecimento das lesões zosteriformes (Figura 22 e 23). Porém, quando o comportamento de hipersensibilidade nociceptiva dos animais é avaliado individualmente, é possível observar que a persistência do quadro hiperalgésico não é uniforme dentro dos grupos de animais infectados. Em camundongos BALB/c, 4 animais de um total de 5 infectados apresentaram redução persistente dos limiares nociceptivos ao final da avaliação comportamental (21 dpi). A saber, valores de limiar nociceptivo mecânico menor ou igual a 0.4g. Em contrapartida, em camundongos C57BL/6, este comportamento hiperalgésico persistente foi observado em 3 animais em um total de 5 infectados.

Tal hiperalgesia crônica é semelhante à ocorrida em humanos acometidos pela Neuralgia Pós-Herpética (NPH), a qual é determinada pela persistência da dor após o desaparecimento das lesões zosteriformes (Gilden et al, 2011). Na literatura, não há um critério estabelecido para determinação da NPH murina. Alguns autores sugerem que a NPH ocorre quando não é possível detectar vírus ativos nos GRDs, acompanhado da persistência do comportamento hiperalgésico. Porém, estes trabalhos utilizam metodologias de baixa sensibilidade de detecção de partículas virais, como o PCR convencional com análise do endpoint em gel de agarose, o que leva ao viés de não detecção de baixas carga virais (Takasaki, 2000). Tendo em vista que este é um modelo murino de uma doença humana, o mesmo critério utilizado na clínica para classificar a NPH foi adotado, ou seja, para camundongos, a NPH seria o quadro hiperalgésico que persiste após o desaparecimento das lesões zosteriformes (após o 14 dpi). Para refinar a análise, animais com hiperalgesia persistente ou NPH foram classificados como aqueles que apresentaram limiares nociceptivos mecânicos com valores iguais ou menores que 0.4g no 21dpi.

### 4.3.2 Determinação da Neuralgia Pós-Herpética (NPH) em camundongos infectados

Para o estudo do desenvolvimento e ocorrência da NPH em camundongos, animais BALB/c e C57BL/6 foram infectados conforme anteriormente descrito, utilizando-se um número amostral de 25 animais (fêmeas) de cada linhagem para avaliação da incidência e perfil do comportamento de hiperalgesia que caracteriza a NPH. A avaliação de alterações dos limiares nociceptivos mecânicos nas patas infectadas e contralaterais foi realizada durante 40 dias após a infecção, com um intervalo de cinco dias entre as medidas.

Após o período de avaliação, observou-se que os animais infectados, das linhagens BALB/c e C57/BL6, desenvolveram a hiperalgesia herpética (valores do 5º dpi e 10º dpi) conforme anteriormente observado. Após o 20º dpi, observou-se que uma parcela dos animais BALB/c infectados (14 em 25) apresentou redução significativa persistente dos limiares nociceptivos mecânicos. Tal comportamento de hipersensibilidade nociceptiva persistente caracteriza a hiperalgesia crônica que desenvolve-se na NPH (animais NPH+). De maneira semelhante, parte dos animais C57BL/6 infectados (12 em 25) desenvolveu a NPH. Os demais camundongos infectados, de ambas as linhagens, apresentaram reversão do quadro de hipersensibilidade nociceptiva herpética, com retorno dos limiares nociceptivos mecânicos aos valores basais ao fim da avaliação comportamental, ou seja, não desenvolveram a NPH (animais NPH-) (Figura 24 A). Dentro do grupo de animais infectados, 56% (14 em 25) dos animais BALB/c e 48% (12 em 25) dos animais C57BL/6 apresentaram o quadro de hiperalgesia crônica, não havendo diferença significativa entre as duas linhagens para o desenvolvimento da NPH (Figura 24 B). Portanto, as diferenças observadas inicialmente, no perfil de desenvolvimento da resposta hiperalgésica entre as duas linhagens, não passava de um artefato experimental que foi excluído quando o número amostral foi aumentado e quando os animais foram agrupados pelo desenvolvimento da NPH.

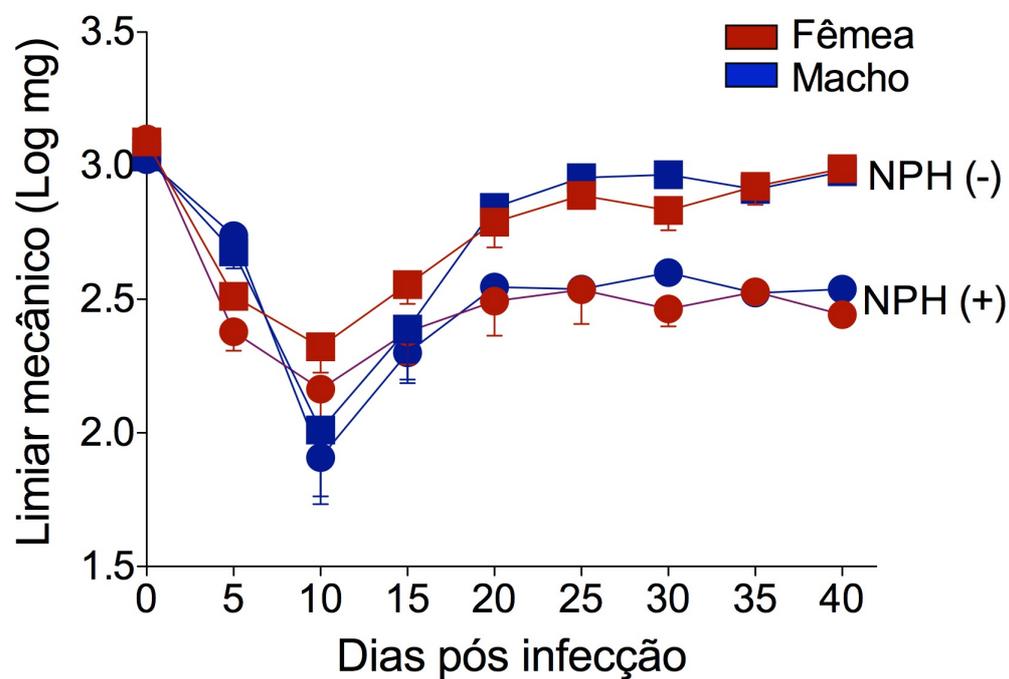


**Figura 24.** A linhagem dos camundongos não influencia no desenvolvimento da NPH. Camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 foram infectados e a avaliação comportamental foi realizada para ambas linhagens (A) Limiars nociceptivos mecânicos de animais que apresentam o quadro de neuralgia pós-herpética (NPH+) ou que desenvolveram somente a hiperalgesia herpética (NPH-). (B) Porcentagem de animais fêmeas das linhagens BALB/c e C57BL/6 que desenvolveram o quadro de neuralgia pós-herpética. NPH = neuralgia pós-herpética. Teste de Fisher,  $p=0.777$ . NPH= neuralgia pós-herpética.

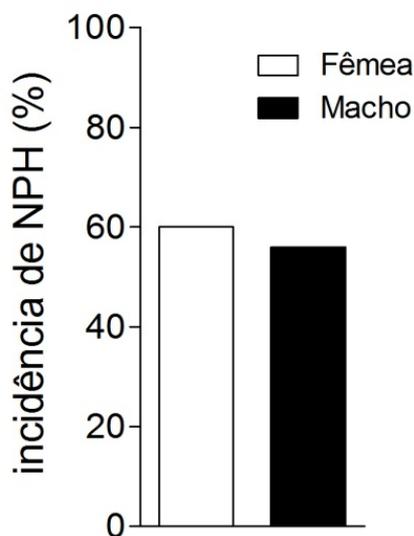
### 4.3.3 O gênero não interfere no desenvolvimento da NPH

A fim de excluir a possibilidade de que o fenômeno observado fosse dependente do gênero dos animais utilizados, repetiu-se o experimento descrito anteriormente comparando o desenvolvimento da NPH em camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/c (n=25/gênero). Novamente, a avaliação de alterações dos limiares nociceptivos mecânicos das patas infectadas e contralaterais foi realizada durante 40 dias após a infecção, com um intervalo de cinco dias entre as medidas. Após este período, observou-se que os camundongos machos desenvolveram a hiperalgesia herpética de maneira semelhante ao observado com fêmeas da mesma linhagem (Figura 25 A). Não houve diferenças significativas entre a frequência de animais machos e fêmeas de uma mesma linhagem que desenvolvem a NPH, sendo que 56% (14 em 25) dos machos e 60% (15 em 25) das fêmeas desenvolveram a NPH (Figura 25 B). Ademais, os grupos (macho e fêmea) apresentaram cinética de redução dos limiares nociceptivos semelhantes. Além de curvas semelhantes da manutenção da hiperalgesia crônica (no grupo de animais que desenvolveram a NPH) ou retorno a valores basais (no grupo que desenvolveu somente a neuralgia herpética), não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos. Desta forma, não foram observadas diferenças no desenvolvimento da neuralgia herpética e NPH entre camundongos de sexos diferentes, de uma mesma linhagem.

A



B

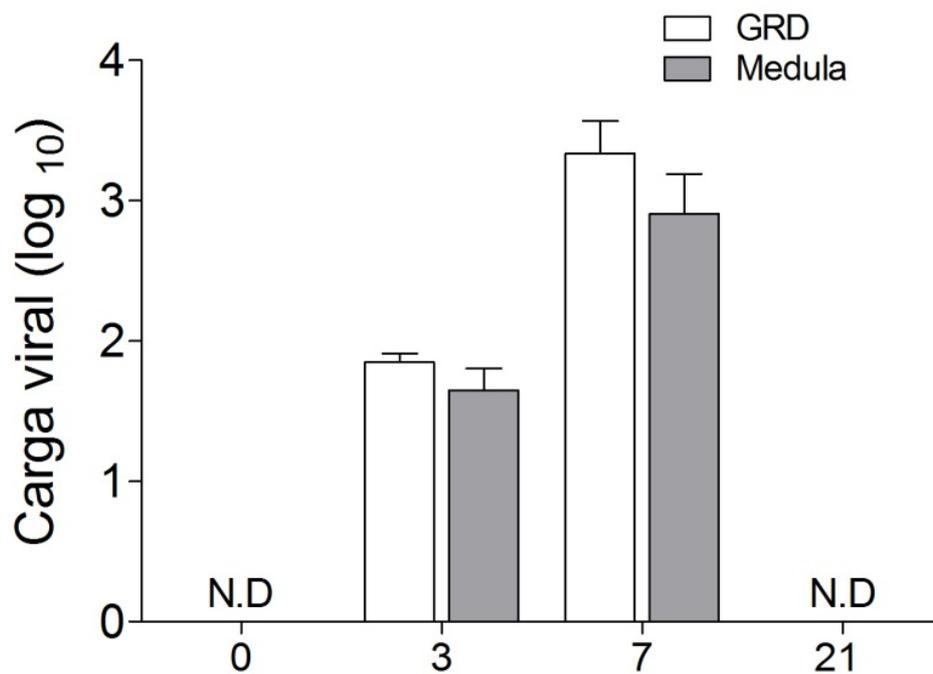


**Figura 25.** O gênero dos camundongos não influencia no desenvolvimento da NPH. Camundongos fêmeas e machos BALB/c foram infectados e a avaliação comportamental foi realizada em ambos os sexos (A) Limiares nociceptivos mecânicos de animais que apresentam o quadro de neuralgia pós-herpética (NPH+) ou que desenvolveram somente a hiperalgesia herpética (NPH-). (B) Porcentagem de animais fêmeas e machos da linhagem BALB/c que desenvolveram o quadro de neuralgia pós-herpética. NPH = neuralgia pós-herpética. Teste de Fisher,  $p=0.777$ . NPH= neuralgia pós-herpética.

#### **4.3.4 Cinética da carga viral dos GRDs no decurso da infecção**

Para a avaliação do decurso temporal da infecção dos GRDs em animais infectados, realizou-se a detecção da carga viral em camundongos da linhagem BALB/c (n=5) infectados, no 3º, 7º e 21º dpi, utilizando "pool" de GRDs L4, L5 e L6.

Observou-se que a infecção dos GRDs pelo HSV-1 já ocorria no 3º dpi (início do quadro hiperalgésico), aumentando no 7º dpi. Porém, o vírus já não é detectado no 21ºdpi (Figura 26), o que sugere que o quadro nociceptivo nesta fase da doença não é dependente da presença viral nos GRDs ou mesmo na medula.



**Figura 26.** O HSV-1 não é mais detectado em estágios tardios da infecção. Camundongos BALB/c foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 ipsilaterais foram coletados em diferentes tempos pós-infecção. O fragmento da medula espinal correspondente foi igualmente coletado. Avaliação temporal da carga viral, detectada por qPCR, nos GRDs ipsilaterais e medula de camundongos infectados.

## **4.4 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento da hiperalgesia pós-herpética**

### **4.4.1 Isomorfismo Farmacológico da NPH murina com a hiperalgesia neuropática**

Para avaliar se a hipersensibilidade nociceptiva persistente em camundongos é resultado de uma possível neuropatia que desenvolve-se após a infecção com HSV-1, bem como observar se este modelo seria adequado para o estudo de novas terapias para a neuralgia humana, decidiu-se avaliar o isomorfismo farmacológico da NPH murina com a humana. Para isto, animais machos da linhagem C57BL/6 que apresentaram quadro de NPH (45° dpi) foram tratados com diferentes drogas utilizadas na clínica para o tratamento de dores neuropáticas, incluindo a pós-herpética.

#### **A) Gabapentina**

A gabapentina é um anticonvulsivante, análogo sintético do GABA, utilizada no tratamento de dores neuropáticas crônicas. Seu mecanismo de ação ainda não foi estabelecido, visto que ela não é capaz de ligar-se a receptores de neurotransmissores (incluindo o de GABA). Em modelos de neuropatia por constrição ou lesão do nervo, ou mesmo na dor neuropática em humanos, incluindo a NPH, a gabapentina tem um importante efeito de redução da dor (Kuraishi et al, 2004).

Dois grupos de animais que desenvolveram NPH foram tratados com gabapentina via oral, nas doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente, enquanto o terceiro grupo constituiu o grupo veículo (PBS). A avaliação de alterações no limiar nociceptivo mecânico nas patas infectadas e contralaterais foi realizada 1, 2 e 24 horas após o tratamento. Os animais tratados com a gabapentina nas duas doses (10 e 50 mg/Kg; via oral) apresentaram redução da hiperalgesia quando comparados a animais veículo (Figura 27 A). A gabapentina não alterou os limiares mecânicos nociceptivos das patas não afetadas pela NPH (contralaterais). O efeito da gabapentina é transiente, não sendo mais observado 24 horas após

o tratamento. Logo, a NPH murina mimetiza neste aspecto a humana, podendo ser utilizada com um importante modelo de desenvolvimento de fármacos para a terapia desta doença.

## **B) Amitriptilina**

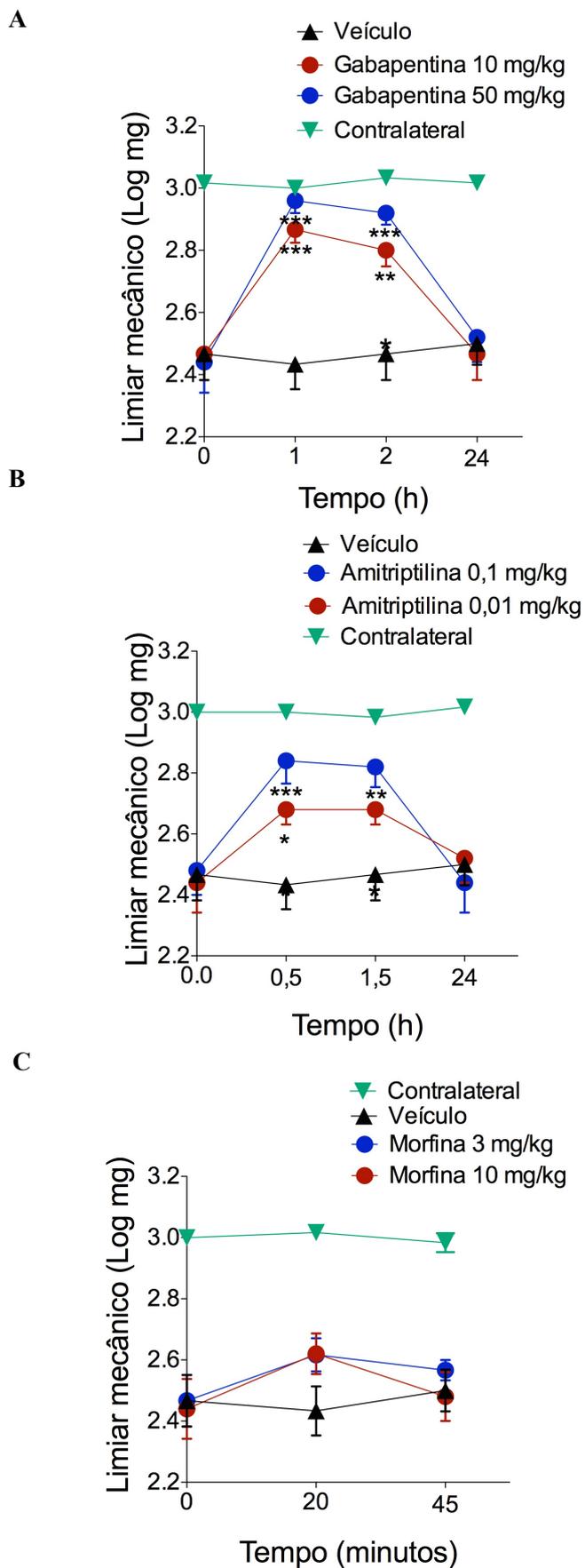
A amitriptilina é uma amina terciária da classe dos antidepressivos tricíclicos, que age primariamente como inibidor da recaptção de serotonina-norepinefrina, com maior efeito no transporte de serotonina e nenhum efeito no transporte de dopamina (Freysoldt et al, 2009). Desta forma, a amitriptilina prolonga a atividade neural destas aminas biogênicas, visto que a recaptção destas é um processo fisiológico importante no encerramento da atividade de transmissão destes neurotransmissores. A amitriptilina tem sido utilizada como um importante adjuvante farmacológico na terapia da dor neuropática. Apesar de ainda não estar claro, acredita-se que os principais efeitos da amitriptilina dependam de vias analgésicas serotoninérgicas.

Para avaliar se a inibição da recaptção de aminas biogênicas poderia ter efeito analgésico na NPH murina, dois grupos de animais que desenvolveram NPH foram tratados com amitriptilina nas doses de 0.01 ou 0.1 mg/kg; via i.p., ou com veículo (PBS). A avaliação de alterações no limiar nociceptivo mecânico nas patas infectadas e contralaterais foi realizada 0.5, 1 e 24 horas após o tratamento. Os animais tratados com a amitriptilina nas duas doses (0.01 ou 0.1 mg/kg) apresentaram redução da NPH quando comparados a animais tratados com Veículo (Figura 27 B). A amitriptilina não alterou os limiares mecânicos nociceptivos das patas não afetadas pela NPH (contralaterais). O efeito da amitriptilina não foi mais observado 24 horas após o tratamento. Logo, a inibição da recaptção de aminas biogênicas tem um efeito analgésico na NPH murina, mimetizando o que é observado em humanos.

### **C) Morfina**

A morfina é um opióide analgésico, que age ativando receptores opióides, os quais são importantes na regulação da transmissão da nocicepção. Apesar de ser um potente analgésico, a baixa eficiência terapêutica da morfina na dor neuropática associada com os efeitos adversos ligados à alta dosagem faz com que esta droga não seja a primeira escolha na terapia das neuralgias (Mayer et al, 1999). Para avaliar se a ativação de receptores opióides poderia ser importante na terapia da NPH, dois grupos de animais que desenvolveram NPH foram tratados com morfina nas doses de 3 e 10 mg/kg; via i.p., ou com veículo (PBS). Em nosso laboratório, a dose de 10mg/Kg é a maior dose que pode ser utilizada em camundongos sem que sejam observados efeitos sedativos que trazem viés à análise do comportamento nociceptivo. A morfina tem um efeito analgésico observado em menos de 30 minutos. Logo, a avaliação de alterações no limiar nociceptivo mecânico nas patas infectadas e contralaterais foi realizada 20 e 45 minutos após o tratamento.

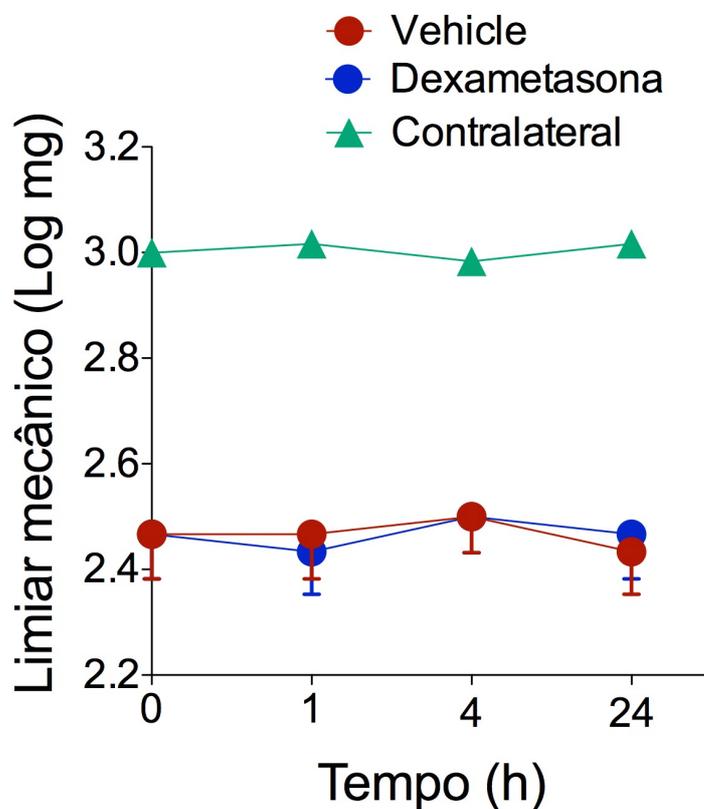
Os animais tratados com morfina não apresentaram redução significativa na NPH em nenhuma das doses, sugerindo que a morfina, e possivelmente outros opióides, realmente não são eficazes na terapia da neuralgia pós-herpética (Figura 27 C).



**Figura 27.** Efeito da gabapentina (A), amitriptilina (B) e morfina (C) na neuralgia pós-herpética. Limiares nociceptivos mecânicos das patas ipsilaterais de animais que apresentaram a NPH, tratados ou não tratados com as drogas. Os valores de patas contralaterais referem-se à média dos valores obtidos de todos os animais avaliados. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### **4.4.2 Papel da inflamação na manutenção da NPH**

A fim de avaliar a participação do processo inflamatório na manutenção da NPH, animais machos da linhagem C57BL/6, que desenvolveram a NPH (45° dpi) foram tratados com o anti-inflamatório esteroide dexametasona (3mg/Kg, via i.p.) ou veículo (PBS). Após 1, 4 e 24 horas, foi realizada a avaliação de alterações nos limiares nociceptivos mecânicos nas patas infectadas e contralaterais. Não foram observados efeitos da inibição sistêmica da inflamação na hiperalgesia da NPH (Figura 28). Vale ressaltar que a dose de 3mg/Kg tem um efeito anti-inflamatório sistêmico. Este resultado sugere que a inflamação não tem um papel importante na manutenção da NPH.

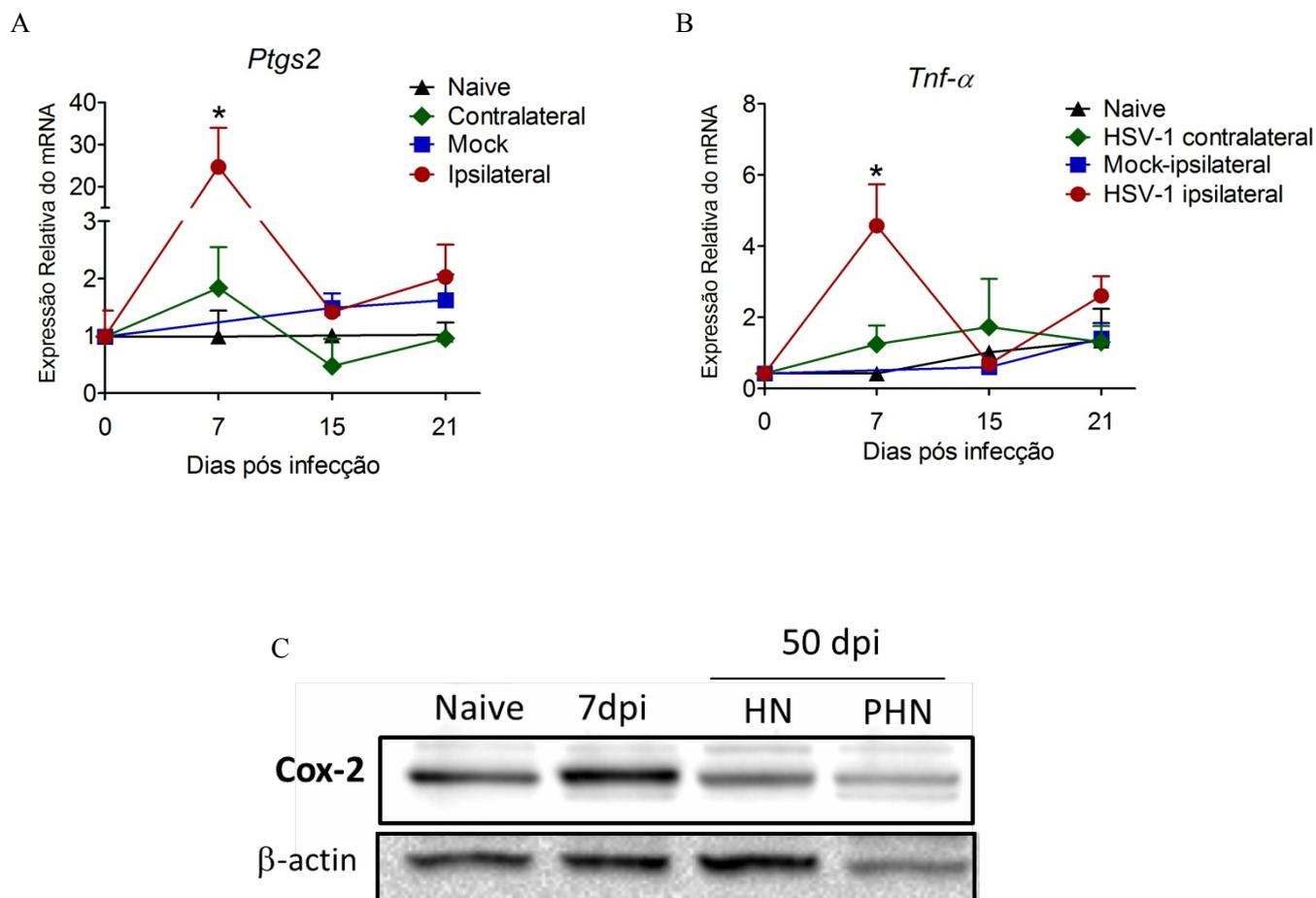


**Figura 28.** A inflamação não é importante durante a NPH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e, após 40 dpi, foram separados entre NPH (+) e NPH (-). Animais NPH (+) foram tratados com a droga dexametasona (3 mg/kg, intraperitoneal). Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de animais que apresentaram a NPH tratados ou não tratados com a droga. Os valores de patas contralaterais referem-se à média dos valores obtidos de todos os animais avaliados. \*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ .

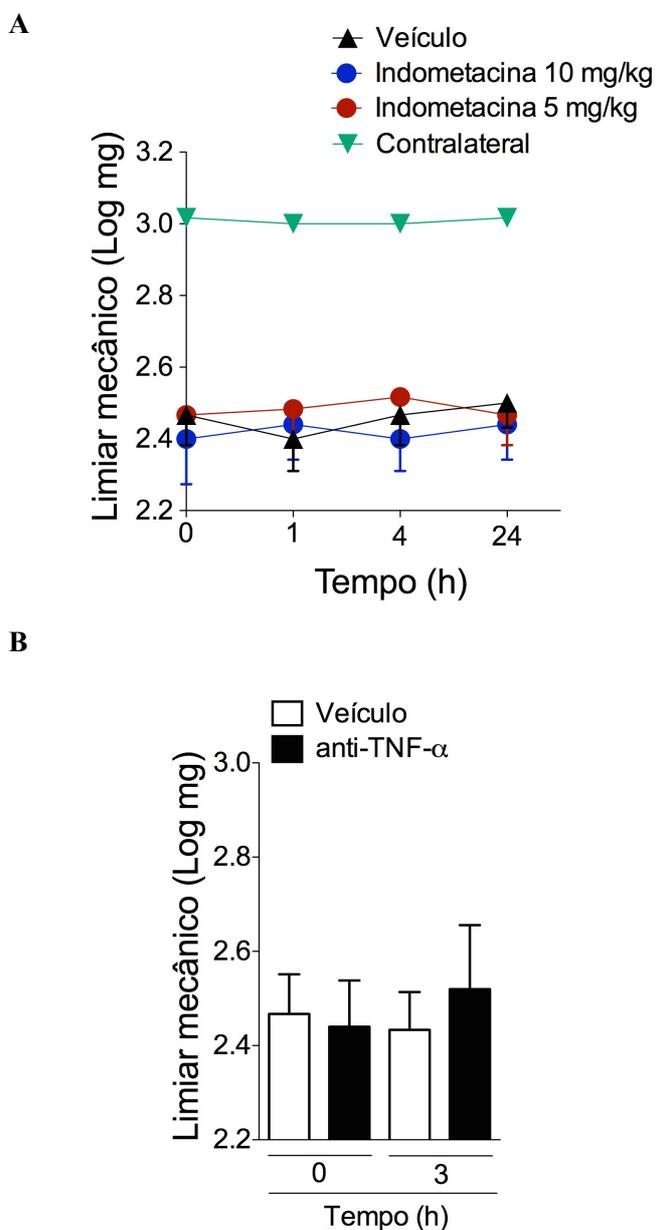
#### 4.4.3 Determinação da expressão de mediadores inflamatórios (COX-2 e TNF- $\alpha$ ) nos GRDs e o seu papel na NPH

Para a confirmação que a inflamação, de fato, não participa do processo de manutenção da NPH, avaliou-se a expressão da COX-2 (*Ptgs2*) e do TNF- $\alpha$  (*Tnf*) nos GRDs de animais com NPH. Observou-se que o pico de expressão destes mediadores inflamatórios ocorre no 7dpi, não sendo mais observado no 21dpi em animais com NPH (Figuras 29 A, B e C). Corroborando estes dados, a inibição sistêmica da COX-2 (indometacina, 5 ou 10 mg/kg; via intraperitoneal) não é capaz de levar à redução da hiperalgesia em animais que desenvolveram a NPH (Figura 30 A). Cabe ressaltar que as doses sistêmicas da indometacina utilizadas neste experimento são eficazes para inibir a dor inflamatória. Logo, a COX-2 é importante para o neuralgia herpética, como conforme demonstrado anteriormente, mas não para a manutenção da NPH.

Ainda, animais que desenvolveram a NPH foram tratados com anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, 1 $\mu$ g/intratecal) para verificação da ação desta citocina na manutenção da NPH. O bloqueio do TNF- $\alpha$  não é capaz de reduzir a hiperalgesia na NPH, sugerindo que o mesmo não é importante para a manutenção da neuralgia pós-herpética (Figura 30 B). Desta forma, conclui-se que a NPH trata-se de uma neuropatia resultante da infecção, e não de um processo inflamatório persistente que poderia contribuir para o quadro de hiperalgesia.



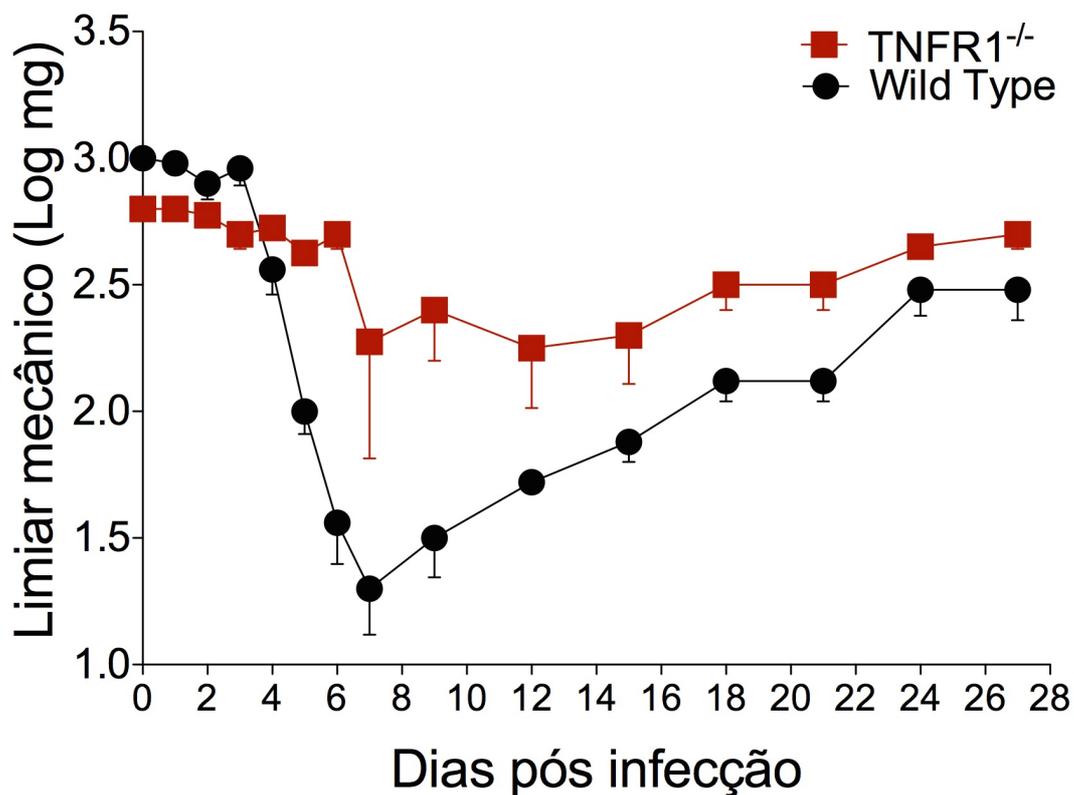
**Figura 29.** Mediadores inflamatórios não são mais detectados em fases tardias da infecção por HSV-1. Camundongos C57BL/6 foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados para análise. Expressão relativa da COX-2 (A) e do TNF- $\alpha$  (B) nos GRDs ipsilaterais e contralaterais de animais infectados, mock e naive. \* $p < 0,001$ . (C) A figura acima mostra 4 linhas de corridas paralelas de extrato dos GRDs marcados transferidos para uma membrana e incubados com anticorpos específicos para COX-2 (70kD) e  $\beta$ -actina (41kD).



**Figura 30.** Mediadores inflamatórios não estão envolvidos na manutenção da hiperalgesia durante a NPH. Camundongos C57BL/6 foram infectados e, após 40 dpi, foram separados entre NPH (+) e NPH (-). Animais NPH (+) foram tratados com as droga indometacina (5 e 10 mg/kg, intraperitoneal) ou infliximab (1  $\mu$ g, intratecal). Limiares nociceptivos mecânicos das patas ipsilaterais de animais que apresentaram a NPH, tratados ou não tratados com indometacina (A) ou Infliximab (B). Os valores de patas contralaterais referem-se à média dos valores obtidos de todos os animais avaliados.

#### 4.4.4 Papel do TNF- $\alpha$ na gênese da NPH

Conforme demonstrado anteriormente, animais TNFR1<sup>-/-</sup> não desenvolvem a hiperalgesia herpética, o que sugere um papel importante da sinalização do TNF- $\alpha$  na gênese e manutenção do comportamento de hiperalgesia. Para avaliação da participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da NPH, camundongos geneticamente deficientes para o receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1<sup>-/-</sup>) ou animais C57BL/6 (WT) foram infectados (n=5), conforme previamente descrito. Observou-se que animais TNFR1<sup>-/-</sup> não desenvolveram a NPH (0 / 5 animais), como observado em animais WT (3 / 5 animais), apresentando apenas um quadro discreto de hiperalgesia que não está mais presente no 27º dpi (Figura 31 A). Para melhor visualização do comportamento apresentado pelos animais TNFR1<sup>-/-</sup>, a análise da hiperalgesia apresentada na Figura 31A está também representada em valores transformados para a escala logarítmica na base 10 ( $\log_{10}$ ) (Figura 31 B). Em conjunto com os resultados apresentados no tópico anterior, isto sugere que os eventos que seguem a ativação do receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR1) são importantes para o processo de gênese, mas não da manutenção da NPH.

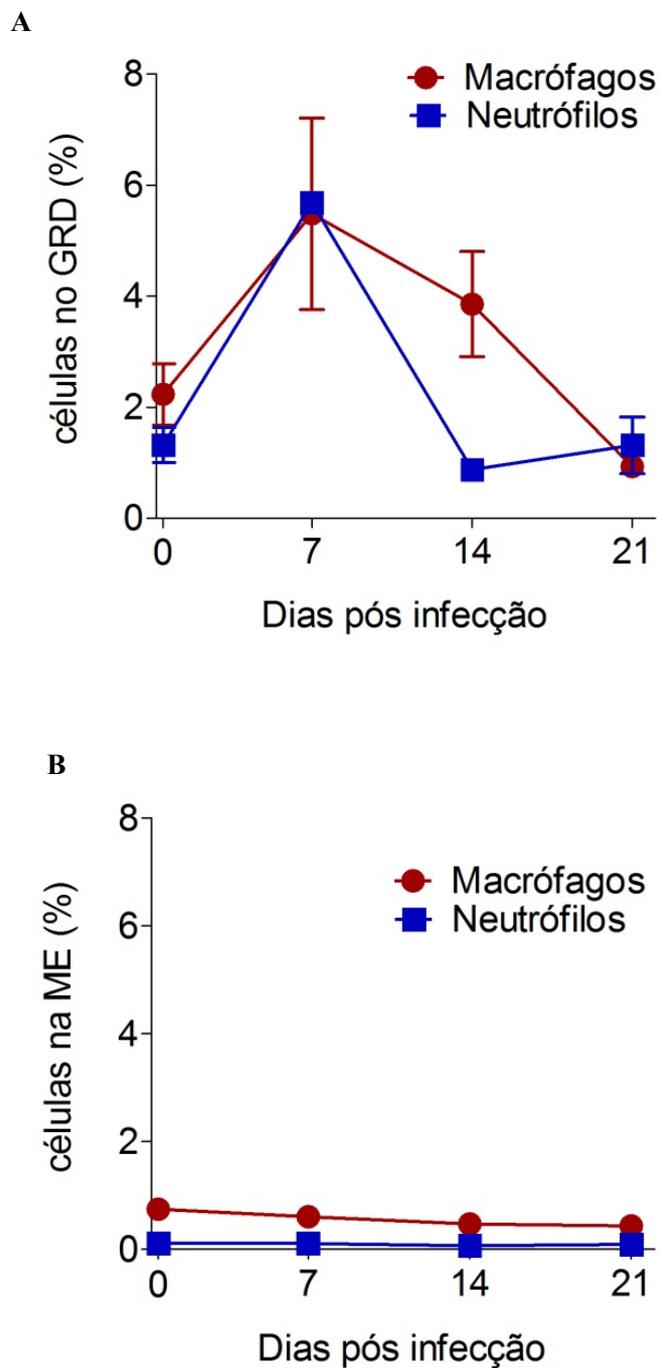


**Figura 42.** O TNFR1 é importante para a gênese da hiperalgesia herpética. Camundongos geneticamente deficientes para o TNFR1 e animais selvagens (Wild Type-C57BL/6) foram infectados e observados até o 27 dpi. Limiares nociceptivos mecânicos (Log mg) das patas ipsilaterais de ambos os grupos.

#### **4.4.5 Caracterização do perfil de leucócitos que infiltram os GRDs durante a infecção por HSV-1**

##### **4.4.5.1 Cinética do Infiltrado de Neutrófilos e Macrófagos nos GRDs de camundongos infectados**

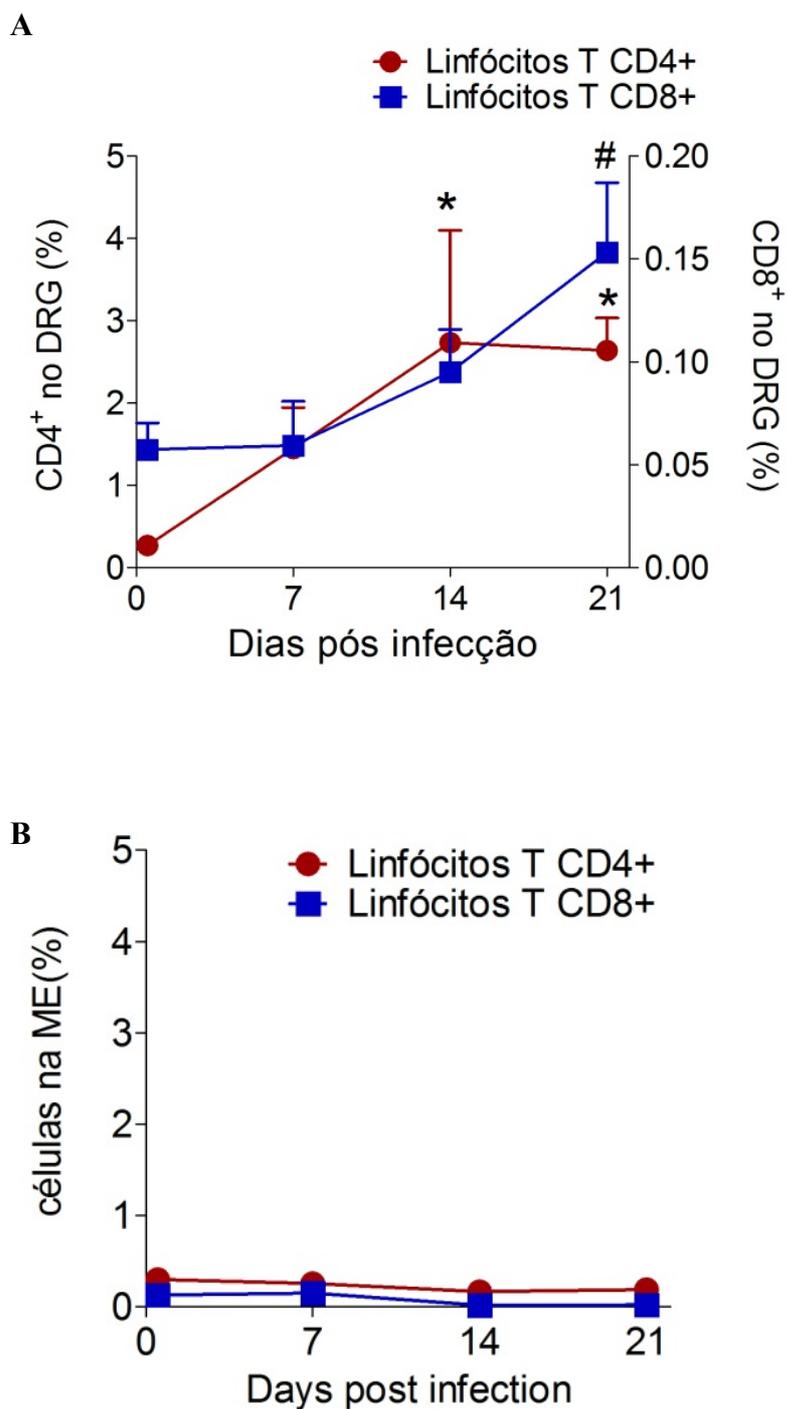
Conforme anteriormente relatado, observou-se que no 7º dpi há um intenso infiltrado de neutrófilos e monócitos/macrófagos nos GRDs (Figuras 9 A e B). Interessantemente, o aumento de neutrófilos nos GRDs é observado somente no período da hiperalgesia herpética (7º dpi), havendo uma diminuição da frequência dos mesmos no período correspondente à NPH (15º e 21º dpi) (Figura 32A). Em relação aos monócitos/macrófagos, sua frequência nos GRDs infectados permanece aumentada no 14º dpi, em relação a animais não-infectados (naive), havendo uma queda significativa deste tipo celular no 21º dpi (Figura 32 A). Não foi observada a infiltração destes subtipos celulares na medula espinal de animais infectados (Figura 32 B).



**Figura 32.** Avaliação do infiltrado inflamatório nos GRDs e Medula de animais infectados durante 21 dias após a infecção. Infiltrado de Neutrófilos (Gr-1/Ly6G+) e Macrófagos (F4/80+) nos GRDs (A) e ME (medula espinal) (B) de animais infectados. \* $p < 0.01$ , comparado ao GRD não infectado.

#### **4.4.5.2 Cinética do Infiltrado de linfócitos T CD4 e T CD8 nos GRDs de camundongos infectados**

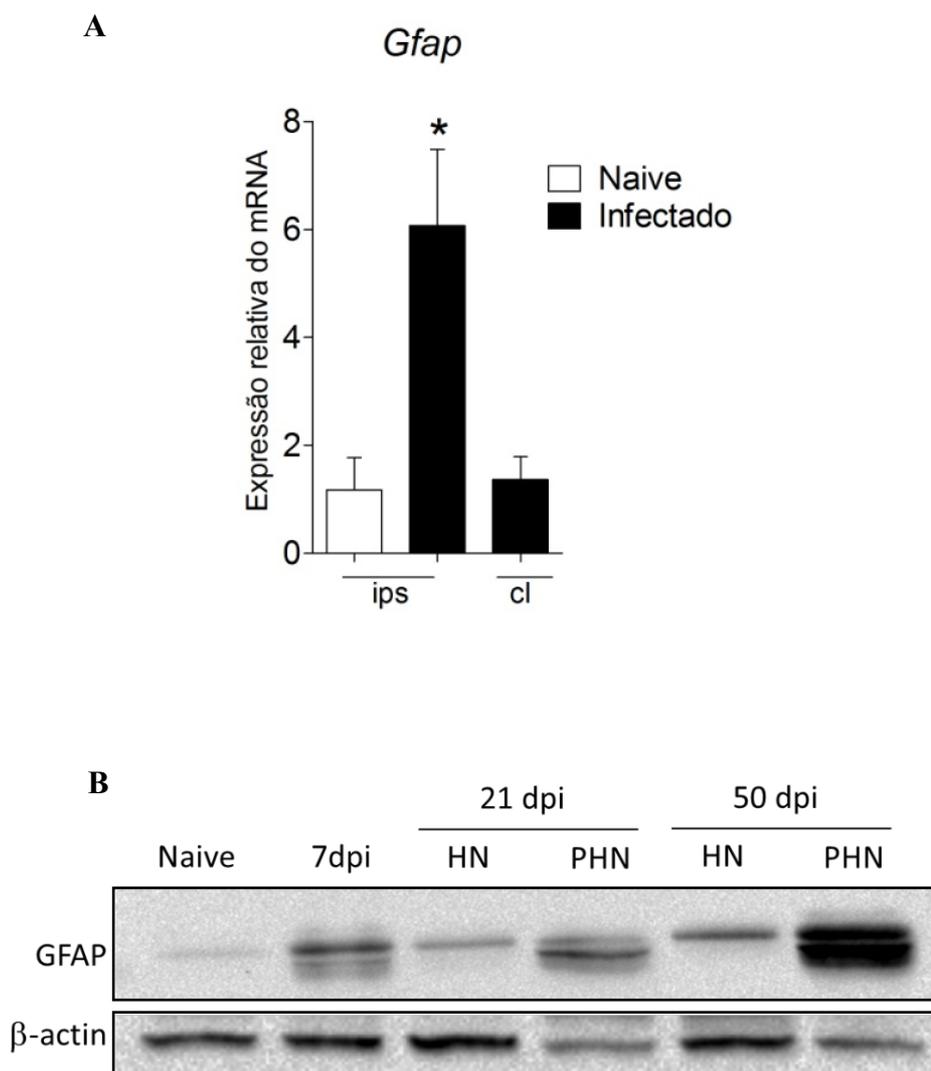
Conforme observado anteriormente, há aumento da frequência de linfócitos T CD4 nos GRDs ipsilaterais de camundongos infectados no 7º dpi (Figura 9C), corroborando os dados da literatura, que afirmam que este subtipo celular é capaz de infiltrar os locais infectados nos primeiros dias pós-infecção herpética ocular. Este aumento persiste no 21º dpi, demonstrando que este tipo celular pode estar envolvido com o desenvolvimento da NPH. As células mais importantes na resposta antiviral na infecção pelo HSV-1 são os linfócitos T CD8. Observou-se que a frequência de células T CD8+ está significativamente aumentada a partir do 14º dpi, e se mantém alta no 21º dpi, nos GRDs de animais infectados, mas estas células são praticamente ausentes nos GRDs de animais naive (Figura 33A). Não foram detectadas alterações nas frequências de linfócitos T CD8 na medula (Figura 33B).



**Figura 33.** Avaliação do infiltrado inflamatório nos GRDs e Medula de animais infectados durante 21 dias após a infecção. Infiltrado de Linfócitos T CD4+ (CD45+ CD4+) e Linfócitos T CD8 (CD45+CD8+) nos GRDs (A) e ME (medula espinal) (B) de animais infectados. \* $p < 0.01$ , comparado ao GRD não infectado.

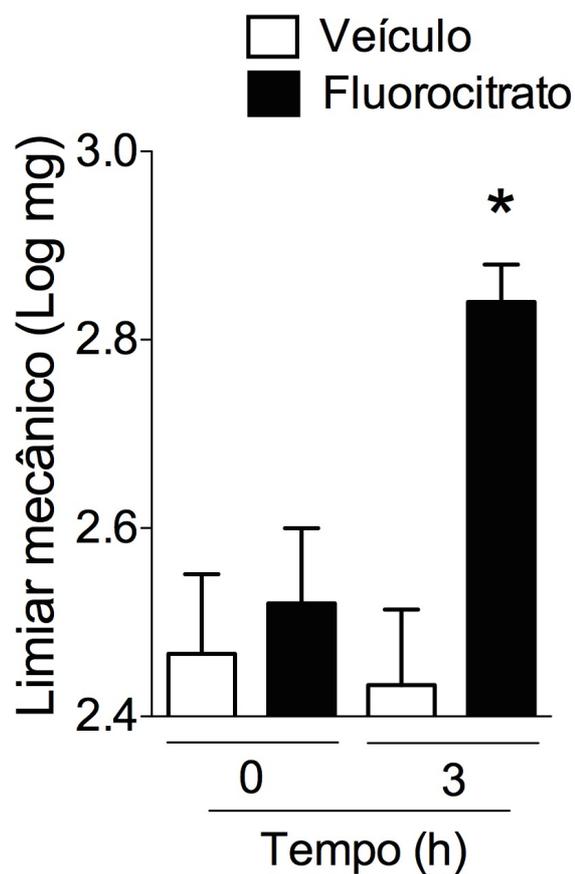
#### 4.4.6 Papel da das células satélites dos GRDs (CSGs) na NPH

Visto que as CSGs são importantes em processos de manutenção da dor neuropática em modelos de constrição e lesão do nervo, avaliou-se a possível participação destas células no processo de manutenção da NPH. Inicialmente, avaliou-se a cinética temporal da ativação de células da glia (células satélites) nos GRDs de animais infectados, utilizando como marcador a detecção da expressão de mRNA do *Gfap*. É possível observar que as CSGs estão ativadas nos GRDs ipsilaterais de animais no 21º dpi, ou seja, em estágios tardios à infecção. Não foram observadas alterações na expressão do *Gfap* nos GRDs de patas contralaterais de animais infectados (Figura 34 A). Posteriormente, avaliou-se as diferenças na ativação das CSGs entre animais que desenvolveram (NPH+) ou não (NPH-) a NPH. Pode-se observar uma intensa ativação das CSGs nos GRDs de animais que desenvolveram a NPH (NPH+), em comparação à animais que não a desenvolveram (NPH-), perceptível já no 21º dpi, com o pico ocorrendo no 50º dpi (Figura 34 B).



**Figura 34.** Células satélites gliais estão ativadas em períodos tardios pós-infecção por HSV-1. Camundongos C57BL/6 foram infectados e os GRDs L4, L5 e L6 foram coletados para análise. (A) Expressão relativa do GFAP nos GRDs ipsilaterais e contralaterais de animais infectados e naive no 21 dpi. \* $p < 0,001$ . (B) A figura acima mostra 4 linhas de corridas paralelas de extrato dos GRDs marcados transferidos para uma membrana e incubados com anticorpos específicos para GFAP (50kD) e  $\beta$ -actina (41kD). Amostras de GRDs provenientes de animais NPH(+) e NPH (-) no 21 e 50 dpi.

Para avaliação do papel destas células na manutenção da hiperalgesia pós herpética, animais que desenvolveram NPH (50 dpi) foram tratados com fluorocitrato (0,2 nmol) pela via intratecal. O fluorocitrato é um inibidor da enzima aconitase, e, nesta concentração, é utilizado como ferramenta farmacológica de inibição da ativação glial (inibidor do metabolismo celular de CSGs e astrócitos), não exercendo efeito na atividade neuronal ou na micróglia. De forma inédita, observou-se que a inibição das CSGs e astrócitos foi capaz de reduzir a hiperalgesia na NPH, sugerindo um papel importante destas células na manutenção da neuralgia pós-herpética (Figura 35).



**Figura 35.** A ativação de células satélites gliais é importante para a manutenção da hiperalgesia herpética. Camundongos C57BL/6 foram infectados e, após 40 dpi, foram separados entre NPH (+) e NPH (-). Animais NPH (+) foram tratados com fluorocitrato (0,3 nmol, intratecal) ou salina (veículo). Limiares nociceptivos mecânicos das patas ipsilaterais de animais que apresentaram a NPH, tratados ou não tratados com fluorocitrato. Limiares nociceptivos mecânicos das patas ipsilaterais de ambos os grupos.\* =  $p < 0,05$ .

## ***5 Discussão***

O trabalho de Takasaki e col (2000) demonstrou, de forma inédita, que a infecção cutânea de camundongos por HSV-1 resulta no desenvolvimento de hiperalgesia do membro infectado, semelhante ao ocorrido no Herpes Zoster (HZ) humano. O estudo demonstra que camundongos BALB/c infectados apresentam comportamento de hiperalgesia do 5° ao 8° dpi, dia final da avaliação comportamental. De maneira semelhante, no presente trabalho observou-se o início do comportamento de hiperalgesia, em ambas linhagens de camundongos utilizadas no estudo (BALB/c e C57BL/6), no 3° dpi. Com relação à carga viral, os gânglios da raiz dorsal localizados na porção lombar da coluna vertebral foram avaliados, e constatou-se haver um maior número de cópias virais nos GRDs L4, L5 e L6, ou seja, naqueles que compõe o nervo ciático, e, portanto, inervam a área infectada. Este dado é inédito na literatura, visto que o trabalho de Takasaki avalia a carga viral somente nos GRDs L4 e L5, e, ainda, utiliza a técnica de PCR convencional, de baixa sensibilidade e semi-quantitativa.

Na infecção aguda, camundongos tratados com morfina, nas doses de 1 e 5 mg/kg, apresentaram redução do comportamento de hiperalgesia de maneira transiente, conforme anteriormente demonstrado (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000). De maneira inédita, o presente estudo demonstrou que o uso local de xilocaína é capaz de atenuar o comportamento de hiperalgesia herpética. A xilocaína é um anestésico que age via inibição não-seletiva de canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes em neurônios aferentes, e o uso tópico de adesivos contendo 5% da droga é aprovado para o tratamento da NPH nos Estados Unidos e Europa. O uso da xilocaína promove alívio da dor e reduz a alodinia em pacientes que apresentam a NPH (Sawynok, 2014). Os dados deste estudo sugerem que este anestésico também é eficaz durante a neuralgia herpética, ou seja, na fase aguda da infecção, a qual corresponderia ao HZ humano.

Com relação à resposta inflamatória decorrente da infecção cutânea por HSV-1, não há dados na literatura correspondentes à avaliação da participação de células inflamatórias na resposta contra o vírus no Sistema Nervoso. O início da resposta imune gera uma inflamação

na pele, com a conseqüente migração de leucócitos, tais quais linfócitos, macrófagos e células dendríticas a este local (Egan *et al.*, 2013). Neste contexto, a produção de mediadores inflamatórios poderia contribuir para o desenvolvimento de hiperalgesia local, ou seja, hipersensibilidade da pata infectada. No entanto, o HSV-1 é capaz de alcançar os GRDs após a infecção cutânea, e, a hipótese inicial deste estudo foi a de que poderia haver também o desenvolvimento de resposta inflamatória no sistema nervoso, que contribuiria para o fenômeno de hiperalgesia. Em outros modelos de infecção por HSV-1, a migração de leucócitos aos gânglios infectados já é conhecida. Em modelos de infecção ocular e vaginal por HSV-1, a presença de células inflamatórias é detectada nos gânglios trigeminais e sacrais, respectivamente (Egan *et al.*, 2013). O único estudo que aborda a migração destas células para GRDs, no modelo de infecção cutânea por HSV-1, demonstra a presença de células CD3<sup>+</sup> em gânglios L4 infectados, sem, contudo, avaliar a função destas células e sua contribuição na hiperalgesia herpética (Sasaki *et al.*, 2008). Neste sentido, o presente estudo foi o primeiro a elucidar a migração e a participação de leucócitos no modelo de hiperalgesia herpética. Através de abordagem farmacológica, demonstrou-se que a inflamação nos GRDs é importante para a manutenção da hiperalgesia herpética, mas não para sua gênese, e que a migração de leucócitos aos gânglios é tardia, ocorrendo a partir do 5<sup>o</sup> dpi. Adicionalmente, investigou-se quais tipos celulares migram aos GRDs na fase aguda da infecção (7 dpi), e observou-se que o infiltrado leucocitário se compõe, majoritariamente, de neutrófilos e macrófagos, além de uma pequena população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Interessantemente, em fases tardias da infecção (14 e 21 dpi), observou-se que neutrófilos e macrófagos já não são mais encontrados nos GRDs, enquanto há aumento tempo-dependente da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nestes locais. De maneira semelhante, na infecção ocular por HSV-1, a migração de células CD11b<sup>+</sup> (macrófagos e neutrófilos), F4/80<sup>+</sup> (macrófagos) e Gr-1<sup>+</sup> (neutrófilos) aos gânglios trigeminais ocorre na fase aguda da infecção (3-7 dpi), enquanto a presença de linfócitos ( T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) é detectada somente em estágios

tardios (a partir do 10° dpi), a qual mantém-se até, pelo menos, 40 dias pós-infecção (Shimeld *et al.*, 1995). A administração de fucoïdina aos animais infectados, bem como o tratamento local com dexametasona, resultaram na redução da hiperalgesia somente a partir do 5° dpi, período correspondente ao início da migração de leucócitos aos GRDs, corroborando a hipótese de que estas células são importantes para a manutenção do estado de hipersensibilidade observado no modelo. Neste sentido, trabalhos utilizando modelos de neuropatia estéril já demonstraram a possível participação destas células inflamatórias que infiltram os GRDs, para a manutenção de estados dolorosos. Perkins e Tracey (2000) demonstraram que 24 horas após a ligadura do nervo ciático, é observada a presença de neutrófilos no tecido lesionado, e que o tratamento dos animais operados com anticorpo anti-neutrófilos resulta na diminuição do comportamento de hiperalgesia. Ademais, foi demonstrado que estas células são capazes de infiltrar os GRDs ipsilaterais, no sétimo dia após a realização da constrição crônica do nervo ciático (Shaw *et al.*, 2008). Evidências da possível contribuição dos neutrófilos para a hiperalgesia foram obtidas em trabalhos *in vitro*, nos quais se observou que estas células são capazes de realizar a ativação de células satélites, bem como de causar hiper-excitabilidade e morte de neurônios dos GRDs (Shaw *et al.*, 2008). A participação de macrófagos na hiperalgesia é um amplo campo de estudo, visto que os mesmos são células residentes nos nervos e GRDs, e participam do processo de degeneração walleriana, no qual fagocitam restos celulares e debris da bainha de mielina degradada (Kiefer *et al.*, 2001). No modelo de ligação parcial do nervo ciático, a depleção destas células através da administração de clodronato reduz a degeneração de fibras mielinizadas e não-mielinizadas, bem como o comportamento de hiperalgesia termal em ratos (Liu, Van Rooijen e Tracey, 2000). Uma semana após a lesão do nervo ciático, é possível observar o infiltrado destas células nos GRDs correspondentes, de maneira semelhante ao observado no presente trabalho (Hu e Mclachlan, 2002; 2003; Hu *et al.*, 2007). Alguns trabalhos, que utilizam modelos de neuropatia estéril, também sugerem a participação de linfócitos T CD4+ na

hiperalgesia. Inicialmente, linfócitos T foram identificados no local da injúria do nervo em três modelos de dor neuropática estéreis (Cui *et al.*, 2000). De maneira semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, o infiltrado de linfócitos é detectado a partir do sétimo dia após a cirurgia, com o pico da migração destas células ocorrendo no 21º dia pós-operação. Estes linfócitos parecem desempenhar um importante papel na hiperalgesia resultante de constrição do nervo ciático, visto que ratos nude, que não possuem linfócitos T, apresentam menor hipersensibilidade térmica e alodinia mecânica, quando comparados a animais selvagens. Ainda, a transferência adotiva de linfócitos Th1 a ratos nude resulta no aumento da hipersensibilidade, comparável à observada em animais selvagens (Moalem, Xu e Yu, 2004). De maneira semelhante, a transferência adotiva de linfócitos Th1 a camundongos deficientes para células CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>-/-</sup>) resultou no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (Cao e Deleo, 2008). Em suma, os dados apresentados no presente trabalho sugerem que os leucócitos que migram aos GRDs, durante a infecção por HSV-1, possuem um importante papel, assim como demonstrado em diversos modelos de neuropatia.

A possível participação destes leucócitos durante a infecção herpética é a de produção de mediadores inflamatórios. De fato, trabalhos utilizando modelos de dor neuropática já demonstraram essa função de células inflamatórias durante a hiperalgesia. Neutrófilos e macrófagos que infiltram os nervos e gânglios após a injúria neural são capazes de produzir TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, dois importantes mediadores da nocicepção (Sommer, Schmidt e George, 1998; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2008). Nesse sentido, observou-se um aumento tempo-dependente da expressão do mRNA do TNF- $\alpha$  e COX-2 nos GRDs infectados por HSV-1. Na avaliação temporal, detectou-se um discreto aumento da expressão de ambos mediadores no 5º dpi, com o pico ocorrendo no 7º dpi. Interessantemente, este aumento coincidiu com o padrão observado para a migração de leucócitos, no qual há a presença de um pequeno infiltrado no 5º dpi, o qual aumenta de maneira significativa no 7º dpi, sugerindo que, de fato, células inflamatórias que infiltram os GRDs são importantes para a produção do

TNF- $\alpha$  e COX-2. De fato, a administração de fucoidina aos animais infectados resultou na diminuição da expressão do mRNA destes mediadores nos GRDs infectados, em comparação a animais não tratados.

O TNF- $\alpha$  é a principal citocina pró-inflamatória, capaz de induzir outras citocinas e quimiocinas, e tem uma importante participação na hiperalgesia. A administração desta citocina no nervo ciático ou GRDs de animais naive resulta em mudanças fisiológicas nos neurônios, como disparos ectópicos em fibras A $\delta$ , A $\beta$  e C, agindo, portanto, diretamente na sensibilização de nociceptores (Sorkin *et al.*, 1997). Comportamentalmente, estas mudanças eletrofisiológicas estão associadas com a indução de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (Homma, Brull e Zhang, 2002; Murata *et al.*, 2006). Ainda, após a injúria neural, há aumento da expressão do mRNA desta citocina nos GRDs correspondentes, bem como aumento da sensibilidade dos neurônios ao TNF- $\alpha$  exógeno (Sommer, 1999; Schafers *et al.*, 2003). A importância da participação desta citocina durante a hiperalgesia herpética foi confirmada com o uso de animais geneticamente deficientes para o receptor do tipo 1 (TNFR1) do TNF- $\alpha$ , além da interferência farmacológica na ação deste mediador através da administração de anticorpo neutralizante para TNF aos animais infectados. Diversos trabalhos sugerem que a ativação do TNFR1, mas não do TNFR2 (outro receptor no qual a citocina pode ligar-se) é fundamental para o estabelecimento da hiperalgesia. Em ratos naive, a ativação do TNFR1, mas não do TNFR2, induziu hipersensibilidade *in vivo*, além de disparos ectópicos de neurônios dos GRDs *in vitro* (Schafers *et al.*, 2008). Ainda, no modelo de constrição crônica do nervo ciático, o tratamento epineural de camundongos com anticorpos neutralizantes para TNFR1 resultou na redução na hiperalgesia térmica e alodinia mecânica, comparável a de animais tratados com anticorpos neutralizantes para TNF. No entanto, o uso de anticorpos neutralizantes para TNFR2 não teve efeito no comportamento de hipersensibilidade nociceptiva (Sommer, Schmidt e George, 1998). A interferência farmacológica na sinalização do TNF- $\alpha$ , através do uso de anticorpos neutralizantes ou antagonistas de receptores, resulta

na reversão da hipersensibilidade dolorosa em modelos de injúria neural, mesmo quando o tratamento é iniciado após o estabelecimento da hiperalgesia (Bennett, 2000; Lindenlaub *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2011). Portanto, o presente trabalho demonstrou que, após a infecção cutânea por HSV-1, ocorre a produção desta citocina nos GRDs de animais infectados, a qual tem importante participação na geração e manutenção da hiperalgesia.

A enzima COX-2 é uma das isoformas de ciclooxigenases, responsáveis pela conversão do ácido aracônico em prostanóides. As prostaglandinas, principalmente as da série E, são capazes de sensibilizar diretamente os nociceptores, desencadeando a hipernocicepção. A habilidade das prostaglandinas em sensibilizar diretamente os nociceptores foi observada em humanos e animais, com a utilização de técnicas eletrofisiológicas e também comportamentais (Ferreira, 1972; Ferreira, Lorenzetti e Correa, 1978). Dentre as prostaglandinas mais importantes no desencadeamento da hipernocicepção, destaca-se a PGE<sub>2</sub>, a qual é capaz de induzir hiperalgesia por agir diretamente nos nociceptores, diminuindo limiar de excitabilidade necessário para ativá-los (Kumazawa, Mizumura e Koda, 1993). De fato, a administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> em ratos e camundongos, é capaz de induzir a hiperalgesia mecânica (Cunha *et al.*, 2012). O bloqueio da ação da enzima, através da administração sistêmica de indometacina, é capaz de aliviar a hiperalgesia mecânica em ratos após a injúria do nervo ciático (Syriatowicz *et al.*, 1999). De maneira semelhante, os resultados deste estudo demonstraram que a administração sistêmica de indometacina no 7º dpi resultou em redução transiente da hiperalgesia herpética. Em outros trabalhos, a administração sistêmica de diclofenaco, o qual age bloqueando a ação de ciclooxigenases, também resultou em redução transiente e dose-dependente da hiperalgesia mecânica herpética (Takasaki, Andoh, Nitta, *et al.*, 2000). Ademais, no presente estudo, a administração intratecal diária de indometacina resultou na redução do comportamento de hiperalgesia herpética em animais infectados, durante todo o período analisado (8 dias pós-infecção). De forma semelhante, Yamamoto e Nozaki-Taguchi (2000) demonstraram que a

administração intratecal de indometacina inibe as respostas de fase 1 e 2 no teste de formalina em ratos. Resultados idênticos foram obtidos com a administração intratecal de celecoxibe, um inibidor seletivo da enzima COX-2 (Nishiyama, 2006). Ainda, a administração intratecal de ketorolac, um inibidor não-seletivo de COX, resulta em inibição da resposta ao teste de formalina (ambas fases) e reduz a ativação neural no corno dorsal da medula, ipsilateral à administração intraplantar (Lee e Seo, 2008). Estes resultados em conjunto sugerem, portanto, que as prostaglandinas são capazes de elicitar o comportamento de hiperalgisia quando são produzidas no sistema nervoso, a saber GRDs, e são cruciais para a gênese e manutenção da hiperalgisia herpética.

Em um processo infeccioso, as respostas inflamatórias são iniciadas após o reconhecimento do patógeno através de receptores de reconhecimento padrão, dentre os quais os receptores do tipo Toll (TLRs). Diversos trabalhos já demonstraram sua participação no reconhecimento do HSV-1, sendo os mais importantes e estudados no processo os TLRs 2, 3, 4 e 9. A ativação de todos estes TLRs, com exceção do TLR3, envolvem o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, o qual culmina na ativação de NF- $\kappa$ B e consequente produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-1 $\beta$ , bem como TNF- $\alpha$  (Takeda e Akira, 2004). Neste sentido, o presente estudo avaliou o papel desta molécula na infecção cutânea por HSV-1 e sua participação na hiperalgisia herpética. Para tal, camundongos geneticamente deficientes para esta proteína foram utilizados e observou-se o atraso no desenvolvimento da hiperalgisia herpética, em relação a animais selvagens. O valor máximo de redução do limiar nociceptivo mecânico foi semelhante para ambos grupos no 8º dpi. No entanto, em animais selvagens, a hiperalgisia começa a se desenvolver no 3º dpi, enquanto em animais MyD88<sup>-/-</sup>, a redução dos limiares nociceptivos mecânicos passa a ocorrer a partir do 6º dpi. Boivin e col (2007) demonstraram que animais geneticamente deficientes para MyD88 apresentam menor produção de IL-1 $\beta$  e MCP-1, associada ao menor recrutamento de macrófagos para o local da lesão no nervo ciático e menor comprometimento locomotor. Em relação ao reconhecimento do

HSV-1, o MyD88 também apresenta um importante papel, visto que animais deficientes para esta proteína são mais suscetíveis à infecção intranasal, apresentando maior migração de vírus ao cérebro, sinais severos de encefalite e maior mortalidade, em comparação a animais selvagens (Mansur *et al.*, 2005). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem, portanto, que o MyD88 é importante para a gênese da hiperalgesia herpética, mas não está relacionado a fases tardias da mesma, ou seja, naquelas em que o processo inflamatório é importante. Visto que o MyD88 é uma proteína adaptadora comum a todas as vias de TLRs, com exceção do TLR3, objetivou-se avaliar a participação destes receptores no desenvolvimento da hiperalgesia induzida por HSV-1. Os TLRs 2 e 9 são os receptores mais estudados no contexto de infecção por HSV-1 e diversos trabalhos verificaram sua participação no reconhecimento viral. Cai e col (2013) demonstraram que a glicoproteína B do HSV-1 é reconhecida pelo TLR2, culminando na ativação de NF- $\kappa$ B em uma via dependente de MyD99/TRAF6 e consequente expressão de citocinas pró-inflamatórias. Em modelos de encefalite herpética, o papel do TLR2 ainda é controverso. Alguns trabalhos demonstram que a ausência deste receptor é benéfica, resultando em menor mortalidade e danos reduzidos ao sistema nervoso, devido à menor inflamação neste local (Kurt-Jones *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Entretanto, outros sugerem que a expressão de TLR2, em conjunto com o TLR9, é um fator de resistência ao vírus (Berezky-Veress *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2010). No modelo de infecção cutânea, constatou-se que o desenvolvimento do comportamento hiperalgésico em animais TLR2<sup>-/-</sup> e TLR9<sup>-/-</sup> ocorre de maneira semelhante aos animais selvagens, ou seja, a deficiência destes receptores não mimetiza o fenótipo observado pela deficiência do MyD88. De maneira semelhante, Mansur e col (2005) demonstraram que a ausência do TLR2 não torna os animais mais suscetíveis à encefalite herpética, conforme observado para animais deficientes para MyD88. No entanto, a ausência de receptores TLRs 2 e 9 acarreta em maior mortalidade dos animais devido à maior susceptibilidade ao vírus, bem como menor expressão de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  no cérebro. Estes trabalhos, assim como os resultados obtidos no

presente trabalho, sugerem que a ativação de múltiplos TLRs ocorre durante a infecção herpética, os quais seriam responsáveis pelo recrutamento de MyD88. Além dos TLRs 2 e 9, o TLR4 também é capaz de recrutar a proteína MyD88 e elicitar o início da resposta inflamatória. Em modelos de encefalite herpética, a ausência deste receptor não resultou em mudanças fisiopatológicas dos camundongos infectados, quando comparados a animais selvagens (Kurt-Jones *et al.*, 2004). No entanto, a infecção por HSV-1 induz a expressão deste receptor em astrócitos (Villalba *et al.*, 2012). Os resultados deste estudo demonstraram que o desenvolvimento do comportamento de hiperalgesia em animais TLR4<sup>-/-</sup> foi semelhante ao de animais selvagens até o 4º dpi. No entanto, a partir deste período, a hiperalgesia de animais deficientes para este receptor foi significativamente menor, em comparação a animais selvagens. Provavelmente a atenuação do comportamento de hiperalgesia dos animais TLR4<sup>-/-</sup> se deva ao importante papel deste receptor durante os estágios dolorosos. Em modelos de dor neuropática e inflamatória, é detectado o aumento da expressão do TLR4 em diferentes regiões do sistema nervoso. Em modelos de dor neuropática, demonstrou-se que animais TLR4<sup>-/-</sup> apresentam hipersensibilidade nociceptiva diminuída, associada a menor ativação glial, bem como menor produção de citocinas inflamatórias (Tanga, Nutile-Mcmenemy e Deleo, 2005). Ademais, o TLR4 está expresso em aproximadamente 40% dos neurônios em GRDs, e sua ativação culmina no aumento da expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e COX-2 neste local. Neste sentido, é provável que a participação do TLR4 na hiperalgesia herpética esteja relacionada à sua importante função na hipersensibilidade nociceptiva. Por fim, o único TLR que não utiliza a proteína adaptadora MyD88 é o TLR3, o qual age recrutando TRIF. Experimentos utilizando animais TLR3<sup>-/-</sup> demonstraram que o reconhecimento de RNA fita dupla viral por este receptor é fundamental para a proteção contra a encefalite herpética (Menasria *et al.*, 2013). De maneira semelhante, mutações do receptor em humanos estão associadas ao maior risco do desenvolvimento de encefalite herpética (Herman *et al.*, 2012).

No entanto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que este receptor não é importante para o desenvolvimento da encefalite herpética.

A sinalização da IL-1 $\beta$ , semelhantemente ao ocorrido com os TLRs, envolve a participação do MyD88. Neste sentido, avaliou-se a participação desta citocina na hiperalgesia herpética. Em animais deficientes para o receptor da IL-1, demonstrou-se que o desenvolvimento do comportamento de hiperalgesia ocorre de maneira semelhante aos animais selvagens. Diversos trabalhos na literatura sugerem que a IL-1 $\beta$  tem papel fundamental na proteção contra a encefalite herpética, pois sua produção estimula a expressão de citocinas e quimiocinas no cérebro infectado (Sergeie, Rivest e Boivin, 2007). Em processos dolorosos, observou-se o aumento da expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  algumas horas após a injúria do nervo (Jander *et al.*, 1998). Ademais, a injeção intraplantar ou intratecal de IL-1 $\beta$  culmina no desenvolvimento de hipersensibilidade dolorosa (Follenfant *et al.*, 1989; Sung *et al.*, 2012). No entanto, neste modelo de infecção cutânea por HSV-1, esta citocina parece não desempenhar um papel importante na hiperalgesia.

Além do importante papel da inflamação na hiperalgesia herpética, este estudo mostrou que células da glia participam na manutenção da hipersensibilidade dolorosa. Nos GRDs, as células-satélite da glia (CSGs) permeiam os neurônios e sustentam a transmissão sensorial e nocicepção através da manutenção da homeostase metabólica e iônica. Em modelos de neuropatia e inflamação periférica, as CSGs são ativadas e proliferam (Lu e Richardson, 1991). De forma semelhante, demonstrou-se que estas células são ativadas no 7<sup>o</sup> dpi, e exercem importante papel na hiperalgesia herpética, visto que camundongos infectados e tratados com fluorocitrato exibiram menor comportamento de hiperalgesia em relação a camundongos não tratados. A provável função destas células no contexto da infecção por HSV-1 é o de produzir mediadores que sensibilizam os neurônios, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e neurotrofinas, como NGF e BDNF (Dubovy *et al.*, 2006). Como as CSGs não são permissivas

à infecção pelo HSV-1, são provavelmente ativadas através da liberação de substâncias, como o ATP, por neurônios infectados (Ohara, Tauscher e Lavail, 2001).

Além da hiperalgesia herpética, este estudo caracterizou a neuralgia pós-herpética (NPH) no modelo de infecção cutânea por HSV-1. Em humanos, a NPH é descrita como persistência da dor durante, pelo menos, três meses após o desaparecimento das lesões características do Herpes Zoster. As três principais características da dor neuropática são observadas na NPH, a saber: dor estímulo-independente, alodinia e dores lancinantes intermitentes, provocadas por estímulo ou estímulo-independentes. Na literatura, não há um critério estabelecido para determinação da NPH murina. Dessa forma, adotou-se o mesmo critério utilizado na clínica para classificar a NPH, ou seja, para camundongos, a NPH seria o quadro hiperalgésico que persiste após o desaparecimento das lesões zosteriformes (após o 15° dpi). Os resultados do presente trabalho demonstraram que a lesão zosteriforme desaparece em torno do 15° dpi em ambas as linhagens de camundongos (BALB/c e C57/BL6), corroborando dados prévios da literatura, e que, desta maneira, a NPH seria a hiperalgesia persistente detectada a partir deste período (Sato-Takeda *et al.*, 2006). De fato, observou-se que o comportamento de hiperalgesia permanente, que caracteriza a NPH, tornou-se evidente a partir do 20° dpi em camundongos de ambas as linhagens. Alguns trabalhos publicados consideraram a NPH evidente a partir do 20°, 30° e 35° dpi (Sato-Takeda *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2008). A fim de excluir a possibilidade de análise incorreta dos resultados obtidos, nos experimentos de caracterização da NPH animais que apresentaram hiperalgesia persistente a partir do 40° dpi foram utilizados.

Os resultados deste estudo demonstraram que a hiperalgesia persistente acomete 56% de camundongos fêmeas BALB/c e 48% de fêmeas C57BL/6, não havendo diferença significativa entre a incidência de NPH entre animais das duas linhagens. Sato-Takeda e col (2006) demonstraram que a NPH acomete 35% dos animais fêmeas da linhagem BALB/c e 75% de animais C57BL/6, havendo, portanto, uma diferença significativa no

desenvolvimento da NPH entre estas linhagens. No entanto, a metodologia para avaliação comportamental utilizada neste trabalho difere daquela utilizada neste estudo, e considera, inclusive, a resposta ao filamento de 1,0g como comportamento de hiperalgesia. Outros trabalhos posteriores do próprio grupo apresentaram resultados divergentes, visto que já foram demonstradas incidências de 57% em fêmeas C57BL/6 e de 50% em fêmeas BALB/c (Takasaki *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2008). Ainda, diversos trabalhos demonstram que camundongos BALB/c são mais suscetíveis à infecção por HSV-1, sendo mais propensos a desenvolver encefalite herpética (Egan *et al.*, 2013). Neste sentido, provavelmente não apresentariam menor incidência da NPH, conforme relatado por Sato-Takeda e col (2006), em comparação a camundongos da linhagem C57BL/6.

De maneira inédita, este estudo demonstrou não haver diferenças significativas no desenvolvimento da NPH entre fêmeas e machos da mesma linhagem, com 56% de incidência (14 em 25) dos machos e 60% (15 em 25) das fêmeas. Diversos estudos demonstraram que limiares de dor são menores em mulheres, bem como em fêmeas experimentais (Mensah-Nyagan *et al.*, 2009). Esteróides femininos e masculinos são, sabidamente, fatores essenciais para a diferença no comportamento de nocicepção observada entre os gêneros, e variações nos níveis de hormônios sexuais, expressão de receptores e sua ação no sistema nervoso, foram correlacionados com o desenvolvimento de dor crônica (Aloisi, Ceccarelli e Fiorenzani, 2003). De fato, androgênios, particularmente a testosterona, encontrada em maiores quantidades em machos, é capaz de exercer efeitos analgésicos em humanos e animais experimentais, enquanto estrógenos podem exercer efeitos analgésicos ou hiperalgésicos, dependendo das condições (Aloisi, Ceccarelli e Fiorenzani, 2003). Interessantemente, mulheres são mais suscetíveis ao desenvolvimento da NPH (Jung *et al.*, 2004). No entanto, no modelo experimental de infecção cutânea por HSV-1, o gênero não foi um fator importante para o desenvolvimento da NPH.

Para avaliação do isomorfismo farmacológico da NPH murina com a humana, utilizou-se drogas comumente empregadas para o tratamento da dor neuropática. Em casos severos de dor causada pelo Herpes Zoster ou NPH, drogas anticonvulsivantes, como a gabapentina, antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina, e analgésicos opióides, como a morfina, são indicados para o tratamento dos pacientes (Gan, Tian e Tey, 2013). Desta forma, as três drogas foram utilizadas para o tratamento de animais que apresentaram NPH. A administração de gabapentina (doses 10 e 50 mg/kg) resultou em redução transiente do comportamento hiperalgésico em camundongos machos da linhagem C57BL/6 acometidos pela NPH. Outros trabalhos na literatura demonstraram que, de fato, a administração de gabapentina resulta em redução da hiperalgesia no modelo murino da NPH. O tratamento de camundongos fêmeas BALB/c no 35° dpi com a droga (doses 30 e 100 mg/kg) resultou em redução transiente e dose-dependente da hiperalgesia observada na NPH (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000). Ainda, a gabapentina administrada na dose de 30 mg/kg é capaz de inibir a alodinia estática e dinâmica em camundongos C57BL/6 acometidos pela NPH (Sasaki *et al.*, 2008). De maneira semelhante, o uso de gabapentina no tratamento da NPH humana tem se mostrado eficaz para reduzir a dor (Moore *et al.*, 2014). De forma inédita, este estudo demonstrou que o tratamento com amitriptilina é capaz de reduzir o comportamento de hiperalgesia persistente, de uma maneira dose-dependente. Kuraishi e col (2004) demonstraram que o tratamento de camundongos com a droga, do 5° ao 11° dpi, resultou em redução da incidência de NPH dentre os camundongos infectados, mas não mostrou efeito quando iniciado durante a NPH murina, ou seja, a partir do 30° dpi. Ainda, Takasaki e col (2000) não observaram o efeito analgésico da droga durante a fase aguda da hiperalgesia herpética, ou seja, no 6° dpi. Entranto, estudos clínicos demonstram a eficácia no uso de antidepressivos tricíclicos, dentre os quais a amitriptilina e nortriptilina, no tratamento da NPH em humanos (Higa, Shono e Nitahara, 2010). Finalmente, a administração de morfina, nas doses de 3 e 10 mg/kg, não foi capaz de reduzir o comportamento de hiperalgesia em

camundongos acometidos pela NPH. Takasaki e col (2002) demonstraram, de maneira oposta à observada neste estudo, que a morfina é capaz de reduzir a hiperalgesia e a alodinia durante a NPH murina (Takasaki *et al.*, 2002). No entanto, o tratamento foi efetuado mais precocemente (25° dpi) e, conforme mencionado anteriormente, a metodologia utilizada para avaliação comportamental difere da usada neste estudo. Outras evidências na literatura sugerem que, de fato, a morfina não é eficaz no tratamento da NPH murina. Takasaki e col (2006) demonstraram que há redução na expressão de receptores  $\mu$ -opiídeos no corno dorsal da medula e GRDs de animais que apresentaram a NPH, enquanto os níveis de expressão deste receptor estão inalterados nestes tecidos durante a hiperalgesia herpética, ou seja, na fase aguda da infecção. Cabe ressaltar que os receptores  $\mu$ -opiídeos medeiam os efeitos da morfina, sendo responsáveis por efeitos tais como analgesia supraespinal, depressão respiratória, euforia, sedação, diminuição da motilidade gastrointestinal, bem como dependência física. De acordo com estes dados, a morfina não poderia agir em seus receptores e produzir analgesia durante a NPH murina, em concordância ao fenômeno observado nos experimentos realizados neste estudo.

Conforme demonstrado, a inflamação tem um importante papel durante a hiperalgesia herpética, entretanto sua participação na fase pós-herpética ainda não havia sido determinada. Neste sentido, investigou-se a participação da inflamação e mediadores na fase tardia da infecção cutânea por HSV-1. Inicialmente, a dexametasona foi utilizada no tratamento de camundongos acometidos pela NPH, e não a redução da hiperalgesia mecânica não foi observada. Os efeitos anti-inflamatórios da dexametasona provém da inibição da expressão de colagenase e citocinas pró-inflamatórias durante os processos inflamatórios (Firestein, Paine e Littman, 1991; Barnes e Adcock, 1993; Sibilía, 2003). Desta maneira, o uso terapêutico deste esteróide é considerado a estratégia mais efetiva no controle da dor inflamatória (Belvisi e Hele, 2003). De fato, observou-se que a hiperalgesia herpética é resultado da inflamação, e a dexametasona foi eficaz em reduzir o comportamento de hipersensibilidade nociceptiva. No

entanto, a ausência de efeito durante a NPH sugere que células e mediadores inflamatórios não têm participação na manutenção do estado doloroso. A análise da expressão dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e COX-2 nos GRDs revelou que ambos não estão envolvidos em fases tardias da hiperalgesia no modelo de infecção cutânea por HSV-1. Ainda, o tratamento de camundongos que apresentaram a NPH com a indometacina ou o anticorpo neutralizante para TNF não resultou em redução do comportamento de hiperalgesia. De maneira semelhante, o tratamento de animais acometidos pela NPH com diclofenaco, capaz de inibir de maneira não seletiva a enzima COX, não foi capaz de reduzir o comportamento de hiperalgesia ou a alodinia estática ou dinâmica (Takasaki *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2008). Apesar das evidências do envolvimento de COX-2 na geração da dor neuropática e a eficácia do uso de inibidores de ciclooxigenase no tratamento da dor inflamatória, diversos trabalhos demonstraram que, de fato, inibidores de COX são ineficazes no tratamento de dores neuropáticas (Namaka *et al.*, 2004). As prostaglandinas, neste contexto, seriam importantes para o desenvolvimento, mas não manutenção da dor neuropática. De maneira semelhante, o TNF- $\alpha$  seria importante para o desenvolvimento da dor neuropática, mas a manutenção não dependeria da ação deste mediador. Desta forma, observou-se que camundongos TNFR1<sup>-/-</sup> não desenvolveram a NPH. Trabalhos na literatura demonstraram que pacientes sob tratamento com drogas anti-TNF exibem maior risco de desenvolver o Herpes Zoster (Strangfeld *et al.*, 2009). Entretanto, a incidência de NPH entre os mesmos é significativamente menor, quando comparados a indivíduos que desenvolveram o Herpes Zoster mas não estão sob esta terapia (Javed *et al.*, 2011).

O presente trabalho também demonstrou que neutrófilos e macrófagos não são encontrados nos GRDs em fases tardias da infecção (21 dpi), enquanto a migração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> aos GRDs aumenta de maneira tempo-dependente durante a infecção herpética. Diversos trabalhos na literatura demonstraram a importância destes

linfócitos na contenção da infecção nos gânglios e inibição da reativação do HSV-1. No entanto, a função destas células durante a NPH murina permanece desconhecida.

Finalmente, investigou-se a participação das CSGs durante a NPH. Surpreendentemente, observou-se a ativação tempo-dependente destas células em animais NPH+, com o pico ocorrendo no 50° dpi. A ativação persistente destas células já foi demonstrada em modelos de dor neuropática, onde as CSGs sintetizam NGF- $\beta$  durante, pelo menos, 2 meses após a injúria neural, o qual promove a sobrevivência e diferenciação de neurônios e, portanto, aumenta as respostas dolorosas (Zhou *et al.*, 1999). Ainda, a ativação destas células pode acarretar em anomalias no suporte iônico de neurônios. Vit e col (2008) demonstraram que o silenciamento do canal retificador de potássio Kir4.1 em CSGs do gânglio trigeminal culminou no desenvolvimento de dor espontânea e evocada em ratos naive. A supressão deste canal não leva somente à disfunção na homeostase de potássio, como também reduz a recaptação de glutamato por células gliais (Kucheryavykh *et al.*, 2007). A importância destas células durante a NPH foi demonstrada através do tratamento de camundongos NPH+ com fluorocitrato, onde observou-se a redução do comportamento hiperalgésico. A ativação das CSGs, portanto, contribui para o estabelecimento da hiperalgesia crônica na NPH murina.

## ***6 Conclusões***

Com base nos dados apresentados, conclui-se que a manutenção da hiperalgesia herpética é dependente da migração de leucócitos e consequente produção de mediadores inflamatórios nos GRDs infectados. Ainda, em fases tardias da infecção (neuralgia pós-herpética), a ativação de células gliais é o processo mais importante para manutenção da hiperalgesia.

## ***7 Referências bibliográficas***

ABBADIE, C. et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7947-52, Jun 24 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1331358100> >.

ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I.; FIORENZANI, P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1007, p. 232-7, Dec 2003. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ARAVALLI, R. N. et al. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. **J Immunol**, v. 175, n. 7, p. 4189-93, Oct 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ARBUSOW, V. et al. Latency of herpes simplex virus type-1 in human geniculate and vestibular ganglia is associated with infiltration of CD8+ T cells. **J Med Virol**, v. 82, n. 11, p. 1917-20, Nov 2010. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21904> >.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 436-41, Dec 1993. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BEKKERING, G. E. et al. Epidemiology of chronic pain and its treatment in The Netherlands. **Neth J Med**, v. 69, n. 3, p. 141-53, Mar 2011. ISSN 0300-2977. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BELVISI, M. G.; HELE, D. J. Soft steroids: a new approach to the treatment of inflammatory airways diseases. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, n. 6, p. 321-5, 2003. ISSN 1094-5539 (Print)1094-5539. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1094-5539\(03\)00105-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1094-5539(03)00105-6) >.

BENNETT, G. J. A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy. **Clin J Pain**, v. 16, n. 3 Suppl, p. S139-43, Sep 2000. ISSN 0749-8047 (Print)0749-8047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BERECZKY-VERESS, B. et al. Influence of perineurial cells and Toll-like receptors 2 and 9 on Herpes simplex type 1 entry to the central nervous system in rat encephalitis. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12350, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012350> >.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**, v. 67, n. 1, p. 67-186, Jan 1987. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BLOOM, D. C.; GIORDANI, N. V.; KWIATKOWSKI, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 246-56, Mar-Apr 2010.

ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.12.001> >.

BOIVIN, N. et al. The combination of valacyclovir with an anti-TNF alpha antibody increases survival rate compared to antiviral therapy alone in a murine model of herpes simplex virus encephalitis. **Antiviral Res**, v. 100, n. 3, p. 649-53, Dec 2013. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BULLIDO, M. J. et al. Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 8, p. 1160-6, Aug 2008. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.023> >.

CAO, L.; DELEO, J. A. CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 2, p. 448-58, Feb 2008. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737485> >.

CHEN, S. H.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N. Synergistic anti-HSV effect of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in human corneal fibroblasts is associated with interferon beta induction. **Antiviral Res**, v. 22, n. 1, p. 15-29, Sep 1993. ISSN 0166-3542 (Print)0166-3542. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COHEN, J. I. Varicella-zoster vaccine virus: evolution in action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 1, p. 7-8, Jan 2 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610016103> >.

COLLEONI, M.; SACERDOTE, P. Murine models of human neuropathic pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 10, p. 924-33, Oct 2010. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.012> >.

CUI, J. G. et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 239-48, Dec 1 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CUNHA, T. M. et al. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO signaling pathway. **Mol Pain**, v. 8, p. 10, 2012. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-8-10> >.

\_\_\_\_\_. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0907654> >.

\_\_\_\_\_. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409225102> >.

DIVITO, S.; CHERPES, T. L.; HENDRICKS, R. L. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. **Immunol Res**, v. 36, n. 1-3, p. 119-26, 2006. ISSN 0257-277X (Print)0257-277x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1385/ir:36:1:119> >.

DUBOVY, P. et al. Intra- and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF-alpha and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 7-8, p. 1205-17, Oct-Nov 2006. ISSN 0272-4340 (Print)0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9006-3> >.

DWORKIN, R. H.; PORTENOY, R. K. Pain and its persistence in herpes zoster. **Pain**, v. 67, n. 2-3, p. 241-51, Oct 1996. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EGAN, K. P. et al. Immunological control of herpes simplex virus infections. **J Neurovirol**, v. 19, n. 4, p. 328-45, Aug 2013. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-013-0189-3> >.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol**, v. 240, n. 102, p. 200-3, Dec 13 1972. ISSN 0090-0028 (Print)0090-0028. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 39-48, Dec 15 1978. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FIRESTEIN, G. S.; PAINE, M. M.; LITTMAN, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. **Arthritis Rheum**, v. 34, n. 9, p. 1094-105, Sep 1991. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FLEETWOOD-WALKER, S. M. et al. Behavioural changes in the rat following infection with varicella-zoster virus. **J Gen Virol**, v. 80 ( Pt 9), p. 2433-6, Sep 1999. ISSN 0022-1317 (Print)0022-1317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FOLLENFANT, R. L. et al. Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 beta-induced, prostaglandin-independent hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 98, n. 1, p. 41-3, Sep 1989. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GAN, E. Y.; TIAN, E. A.; TEY, H. L. Management of herpes zoster and post-herpetic neuralgia. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, n. 2, p. 77-85, Apr 2013. ISSN 1175-0561 (Print)1175-0561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40257-013-0011-2> >.

GANGAPPA, S.; DESHPANDE, S. P.; ROUSE, B. T. Bystander activation of CD4+ T cells accounts for herpetic ocular lesions. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 2, p. 453-9, Feb 2000. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GARRY, E. M. et al. Varicella zoster virus induces neuropathic changes in rat dorsal root ganglia and behavioral reflex sensitisation that is attenuated by gabapentin or sodium channel blocking drugs. **Pain**, v. 118, n. 1-2, p. 97-111, Nov 2005. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2005.08.003> >.

GILDEN, D. et al. Review: The neurobiology of varicella zoster virus infection. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, n. 5, p. 441-63, Aug 2011. ISSN 0305-1846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01167.x> >.

HALFORD, W. P.; GEBHARDT, B. M.; CARR, D. J. Acyclovir blocks cytokine gene expression in trigeminal ganglia latently infected with herpes simplex virus type 1. **Virology**, v. 238, n. 1, p. 53-63, Nov 10 1997. ISSN 0042-6822 (Print)0042-6822. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1997.8806> >.

HEILIGENHAUS, A. et al. CD4+ T-cell type 1 and type 2 cytokines in the HSV-1 infected cornea. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 237, n. 5, p. 399-406, May 1999. ISSN 0721-832X (Print)0721-832x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HERMAN, M. et al. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. **J Exp Med**, v. 209, n. 9, p. 1567-82, Aug 27 2012. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111316> >.

HIGA, K.; SHONO, S.; NITAHARA, K. [Postherpetic neuralgia]. **Masui**, v. 59, n. 11, p. 1342-9, Nov 2010. ISSN 0021-4892 (Print)0021-4892. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOMMA, Y.; BRULL, S. J.; ZHANG, J. M. A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. **Pain**, v. 95, n. 3, p. 239-46, Feb 2002. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HU, P. et al. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 5, p. 599-616, Jul 2007. ISSN 0889-1591 (Print)0889-1591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.013> >.

HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 23-38, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 590-

605, Dec 2003. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00307-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00307-8) >.

IGNATOWSKI, T. A. et al. Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain. **Brain Res**, v. 841, n. 1-2, p. 70-7, Sep 11 1999. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JANCALEK, R. et al. Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 11, 2010. ISSN 1742-2094. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-11> >.

JANDER, S. et al. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 975-82, Apr 1998. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JAVED, S. et al. Possible association of lower rate of postherpetic neuralgia in patients on anti-tumor necrosis factor-alpha. **J Med Virol**, v. 83, n. 11, p. 2051-5, Nov 2011. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22182> >.

JOHNSON, A. J.; CHU, C. F.; MILLIGAN, G. N. Effector CD4+ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. **J Virol**, v. 82, n. 19, p. 9678-88, Oct 2008. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01159-08> >.

JOHNSON, R. W. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. Optimal treatment. **Drugs Aging**, v. 10, n. 2, p. 80-94, Feb 1997. ISSN 1170-229X (Print)1170-229x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JUNG, B. F. et al. Risk factors for postherpetic neuralgia in patients with herpes zoster. **Neurology**, v. 62, n. 9, p. 1545-51, May 11 2004. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KHANNA, K. M. et al. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 593-603, May 2003. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIEFER, R. et al. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 2, p. 109-27, Jun 2001. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIGUCHI, N. et al. CC-chemokine MIP-1alpha in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 484, n. 1, p. 17-21, Oct 22 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.085> >.

KIM, D. et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **J Biol Chem**, v. 282, n. 20, p. 14975-83, May 18 2007. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607277200> >.

KNIPE, D. M. et al. Molecular genetics of herpes simplex virus. VI. Characterization of a temperature-sensitive mutant defective in the expression of all early viral gene products. **J Virol**, v. 38, n. 2, p. 539-47, May 1981. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUCHERYAVYKH, Y. V. et al. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. **Glia**, v. 55, n. 3, p. 274-81, Feb 2007. ISSN 0894-1491 (Print)0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20455> >.

KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; KODA, H. Involvement of EP3 subtype of prostaglandin E receptors in PGE2-induced enhancement of the bradykinin response of nociceptors. **Brain Res**, v. 632, n. 1-2, p. 321-4, Dec 31 1993. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KURT-JONES, E. A. et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 5, p. 1315-20, Feb 3 2004. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308057100> >.

LEE, I. O.; SEO, Y. The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. **Anesth Analg**, v. 106, n. 3, p. 972-7, table of contents, Mar 2008. ISSN 0003-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e318163f602> >.

LI, H. et al. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. **Immunology**, v. 117, n. 2, p. 167-76, Feb 2006. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02275.x> >.

LIMA, G. K. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. **Am J Pathol**, v. 177, n. 5, p. 2433-45, Nov 2010. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100121> >.

LINDENLAUB, T. et al. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. **Brain Res**, v. 866, n. 1-2, p. 15-22, Jun 2 2000. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIU, H. et al. TLR4-MyD88/Mal-NF-kB axis is involved in infection of HSV-2 in human cervical epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80327, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080327> >.

LIU, T. et al. Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. **J Virol**, v. 75, n. 22, p. 11178-84, Nov 2001. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.22.11178-11184.2001> >.

LIU, T.; VAN ROOIJEN, N.; TRACEY, D. J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 25-32, May 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIU, Z. et al. HSV-1 activates NF-kappaB in mouse astrocytes and increases TNF-alpha and IL-6 expression via Toll-like receptor 3. **Neurol Res**, v. 35, n. 7, p. 755-62, Sep 2013. ISSN 0161-6412. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/016164113x13703372991516> >.

\_\_\_\_\_. [Interleukin-6 and immune state in children with nephrotic syndrome]. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 27, n. 4, p. 408-10, Dec 1996. ISSN 0257-7712 (Print)0257-7712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOESER, J. D. Low back pain. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 58, p. 363-77, 1980. ISSN 0091-7443 (Print)0091-7443. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, May 8 1999. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01311-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01311-2) >.

LOKENS GARD, J. R. et al. Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. **J Neurovirol**, v. 7, n. 3, p. 208-19, Jun 2001. ISSN 1355-0284 (Print)1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LU, X.; RICHARDSON, P. M. Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. **J Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 972-8, Apr 1991. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MA, W.; EISENACH, J. C. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 691-704, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MANSUR, D. S. et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. **Am J Pathol**, v. 166, n. 5, p. 1419-26, May 2005. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62359-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62359-0) >.

MARQUES, C. P. et al. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. **J Immunol**, v. 181, n. 9, p. 6417-26, Nov 1 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MENASRIA, R. et al. Both TRIF and IPS-1 adaptor proteins contribute to the cerebral innate immune response against herpes simplex virus 1 infection. **J Virol**, v. 87, n. 13, p. 7301-8, Jul 2013. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00591-13> >.

MENSAH-NYAGAN, A. G. et al. Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 Suppl 1, p. S169-77, Dec 2009. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577851> >.

MILLER, C. S.; DANAHER, R. J.; JACOB, R. J. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 541-62, 1998. ISSN 1045-4411 (Print)1045-4411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2533> >.

MOALEM, G.; XU, K.; YU, L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 3, p. 767-77, 2004. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.035> >.

MOORE, R. A. et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, p. Cd007938, 2014. ISSN 1361-6137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD007938.pub3> >.

MORIN, N. et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **J Neuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 164-71, Mar 2007. ISSN 0165-5728 (Print)0165-5728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.12.009> >.

MURATA, Y. et al. Changes in pain behavior and histologic changes caused by application of tumor necrosis factor-alpha to the dorsal root ganglion in rats. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 31, n. 5, p. 530-5, Mar 1 2006. ISSN 0362-2436. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.brs.0000201260.10082.23> >.

NAMAKA, M. et al. A treatment algorithm for neuropathic pain. **Clin Ther**, v. 26, n. 7, p. 951-79, Jul 2004. ISSN 0149-2918 (Print)0149-2918. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NISHIYAMA, T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 50, n. 2, p. 228-33, Feb 2006. ISSN 0001-5172 (Print)0001-5172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.00921.x> >.

NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DMAREST, R.J. (1996) The human nervous system: structure and function. Pain and temperature, 5a ed., Williams & Wilkins, New York, pp. 123-137.

NURMIKKO, T. J.; RASANEN, A.; HAKKINEN, V. Clinical and neurophysiological observations on acute herpes zoster. **Clin J Pain**, v. 6, n. 4, p. 284-90, Dec 1990. ISSN 0749-8047 (Print)0749-8047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OHARA, P. T.; TAUSCHER, A. N.; LAVAIL, J. H. Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea. **Brain Res**, v. 899, n. 1-2, p. 260-3, Apr 27 2001. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OPSTELTEN, W. et al. The impact of varicella zoster virus: chronic pain. **J Clin Virol**, v. 48 Suppl 1, p. S8-13, May 2010. ISSN 1386-6532. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(10\)70003-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(10)70003-2) >.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745-57, 2000. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PLACEK, B. J.; BERGER, S. L. Chromatin dynamics during herpes simplex virus-1 lytic infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 223-7, Mar-Apr 2010. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.012> >.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F. Y.; DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 467-73, Jul 2004. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x> >.

RAJASAGI, N. K. et al. CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. **J Virol**, v. 83, n. 10, p. 5256-68, May 2009. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01997-08> >.

SACERDOTE, P. et al. Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. **Neurosci Lett**, v. 436, n. 2, p. 210-3, May 9 2008. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.023> >.

SANCHO-SHIMIZU, V. et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. **J Clin Invest**, v. 121, n. 12, p. 4889-902, Dec 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci59259> >.

SASAKI, A. et al. Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice. **Neuroscience**, v. 150, n. 2, p. 459-66, Dec 5 2007. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.067> >.

\_\_\_\_\_. Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 3, p. 266-73, Nov 2008. ISSN 1347-8613 (Print)1347-8613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SATO-TAKEDA, M. et al. Major histocompatibility complex haplotype is associated with postherpetic pain in mice. **Anesthesiology**, v. 104, n. 5, p. 1063-9, May 2006. ISSN 0003-3022 (Print)0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAWYNOK, J. Topical analgesics for neuropathic pain: preclinical exploration, clinical validation, future development. **Eur J Pain**, v. 18, n. 4, p. 465-81, Apr 2014. ISSN 1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00400.x> >.

SCHAFERS, M. et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp Neurol**, v. 185, n. 1, p. 160-8, Jan 2004. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 414-23, Nov 19 2008. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.067> >.

\_\_\_\_\_. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. **Neurosci Lett**, v. 347, n. 3, p. 179-82, Aug 28 2003. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SERGERIE, Y.; RIVEST, S.; BOIVIN, G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. **J Infect Dis**, v. 196, n. 6, p. 853-60, Sep 15 2007. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/520094> >.

SHAW, S. K. et al. Activated polymorphonuclear cells promote injury and excitability of dorsal root ganglia neurons. **Exp Neurol**, v. 210, n. 2, p. 286-94, Apr 2008. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.024> >.

SHERIDAN, B. S. et al. Reevaluating the CD8 T-cell response to herpes simplex virus type 1: involvement of CD8 T cells reactive to subdominant epitopes. **J Virol**, v. 83, n. 5, p. 2237-45, Mar 2009. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01699-08> >.

SHIMELD, C. et al. Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. **J Neuroimmunol**, v. 61, n. 1, p. 7-16, Aug 1995. ISSN 0165-5728 (Print)0165-5728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIBILIA, J. [Corticosteroids and inflammation]. **Rev Prat**, v. 53, n. 5, p. 495-501, Mar 1 2003. ISSN 0035-2640 (Print)0035-2640. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SINDRUP, S. H. et al. Chapter 57 Principles of pharmacological treatment. **Handb Clin Neurol**, v. 81, p. 843-53, 2006. ISSN 0072-9752 (Print)0072-9752. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0072-9752\(06\)80061-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0072-9752(06)80061-8) >.

\_\_\_\_\_. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 96, n. 6, p. 399-409, Jun 2005. ISSN 1742-7835 (Print)1742-7835. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto\\_01.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_01.x) >.

SOMMER, C. [Animal studies on neuropathic pain: the role of cytokines and cytokine receptors in pathogenesis and therapy]. **Schmerz**, v. 13, n. 5, p. 315-23, Oct 15 1999. ISSN 0932-433X (Print)0932-433x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s004829900038> >.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp Neurol**, v. 151, n. 1, p. 138-42, May 1998. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1998.6797> >.

SORKIN, L. S. et al. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 255-62, Nov 1997. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ST LEGER, A. J.; HENDRICKS, R. L. CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. **J Neurovirol**, v. 17, n. 6, p. 528-34, Dec 2011. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-011-0062-1> >.

STANKUS, S. J.; DLUGOPOLSKI, M.; PACKER, D. Management of herpes zoster (shingles) and postherpetic neuralgia. **Am Fam Physician**, v. 61, n. 8, p. 2437-44, 2447-8, Apr 15 2000. ISSN 0002-838X (Print)0002-838x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STOCK, A. T. et al. Rapid recruitment and activation of CD8+ T cells after herpes simplex virus type 1 skin infection. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 1, p. 143-8, Jan 2011. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2010.66> >.

STRANGFELD, A. et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. **Jama**, v. 301, n. 7, p. 737-44, Feb 18 2009. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.146> >.

SUNG, C. S. et al. Minocycline and fluorocitrate suppress spinal nociceptive signaling in intrathecal IL-1beta-induced thermal hyperalgesic rats. **Glia**, v. 60, n. 12, p. 2004-17, Dec 2012. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22415> >.

SVENSSON, A. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 3 confer natural resistance to human herpes simplex virus type 2 infection. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 8, p. 1717-24, Aug 2012. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.042572-0> >.

SYRIATOWICZ, J. P. et al. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, v. 94, n. 2, p. 587-94, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKASAKI, I. et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of a mouse model of acute herpetic pain. **Jpn J Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 319-26, Aug 2000. ISSN 0021-5198 (Print)0021-5198. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 95-101, May 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Effects of analgesics on delayed postherpetic pain in mice. **Anesthesiology**, v. 96, n. 5, p. 1168-74, May 2002. ISSN 0003-3022 (Print)0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, Feb 2004. ISSN 1044-5323 (Print)1044-5323. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TANGA, F. Y.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J. A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 16, p. 5856-61, Apr 19 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501634102> >.

TEAGUE, O.; GOODPASTURE, E. W. Experimental Herpes Zoster. **J Med Res**, v. 44, n. 2, p. 185-200.7, Dec 1923. ISSN 0097-3599 (Print)0097-3599. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VERJANS, G. M. et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 9, p. 3496-501, Feb 27 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610847104> >.

VILLALBA, M. et al. Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 3, p. 371-9, Aug 2012. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-012-0247-0> >.

VRANKEN, J. H. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 71-8, Mar 2009. ISSN 1871-5249. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WANG, J. P. et al. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. **J Virol**, v. 86, n. 4, p. 2273-81, Feb 2012. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.06010-11> >.

WATANABE, K. et al. Etanercept attenuates pain-related behavior following compression of the dorsal root ganglion in the rat. **Eur Spine J**, v. 20, n. 11, p. 1877-84, Nov 2011. ISSN 0940-6719. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-011-1854-y> >.

WATSON, C. P. et al. Post-herpetic neuralgia: further post-mortem studies of cases with and without pain. **Pain**, v. 44, n. 2, p. 105-17, Feb 1991. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Post-herpetic neuralgia: post-mortem analysis of a case. **Pain**, v. 34, n. 2, p. 129-38, Aug 1988. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 617-53, May 2000. ISSN 0023-6837 (Print)0023-6837. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YANG, C. A. et al. Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis. **Hum Immunol**, v. 73, n. 8, p. 844-51, Aug 2012. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.008> >.

ZHAO, Z. et al. Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. **Neuroscience**, v. 97, n. 4, p. 743-8, 2000. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHENG, M. et al. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Mediated Cell Survival Promotes HSV-1 Induced Murine ARN. 05/01/2005 2005. Disponível em: < <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/46/5/2791> >.

ZHOU, C. J. et al. Changes in the distribution of peanut agglutinin (PNA) binding molecules during muscle reinnervation following nerve crush injury. **Arch Histol Cytol**, v. 62, n. 3, p. 261-72, Aug 1999. ISSN 0914-9465 (Print)0914-9465. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHOU, Y. et al. Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 13, p. 2916-25, Oct 2009. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22110> >.

*Anexos*

**ANEXO – MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO (EM ELABORAÇÃO)****LEUKOCYTE INFILTRATION AND PRODUCTION OF INFLAMMATORY MEDIATORS IN DORSAL ROOT GANGLIONS ARE CRUCIAL FOR NOCICEPTIVE HYPERSENSITIVITY DURING CUTANEOUS HERPES SIMPLEX-1 INFECTION**

JAQUELINE RAYMONDI SILVA<sup>(1)</sup>; JHIMMY TALBOT<sup>(1)</sup>; ALEXANDRE HASHIMOTO PEREIRA LOPES<sup>(1)</sup>, BENEDITO ANTONIO LOPES DA FONSECA<sup>(1)</sup>; THIAGO MATTAR CUNHA<sup>(1)</sup>; FERNANDO DE QUEIROZ CUNHA<sup>(1)</sup>

(1)Pharmacology Department, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo

**Corresponding author:**

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Pharmacology Department, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14040-900, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. Phone 55 16 36023324, Fax 55 16 36332301.

Email:fdqcunha@fmrp.usp.br

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7-2007-2013] under grant agreement n° HEALTH-F4-2011-281608 (TIMER), from SãoPaulo Research Foundation (FAPESP) under grant agreements n° 2010/12309-8, 2011/19670-0 (Thematic project) and 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Disease) and from University of São Paulo NAP-DIN under grant agreement n° 11.1.21625.01.0.

**Running title:** Inflammation and herpetic hyperalgesia

**Disclosures.** The authors have no financial conflict of interest.

**ABSTRACT**

Herpes Zoster (HZ) is a disease caused by reactivation of latent herpesvirus Varicella Zoster in the sensory ganglion, characterized by dermal rash and pain. A murine model of HSV-1 infection on the hind paw skin has been used to study HZ, since mice develop HZ-like skin lesions and pain-related responses. There are no data available about the immune response in dorsal root ganglion (DRG) of these mice. Thus, the aim of this study was to evaluate cells and inflammatory mediators present in DRGs and its relationship with hyperalgesia during HSV-1 cutaneous infection. Mice developed hyperalgesia from 3 to 7 dpi in the ipsilateral paws. A higher viral load was detected in DRGs L4, L5 and L6 of infected mice at 7 dpi. The intrathecal treatment of infected mice with dexamethasone resulted in a reduction of hyperalgesia from 5<sup>th</sup> up to 7<sup>th</sup> dpi. Leukocytes (CD45<sup>+</sup> cells) infiltrate infected DRGs only from 5<sup>th</sup> dpi, reaching the maximal infiltration at 7<sup>th</sup> dpi. This infiltrate was composed by neutrophils, macrophages and CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The treatment of infected mice with fucoidin resulted in the reduction of hyperalgesia from 5<sup>th</sup> dpi. The mRNA expression of the inflammatory molecules COX-2 and TNF- $\alpha$  was found to be up regulated from 5<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> dpi. Moreover, the pharmacological blockage of COX-2 and TNF- $\alpha$  by treatment with Indomethacin or Infliximab resulted in the reduction of hyperalgesia. Corroborating these data, the genetic deficiency of TNF- $\alpha$  receptor type I was associated with the absence of hyperalgesia in infected mice. The present results show that, during HSV-1 peripheral infection, there is an intense infiltration of leukocytes at the DRGs, composed by inflammatory cells (macrophages and neutrophils). These cells seem to be important to maintenance of late stages of HSV-1 induced hyperalgesia. Moreover, the increase of inflammatory mediators in the infected DRGs, such as TNF- $\alpha$  and prostaglandins, also contributes to development and maintenance of murine herpetic hyperalgesia.

**Keywords:** HSV-1; hyperalgesia; TNF- $\alpha$ ; COX-2; leukocyte

## INTRODUCTION

Herpes zoster is caused by reactivation of dormant Varicella Zoster Virus in the sensory ganglia and usually accompanied by acute herpetic pain (Weller, 1983; Straus *et al.*, 1988). The viruses replicate in the ganglion and move antidromically along primary afferents to the skin (Watson *et al.*, 1991), which results in a vesicopapular eruption in the corresponding cutaneous dermatome (Loeser, 1986). The pain of herpes zoster is typically described as continuous aching and burning and often superimposed by allodynia, such as severe lancinating pain that is precipitated by touching or moving the involved area (Loeser, 1986; Portenoy, Duma e Foley, 1986; Nurmikko, Rasanen e Hakkinen, 1990). Early treatment with antiherpetic agents, such as acyclovir and vidarabine, shortens the duration of skin lesions and complications related to herpes zoster (Gnann, 1994). In addition, although nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as diclofenac, antidepressants such as amitriptyline and sympathetic nerve block are used for the management of herpetic pain, these treatments do not always relieve severe pain (Loeser, 1986; Dworkin e Portenoy, 1996). The underlying pathophysiological mechanisms of spontaneous and evoked pain in herpes zoster are not well understood. However, because of species specificity of Varicella Zoster Virus, there are no animal models that correspond to human herpes zoster and herpetic pain (Straus *et al.*, 1988).

Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) is a neurotropic virus and becomes latent in the sensory ganglia after infection. Like Varicella Zoster Virus, HSV-1 invades the peripheral terminals of sensory neurons, reaching sensory ganglia via axonal transport. Because of low species specificity, HSV-1 can infect mice, rat, guinea pigs and rabbits as well as humans (Schaeffer *et al.*, 1978; Collins e Oliver, 1982; Simmons e Nash, 1984; Andoh *et al.*, 1995). When the skin of the hind paw of mice was inoculated with HSV-1, the development of zosteriform skin lesions was observed. Also, HSV-1 cutaneous infection induces tactile allodynia and mechanical hyperalgesia since day 5 post-infection (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000). The treatment of infected mice with drugs commonly used in herpes zoster, such as gabapentine, diclofenac, morphine and amitriptyline, reduces the hyperalgesic behaviour (Takasaki, Andoh, Nitta, *et al.*, 2000). Several studies showed that, during HSV-1 cutaneous infection, an inflammatory response is observed in the skin. Moreover, during HSV-1 ocular or vaginal infection, the migration of leukocytes to sensory ganglion occurs, which are responsible for production of inflammatory mediators at this site (Egan *et al.*, 2013). However, there are no data available about the immune response in dorsal root ganglion (DRG) of mice infected with HSV-1 in this model. Thus, in the present study, we evaluated

the inflammatory response in infected dorsal root ganglion and its relationship with herpetic hyperalgesia development.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

The experiments were performed in C57BL/6 wild type (WT) male mice (20- 25 g) and TNFR1 deficient mice (TNFR1 KO). All animals were housed in the animal care facility of the Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo. The animals were taken to the testing room at least 1 h before the experiments and were used only once. Food and water were available ad libitum. The animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for the Study of Pain guidelines for those animals used in pain research, which were approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the Medical School of Ribeirao Preto-University of Sao Paulo.

### **HSV-1 infection**

Mice were anaesthetized with ketamine/xylazine (100 mg/kg and 20 mg/kg, respectively, i.p.), and then the midflank and right foot were clipped and depilated with a chemical depilatory, Veet Hair Remover (Reckitt Benckiser, Co., Ltd., Sao Paulo, Brazil). Three days later, HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units in 20  $\mu$ l) was inoculated on the shin of the right hind paw (5 x 5 mm) after scarification with sandpaper. The virus was applied directly to the scarified area. The contralateral hind paw was without inoculation.

### **Nociceptive Test**

The mechanical nociceptive threshold was tested in mice as previously reported (Cunha *et al.*, 2004). Briefly, mice were placed in acrylic cages (12 × 10 × 17 cm) with wire grid floors 15-30 min before the start of testing. In these experiments, a serie of von Frey filaments (Stoelting, Chicago, IL, USA) with logarithmically increasing stiffness (-2.35 to 2.65 log of force, g) were applied perpendicularly to one of the five distal footpads with a gradual increase in pressure. The tests consisted of poking the hindpaw to provoke a flexion reflex followed by a clear flinch response after paw withdrawal. Each von Frey filament was applied for approximately 3-4 s to induce the endpoint reflex. The weakest filament able to elicit a response was considered to be the mechanical threshold (g).

## Drugs

The following drugs were obtained from the sources indicated. Dexamethasone, Fucoidan and Indomethacin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Morphine and lidocaine were purchased from Cristalia Pharmaceuticals Co. (Itapira, Sao Paulo, Brazil). Infliximab was purchased from Schering-Plough Pharmaceuticals (Kenilworth, New Jersey, USA).

## Viral load quantification

The absolute quantification of viral load was performed by real-time PCR. Briefly, at 7 days post infection, infected mice were anesthetized and euthanized by exsanguination, followed by perfusion with PBS. The dorsal root ganglia L2, L3, L4, L5 and L6, ipsilateral to the infection, as well as spinal cord and contralateral dorsal root ganglia, were removed and homogenized in sterile water. The DNA extraction was performed with a commercial kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the viral load was determined by absolute quantification using as reference a plasmid standard curve containing the polymerase gene of HSV-1. Real-time PCR was performed using primers specific for the HSV-1 polymerase gene. Reactions were conducted on the ABI Prism 7500 Sequence Detection System using the SYBR-green fluorescence system (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primer pair for HSV-1 polymerase gene was as follow:

Fwd: 5'-GCTCGAGTGCGAAAAACGTTC-3'

Rev: 5'-TGCGGTTGATAAACGCGCAGT-3'

## RNA extraction and Real-Time PCR

At 7 days post infection, infected mice were anesthetized and euthanized by exsanguination, followed by perfusion with PBS. The dorsal root ganglia L4, L5 and L6, ipsilateral to the infection, were collected and analyzed as a pool. The samples were homogenised in 1 mL of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and total RNA was extracted following the manufacturer's instructions. The purity of total RNA was measured with a spectrophotometer and the wavelength absorption ratio (260/280 nm) was between 1.8 and 2.0 for all preparations. Reverse transcription of total RNA to cDNA was carried out with a reverse transcription reaction (Superscript II, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Real-time PCR was performed using primers specific for the mouse genes *Tnf* and *Ptgs2*, and for the mouse housekeeping gene Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). Reactions were conducted on the ABI Prism 7500 Sequence Detection System using the SYBR-green fluorescence system (Applied Biosystems, Warrington, UK). The data were analysed with the

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  method as described previously and expressed relative to samples collected in the naive group of animals. Primer pairs for mouse *Gapdh*, *Tnf* and *Ptgs2* were as follows:

Tnf fwd: 5'- TGTGCTCAGAGCTTTCAACAA -3'

Tnf rev: 5'- CTTGATGGTGGTGCATGAGA -3'

Ptgs2 fwd: 5'- GTGGAAAAACCTCGTCCAGA - 3'

Ptgs2 rev: 5'- GCTCGGCTTCCAGTATTGAG - 3'

Gapdh fwd: 5' - CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'

Gapdh rev:5' - CGGCCAAATCCGTTTCAC-3'

### Flow cytometry analysis

DRGs L4, L5 and L6 were collected from infected mice and analyzed as a pool. DRGs were prepared as single-cell suspensions according to standard protocols, Cells were suspended and incubated for 30 min at 4 °C in PBS containing 2% BSA and FcγRI block mAb (CD16/CD32) to avoid nonspecific background staining. The following monoclonal antibodies (BD Biosciences, New Jersey, USA) were used for staining: CD45 APC, Ly6-G/Gr-1 PE, F4/80 APC, CD4 APC, CD8 PE. Flow cytometry was performed in a FACS CANTO™ instrument (Becton Dickinson, New Jersey, USA) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, USA).

### Western blot analysis

DRGs were collected and homogenized in a lysis buffer containing a mixture of protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Sigma). The protein concentrations of the lysate were determined using a BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL), and 30 µg of protein was loaded for each lane. Protein samples were separated on a SDS-PAGE gel (10% gradient gel; Bio-Rad, Hercules, CA) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). The filters were blocked with 5% dry Milk and incubated overnight at 4°C with a primary antibody, COX-2 (1:500; Abcam, Cambridge, UK), for 1 h at room temperature (RT) with an HRP-conjugated secondary antibody (1:20000; Jackson ImmunoResearch, PA, USA). The blots were visualized in an ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech) for 2 min and exposed to film (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) for 1-30 min.

### Data analyses and statistics

All results are presented as the means ± S.E.M. The experiments were repeated at least twice. A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all

times curves when the hypernociceptive responses were measured at different times after treatment. The factors analyzed were treatments, time and time by treatment interaction.  $P < 0.05$  was considered as significant.

## RESULTS

### Characterization of herpetic hyperalgesia in mice

In the first set of experiments, we analyzed the pattern of hyperalgesia and lesions development in infected mice. C57BL/6 mice developed herpetic hyperalgesia (significant reduction in the nociceptive mechanical threshold) from day 3 post-infection (dpi) in the ipsilateral paws. The reduction of the nociceptive mechanical threshold progressed until 7 dpi (Figure 1A). In the contralateral paws to infection, no reduction of the nociceptive mechanical threshold was observed, ie the hyperalgesia is dependent of infection in the corresponding neurodermatome. In 40% of the animals, the development of acute hyperalgesia is accompanied by the appearance of zosteriform lesions on the 5th dpi, which become accentuated until 8 dpi (Figure 1B). To test the effect of analgesic or anesthetic drugs in herpetic hyperalgesia, C57BL / 6 infected mice (7 dpi) were treated with drugs morphine and lidocaine. Morphine is an opioid analgesic that acts by activating opioid receptors, which are important in the regulation of nociceptive transmission. The proposed mechanism of action for lidocaine is via non-selective block of Na<sup>+</sup> channels on sensory afferents at the site of application, resulting in reduced ectopic discharge and reduced signal propagation. Treatment of infected animals with morphine (1 and 5 mg / kg) and lidocaine (20 ng/10 ul / paw) resulted in a significant reduction of hyperalgesic behavior when compared to animals of the vehicle group (Figures 1C and D). The analgesic action of morphine is dose dependent, as the decrease of hyperalgesia observed in mice that received a dose of 5 mg / kg was more durable when compared to animals that received treatment with the dose of 1mg/kg. Such reductions observed for morphine (both doses) and lidocaine are transient and no longer observed 24 h after treatment. Finally, we determined the viral load in infected DRGs. In C57BL / 6 mice, the presence of virus copies was observed in all examined dorsal root ganglion (L2 to L6) and spinal cord. However, the largest amount of virus copies was observed in the ganglia L4, L5 and L6 (Figure 1E).

### Leukocyte infiltration during acute HSV-1 infection

Data in the literature suggest that phagocytes that infiltrate the DRGs plays an important role in the genesis of hyperalgesia in models of neuropathic pain (Calvo, Dawes e Bennett, 2012). Moreover, in murine models of ocular herpes, there is an intense infiltration of inflammatory

cells during infection in the trigeminal ganglia (Egan *et al.*, 2013). Therefore, these data suggest that immune cells (neutrophils, macrophages and T lymphocytes) may play an important role in the development of herpetic hyperalgesia by nociceptive mediators production in DRGs.

To characterize the temporal profile of the inflammatory cell infiltrate present in DRGs and spinal cord of infected animals, we performed flow cytometry experiments. The L4, L5 and L6 DRGs were collected on days 3, 5 and 7 post-infection. The presence of leukocytes (CD45 + cells) was not observed in DRGs from infected animals in the early phase of herpetic hyperalgesia (3 dpi). However, we observed the presence of an infiltrate of CD45 + cells at this site from 5 dpi, which becomes intense at 7 dpi (Figure 2A and B), suggesting that the inflammatory response becomes important in these tissues from 5dpi. Therefore, the migration of immune cells to the DRGs occurs at a later stage of infection. Interestingly, no significant infiltration of immune cells (CD45 +) was observed in the spinal cord at 7dpi, suggesting that at this time, the DRGs, and not the spinal cord, are the primary site of infection and maintenance of herpetic hyperalgesia (Figures 2C and D). Moreover, we observed that the leukocyte infiltrate in DRGS at 7 dpi was composed mainly by macrophage and neutrophils (Figures 2E and F). At this time point, T CD4+ lymphocyte was also present in DRGs, but T CD8+ lymphocytes were not detected (Figures 2G and H).

### **The inflammation in DRGs is important for herpetic hyperalgesia maintenance**

Steroidal anti-inflammatory drugs are used in therapy of herpes zoster in order to reduce skin lesions during the acute phase, since they are aggravated by the action of immune cells which act close to the epithelial cells containing the virus (Whitley *et al.*, 1996). However, it is not certain whether this herpetic hyperalgesia is also related to the inflammatory response in infected ganglia and spinal cord, or nociception is due to the direct action of the virus, which leads to neuronal dysfunction. In order to evaluate whether the inflammation plays a major role in the development of herpetic hyperalgesia, we used a pharmacological approach to determine the role of inflammation in the spinal cord and DRGs in the genesis and maintenance of herpetic hyperalgesia.

For this, animal infected with HSV-1 were treated daily from 2 dpi (the first day before the development of herpetic hyperalgesia) intrathecally with dexamethasone (5ug/5ul/mice). It is noteworthy that none of the animals treated with intrathecal dexamethasone, or saline 0.9%, showed locomotor or nociceptive impairment, demonstrating that the technique does not cause functional changes in the animal.

To assess whether the observed effects were not a result of drug passage to the systemic circulation, infected animals were treated with the same quantity of the drug (5µg/mice, corresponding to the dose of 0.25mg/Kg) daily, intraperitoneally. However, this treatment did not reduce herpetic hyperalgesia, just as observed for intrathecal treatment (Figure 3A). It should be emphasized that this is a low dose of dexamethasone, which does not have anti-inflammatory effects when administered systemically.

It was observed that the intrathecal treatment was unable to prevent the onset of the hypersensitivity. However, from 5 dpi, the animals treated with intrathecal dexamethasone showed an increase in nociceptive mechanical threshold values, which progressed to 7 dpi. However, in animals undergoing intraperitoneal treatment with the same quantity of drug, no increase in nociceptive mechanical threshold values was observed. This suggests that: 1 - the genesis of herpetic hypernociception is not dependent of an inflammatory process in DRGs / spinal cord; 2 - the inflammatory response in these tissues becomes important to herpetic hyperalgesia maintenance after 5dpi. By flow cytometry, we also observed the reduction of leukocyte (CD45+) migration to DRGs, at 7 dpi, in mice treated with dexamethasone intrathecally (Figures 3B and C).

To further confirm the role of inflammation during acute herpetic hyperalgesia, infected mice were treated with fucoidan (20 mg/kg, intravenous), a homopolymer of sulfated L-fucose, which acts as an inhibitor of L-selectin. The drug acts by blocking the rolling process in the vascular endothelium, which is crucial in the process of leukocyte extravasation to inflamed sites (Shimaoka *et al.*, 1996). Thus, fucoidin is a potent inhibitor of leukocyte migration. Treated animals present the beginning of hyperalgesic behavior on the 3rd dpi, similar to mice from vehicle group, which lasted until the 5th dpi. However, at this time point, we observed a significant decrease of hyperalgesia until 9 dpi (Figure 3D). The effectiveness of fucoidin in inhibiting the recruitment of immune cells to DRGs was further confirmed by flow cytometry at 7dpi (Figure 3E and F). Therefore, infiltration of immune cells in the DRGs is important in herpetic hyperalgesia maintenance, but not for its genesis.

### **Prostaglandins are related to the genesis and maintenance of herpetic hyperalgesia**

The viral infection results in the production of inflammatory mediators in sites where the virus is present, many of which can have nociceptive properties by modulating neuronal activation, such as prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). Also, after infection with HSV-1, synthesis of PGE<sub>2</sub> is increased, contributing to the neuronal sensitization and decrease of nociceptors thresholds activation (Kumazawa, Mizumura e Koda, 1994; Ben-Hur *et al.*, 1996; Syriatowicz *et al.*, 1999). In this context, the DRGs infection by HSV-1 could result in the production of

these inflammatory mediators, which contribute to the development and / or maintenance of hyperalgesia. To study the role of PGE<sub>2</sub> in herpetic hyperalgesia, we initially evaluated the expression of cyclooxygenase type 2 (COX-2 or prostaglandin endoperoxidase synthase type 2, *Ptgs2*) mRNA, which is the key enzyme in the synthesis of PGE<sub>2</sub>. The reaction of real-time PCR was performed as described above using primers specific to the murine *Ptgs2*. In the course of HSV-1 infection, it is possible to observe an increase in the levels of *Ptgs2* expression from 5 dpi in infected DRGs, with peak expression occurring at 7 dpi (Fig. 4A). Confirming the findings of mRNA expression, we observed, by Western blot, an intense production of COX-2 in infected DRGs at 7 dpi, when compared to DRGs of naive animals (Figure 4B). Moreover, it was possible to observe a reduction in the expression of *Ptgs2* in DRGs of infected animals treated with fucoidan (20 mg / kg), when compared to non-treated or naive animals (Figure 4C). Therefore, the leukocytes that migrate to the DRGs are important for the production of PGE<sub>2</sub> in this site.

To evaluate the role of PGE<sub>2</sub> production in the DRGs during herpetic hyperalgesia, infected mice were intrathecally treated, from 2nd dpi until 7 dpi, with indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory that acts as an enzyme inhibitor of COX-2 and, therefore, the synthesis of PGE<sub>2</sub> (10ug/5ul/mice). Mice treated with vehicle (untreated) developed the hyperalgesic behavior from the 3rd dpi, which persisted during the analysis period. The comparison between treated and vehicle groups revealed that from 5 dpi, the blockage of PGE<sub>2</sub> production in DRGs resulted in inhibition of herpetic hyperalgesia (Figure 4D). Similarly, intrathecal (10ug/5ul/mice) or intraperitoneal (5 mg/kg) treatment at 7 dpi, with a single dose of the drug, resulted in a transient reduction in herpetic hyperalgesia (Figure 4E). These results demonstrate that PGE<sub>2</sub>/COX-2 pathway plays an important role in the genesis and maintenance of herpetic hyperalgesia.

### **TNF- $\alpha$ is essential to the development and maintenance of herpetic hyperalgesia**

TNF- $\alpha$  is an important mediator involved in inflammatory pain. In models of neuropathic pain, the treatment with selective inhibitors of this cytokine is able to reduce the hyperalgesic behavior of animals, when compared to untreated mice (Uceyler, Tschärke e Sommer, 2007). Moreover, this cytokine is also able to directly sensitize neurons, facilitating synaptic transmission, and, therefore, the algescic response (Sorkin *et al.*, 1997).

To study the role of TNF- $\alpha$  in the herpetic hyperalgesia model, we initially evaluated the temporal expression of *Tnf* mRNA in ipsilateral DRGs and spinal cord from previously infected animals. We observed a slight increase in the relative expression of *Tnf* in infected DRGs from 5 dpi, with the peak of expression occurring at 7 dpi (Figure 5A). Moreover, it

was possible to observe a reduction in the expression of *Tnf* in DRGs of infected animals treated with fucoidan (20 mg / kg), when compared to non-treated or naive animals (Figure 4B), suggesting that, similarly to COX-2/PGE<sub>2</sub>, leukocytes that migrate to the DRGs are important for the production of this cytokine in DRGs.

To assess the role of this cytokine in the herpetic hyperalgesia, genetically deficient TNF receptor 1- $\alpha$  (TNFR1 KO) or C57BL / 6 (Wild Type - WT) mice were infected, as previously described. It was observed that the TNFR1<sup>-/-</sup> mice did not developed herpetic hyperalgesia, when compared to WT mice (Figure 5C). In addition, infected mice were treated intrathecally with neutralizing anti-TNF- $\alpha$ , able to bind to soluble and membrane TNF- $\alpha$  and neutralize their action, (1 $\mu$ g/5 $\mu$ l/mice). The comparison between treated and vehicle groups showed that TNF- $\alpha$  blockage resulted in significant reduction of the herpetic hyperalgesia (Figure 4D). This suggests that activation of TNF- $\alpha$  receptor is important in the generation and maintenance of hyperalgesia herpetic.

## Discussion

Takasaki et al (2000) demonstrated that HSV-1 cutaneous infection results in the development of hyperalgesia, similar to what occurs in human Herpes Zoster (HZ) (Takasaki, Andoh, Shiraki, *et al.*, 2000). Using this methodology we characterized the model of murine herpetic hyperalgesia evaluating the role of inflammation in periphery and central nervous system in nociceptive behavior development. We found that inflammation in dorsal root ganglions, namely leucocyte infiltration and cytokine production, are important to maintenance of acute herpetic hyperalgesia.

We observed the onset of behavioral hyperalgesia in C57BL / 6 mice at 3 dpi. We also detected a higher viral load at DRGs L4, L5 and L6, an unpublished data in literature, since the work of Takasaki and col assesses the viral load only in L4 and L5 DRGs, and also uses conventional low sensitivity and semi-quantitative PCR technique. In the acute phase of infection, mice treated with morphine at doses of 1 and 5 mg / kg showed reduction of hyperalgesic behavior in a transient manner, as previously demonstrated (Takasaki, Andoh, Nitta, *et al.*, 2000). However, we demonstrate that local use of lidocaine mitigates the hyperalgesic behavior observed in HSV-1 cutaneous infection. Lidocaine is an anesthetic that acts by blockage of non-selective Na<sup>+</sup> channels on sensory afferents at the site of application, and topical patches containing 5% of the drug is approved for postherpetic neuralgia (PHN) treatment in United States and Europe. Lidocaine promotes pain relief and reduces allodynia in patients with PHN (Sawynok, 2014). Our data suggests that this drug is also effective during herpetic neuralgia, ie, the acute phase of infection, which correspond to human HZ.

Regarding the inflammatory response resulting from infection by HSV-1, there is no data in literature about the participation of inflammatory cells in the response against the virus in the nervous system. In cutaneous HSV-1 infection, the early response against the virus causes a local inflammation, with leukocytes migration, such as lymphocytes, macrophages and dendritic cells in the skin (Egan *et al.*, 2013). The production of inflammatory mediators by these cells might contribute to the development of hyperalgesia of the infected footpad. However, as we demonstrated, HSV-1 reaches the DRGs after skin infection, and, therefore, initiates an inflammatory response also in this site. In other models of HSV-1 infection, the migration of leukocytes to infected ganglia is already known. The only study that addresses the migration of these cells to DRGs, in the cutaneous infection model, demonstrates the presence of CD3 + cells in L4 infected DRG, however the function of these cells was not evaluated (Sasaki *et al.*, 2008).

The present study was the first to elucidate the involvement of leukocyte migration in herpetic hyperalgesia. Through pharmacological approach, we demonstrated that the inflammation in DRGs is important for the maintenance of herpetic hyperalgesia, but not its origin, and that leukocyte migration to ganglia occurs at late stages (from 5 dpi). Additionally, we investigated which cell types migrate to DRGs in the acute phase of infection (7 dpi), and observed that the leukocyte infiltrate is composed mainly by neutrophils and macrophages, and a small population of CD4 + T lymphocytes. Similarly, in ocular HSV-1 infection, the migration of CD11b + (neutrophils and macrophages), F4/80 + (macrophages) and Gr-1 + (neutrophils) cells to trigeminal ganglia occurs during the acute phase of infection (3 - 7 dpi), while the presence of lymphocytes (CD4 + and CD8 +) is only detected at late stages (from 10 dpi) (Shimeld *et al.*, 1995). The administration of fucoidin to infected animals, as well as local treatment with dexamethasone, resulted in the reduction of hyperalgesia only from 5 dpi, corresponding to the beginning of the leukocyte migration to DRGs, corroborating the hypothesis that these cells are important for maintenance of hypersensitivity in this model.

Studies using models of neuropathic pain have demonstrated the possible participation of these inflammatory cells that infiltrates DRGs in the maintenance of pain conditions. Perkins and Tracey (2000) demonstrated that treatment of rats with anti-neutrophil antibody results in decreased hyperalgesia in sciatic nerve ligation model (Perkins e Tracey, 2000). Furthermore, it was demonstrated that these cells are able to infiltrate the ipsilateral DRGs on the seventh day after CCI (Morin *et al.*, 2007). The potential contribution of neutrophils in hyperalgesia is related to its ability to activate satellite glial cells, as well to cause hyperexcitability and death of neurons of DRGs (Shaw *et al.*, 2008). There is also evidence of

the participation of macrophages in hyperalgesia, due the fact that these cells are resident in nerves and DRGs and participates in the Wallerian degeneration process (Kiefer *et al.*, 2001). The depletion of macrophages by clodronate administration reduces the degeneration of myelinated and unmyelinated fibers, as well as the behavior of thermal hyperalgesia in rats (Liu, Van Rooijen e Tracey, 2000). One week after sciatic nerve injury, it is possible to observe an infiltration of these cells in the corresponding DRGs, similar to what we observed in the present study (Hu e Mclachlan, 2002; 2003).

Some studies using models of neuropathy also suggest the involvement of CD4 + T lymphocytes in hyperalgesia. Initially, T lymphocytes were identified on the site of nerve injury in three models of neuropathic pain (Cui *et al.*, 2000). Similar to results obtained in our work, the lymphocytic infiltrate is detected from the seventh day post-operation, with the peak of migration occurring in 21 days post-operation. These lymphocytes appear to play a major role in the hyperalgesia, as nude animals, which lack T lymphocytes, present less thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, when compared to wild animals. Moreover, adoptive transfer of Th1 lymphocytes to nude mice results in increased hypersensitivity, comparable to that observed in wild type animals (Moalem, Xu e Yu, 2004). Similarly, adoptive transfer of lymphocytes in Th1 CD4+ deficient mice, reversed the reduction of mechanical hyperalgesia previously observed (Cao e Deleo, 2008). Therefore, leukocytes that migrate to ganglia during HSV-1 infection would also have important role, as demonstrated in various models of neuropathy. Our data demonstrate that, in fact, these leukocytes that infiltrate the nervous system plays an important role in herpetic hyperalgesia.

The possible role of these leukocytes during herpetic infection is the production of inflammatory mediators. In fact, studies using models of neuropathic pain have demonstrated the function of inflammatory cells during hyperalgesia. Neutrophils and macrophages infiltrating the nerves and ganglia following nerve injury are capable of producing TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>, two important mediators of nociception (Sommer, Schmidt e George, 1998; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2008). Accordingly, we see a time-dependent increase in the expression of TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in infected DRGs. We detected a slight increase in expression of both mediators at 5 dpi, with the peak occurring at 7 dpi. Interestingly, this coincided with the pattern observed for leukocyte migration, suggesting that, in fact, inflammatory cells infiltrating the DRGs are important to TNF- $\alpha$  and COX-2 production. Indeed, administration of fucoidin to infected animals resulted in decreased mRNA expression of these mediators in infected DRGs, compared to untreated animals.

COX-2 is one of cyclooxygenase isoforms, responsible for conversion of arachidonic acid into prostanoids. Prostaglandins, especially the E series, are able to directly sensitize

nociceptors triggering hypernociception. The ability of prostaglandins to directly sensitize nociceptors has been observed in humans and animals, with the use of electrophysiological and behavioral techniques (Ferreira, 1972; Ferreira, Lorenzetti e Correa, 1978). Among the most important prostaglandins in triggering hypernociception, there is PGE<sub>2</sub>, which is able to induce hyperalgesia by acting directly on nociceptors, decreasing threshold necessary for its activation (Kumazawa, Mizumura e Koda, 1994). Indeed, intraplantar administration of PGE<sub>2</sub> in rats and mice is able to induce mechanical hyperalgesia (Cunha *et al.*, 2012). The blockage of COX-2, by systemic administration of indomethacin, results in mechanical hyperalgesia relief in rats after injury of the sciatic nerve (Syriatowicz *et al.*, 1999). Similarly, we found that systemic administration of indomethacin at 7 dpi resulted in transient reduction of herpetic hyperalgesia. In the model of cutaneous infection with HSV-1, systemic administration of diclofenac, which works by blocking the action of cyclooxygenases, also resulted in transient reduction of mechanical hyperalgesia in a dose-dependent manner (Takasaki, Andoh, Nitta, *et al.*, 2000). In several studies, it was demonstrated that the vast majority of cells that produce COX-2 is present in close proximity to the damaged nerve regions, with a consequent increase in the levels of PGE<sub>2</sub> at this site (Ma e Eisenach, 2003; Schafers *et al.*, 2004). However, we demonstrated that intrathecal indomethacin administration results in decreased hyperalgesia of infected animals throughout the study period (8 days post infection). Similarly, Yamamoto and Nozaki-Taguchi demonstrated that intrathecal administration of indomethacin inhibit phase 1 and 2 responses in the formalin test (Yamamoto e Nozaki-Taguchi, 2002). Identical results were obtained with the intrathecal administration of celecoxib, a selective inhibitor of COX-2 (Nishiyama, 2006). Furthermore, the intrathecal administration of ketorolac, a non-selective COX inhibitor, results in inhibition of response to formalin test (both stages), and also reduces the neural activation in the dorsal horn of the spinal cord ipsilateral to the intraplantar formalin administration (Lee e Seo, 2008). Therefore, these results demonstrate that prostaglandins produced in the nervous system are able to elicit hyperalgesia.

TNF- $\alpha$  is a major pro-inflammatory cytokine, capable of inducing other cytokines and chemokines, and plays an important role in the hyperalgesia. The administration of this cytokine in the sciatic nerve and DRGs of naive animals results in physiological changes in neurons, such as ectopic firing in A $\delta$  fibers, A $\beta$  and C, thus acting directly on the sensitization of nociceptors (Sorkin *et al.*, 1997). Behaviorally, these electrophysiological changes are associated with the induction of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia (Homma, Brull e Zhang, 2002; Murata *et al.*, 2006). After neural injury, an increase in TNF- $\alpha$  mRNA expression is detected in the corresponding DRGs (Sommer, Schmidt e George, 1998;

Schafers *et al.*, 2003). The importance of this cytokine involvement in herpetic hyperalgesia was confirmed by using animals genetically deficient for type 1 receptor of TNF (TNFR1 KO), and by the pharmacological intervention through the administration of infliximab to infected animals. Several studies suggest that activation of TNFR1, but not TNFR2, is crucial to the establishment of hyperalgesia. In naive rats, activation of TNFR1, but not TNFR2 induced hypersensitivity *in vivo* and ectopic firing of neurons of DRGs *in vitro* (Schafers *et al.*, 2008). Furthermore, in the CCI model, the epineural treatment of mice with neutralizing antibodies to TNFR1 resulted in the reduction of thermal hyperalgesia and mechanical allodynia, when compared to animals treated with anti-TNF and anti-TNFR2 (Sommer, Schmidt e George, 1998). The pharmacological interference with TNF- $\alpha$  signaling, through the use of neutralizing antibodies and receptor antagonists, result in the reversal of pain hypersensitivity in models of neuronal injury, even when treatment is started after the establishment of hyperalgesia (Bennett, 2000; Lindenlaub *et al.*, 2000). Therefore, as shown in other HSV-1 models of infection, in cutaneous infection, this cytokine production is detected in DRGs and spinal cord of mice, which plays an important role in genesis and maintenance of hyperalgesia.

In conclusion, our data shows that, during cutaneous HSV-1 infection, the inflammatory response in DRGs is essential to maintenance of herpetic hyperalgesia. Moreover, our results indicates that leukocytes that infiltrates DRGs are responsible for TNF- $\alpha$  and prostaglandins production, which are related to the development of hyperalgesia.

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Sergio R. Rosa, Ieda Santos and Katia Santos . This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Pesquisa. J. R. S is a recipient of a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## References

ABBADIE, C. et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7947-52, Jun 24 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1331358100> >.

ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I.; FIORENZANI, P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1007, p. 232-7, Dec 2003. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ANDOH, T. et al. Paresthesia induced by cutaneous infection with herpes simplex virus in rats. **Neurosci Lett**, v. 190, n. 2, p. 101-4, May 5 1995. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ARAVALLI, R. N. et al. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. **J Immunol**, v. 175, n. 7, p. 4189-93, Oct 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ARBUSOW, V. et al. Latency of herpes simplex virus type-1 in human geniculate and vestibular ganglia is associated with infiltration of CD8+ T cells. **J Med Virol**, v. 82, n. 11, p. 1917-20, Nov 2010. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21904> >.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 436-41, Dec 1993. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BELVISI, M. G.; HELE, D. J. Soft steroids: a new approach to the treatment of inflammatory airways diseases. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, n. 6, p. 321-5, 2003. ISSN 1094-5539 (Print)1094-5539. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1094-5539\(03\)00105-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1094-5539(03)00105-6) >.

BEN-HUR, T. et al. Rescue of HSV-1 neurovirulence is associated with induction of brain interleukin-1 expression, prostaglandin synthesis and neuroendocrine responses. **J Neurovirol**, v. 2, n. 4, p. 279-88, Aug 1996. ISSN 1355-0284 (Print)1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BENNETT, G. J. A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy. **Clin J Pain**, v. 16, n. 3 Suppl, p. S139-43, Sep 2000. ISSN 0749-8047 (Print)0749-8047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BERECZKY-VERESS, B. et al. Influence of perineurial cells and Toll-like receptors 2 and 9 on Herpes simplex type 1 entry to the central nervous system in rat encephalitis. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12350, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012350> >.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**, v. 67, n. 1, p. 67-186, Jan 1987. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BLOOM, D. C.; GIORDANI, N. V.; KWIATKOWSKI, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 246-56, Mar-Apr 2010. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.12.001> >.

BOIVIN, N. et al. The combination of valacyclovir with an anti-TNF alpha antibody increases survival rate compared to antiviral therapy alone in a murine model of herpes simplex virus encephalitis. **Antiviral Res**, v. 100, n. 3, p. 649-53, Dec 2013. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BULLIDO, M. J. et al. Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 8, p. 1160-6, Aug 2008. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.023> >.

CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 7, p. 629-42, Jul 2012. ISSN 1474-4422. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70134-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70134-5) >.

CAO, L.; DELEO, J. A. CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 2, p. 448-58, Feb 2008. ISSN 0014-2980 (Print)0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737485> >.

CATHCART, H. M. et al. Interferon-gamma, macrophages, and virus spread after HSV-1 injection. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 52, n. 7, p. 3984-93, Jun 2011. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.10-6449> >.

CHEN, S. H.; OAKES, J. E.; LAUSCH, R. N. Synergistic anti-HSV effect of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in human corneal fibroblasts is associated with interferon beta induction. **Antiviral Res**, v. 22, n. 1, p. 15-29, Sep 1993. ISSN 0166-3542 (Print)0166-3542. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COLLEONI, M.; SACERDOTE, P. Murine models of human neuropathic pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 10, p. 924-33, Oct 2010. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.012> >.

COLLINS, P.; OLIVER, N. M. Acyclovir treatment of cutaneous herpes in guinea pigs and herpes encephalitis in mice. **Am J Med**, v. 73, n. 1a, p. 96-9, Jul 20 1982. ISSN 0002-9343 (Print)0002-9343. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CUI, J. G. et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 239-48, Dec 1 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CUNHA, T. M. et al. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO signaling pathway. **Mol Pain**, v. 8, p. 10, 2012. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-8-10> >.

\_\_\_\_\_. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 573, n. 1-3, p. 221-9, Nov 14 2007. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.007> >.

\_\_\_\_\_. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008. ISSN 0741-5400 (Print)0741-5400. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0907654> >.

\_\_\_\_\_. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 1 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409225102> >.

\_\_\_\_\_. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p. 401-7, Mar 2004. ISSN 0100-879X (Print)0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DIVITO, S.; CHERPES, T. L.; HENDRICKS, R. L. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. **Immunol Res**, v. 36, n. 1-3, p. 119-26, 2006. ISSN 0257-277X (Print)0257-277x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1385/ir:36:1:119> >.

DUBOVY, P. et al. Intra- and extraneuronal changes of immunofluorescence staining for TNF-alpha and TNFR1 in the dorsal root ganglia of rat peripheral neuropathic pain models. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 7-8, p. 1205-17, Oct-Nov 2006. ISSN 0272-4340 (Print)0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9006-3> >.

DWORKIN, R. H.; PORTENOY, R. K. Pain and its persistence in herpes zoster. **Pain**, v. 67, n. 2-3, p. 241-51, Oct 1996. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EGAN, K. P. et al. Immunological control of herpes simplex virus infections. **J Neurovirol**, v. 19, n. 4, p. 328-45, Aug 2013. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-013-0189-3> >.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol**, v. 240, n. 102, p. 200-3, Dec 13 1972. ISSN 0090-0028 (Print)0090-0028. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Local analgesic effect of morphine on the hyperalgesia induced by cAMP, Ca<sup>2+</sup>, isoprenaline, and PGE<sub>2</sub>. **Adv Prostaglandin Thromboxane Res**, v. 8, p. 1207-15, 1980. ISSN 0361-5952 (Print)0361-5952. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46 Suppl 1, p. 1-9, 1993. ISSN 0012-6667 (Print)0012-6667. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 53, n. 1, p. 39-48, Dec 15 1978. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 179-90, Aug 1979a. ISSN 0090-6980 (Print)0090-6980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 191-200, Aug 1979b. ISSN 0090-6980 (Print)0090-6980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FIRESTEIN, G. S.; PAINE, M. M.; LITTMAN, B. H. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. **Arthritis Rheum**, v. 34, n. 9, p. 1094-105, Sep 1991. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FOLLENFANT, R. L. et al. Inhibition by neuropeptides of interleukin-1 beta-induced, prostaglandin-independent hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 98, n. 1, p. 41-3, Sep 1989. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FORNASARI, D. Pain mechanisms in patients with chronic pain. **Clin Drug Investig**, v. 32 Suppl 1, p. 45-52, Feb 2012. ISSN 1173-2563. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2165/11630070-000000000-00000> >.

GAN, E. Y.; TIAN, E. A.; TEY, H. L. Management of herpes zoster and post-herpetic neuralgia. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, n. 2, p. 77-85, Apr 2013. ISSN 1175-0561 (Print)1175-0561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40257-013-0011-2> >.

GANGAPPA, S.; DESHPANDE, S. P.; ROUSE, B. T. Bystander activation of CD4+ T cells accounts for herpetic ocular lesions. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 41, n. 2, p. 453-9, Feb 2000. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GILDEN, D. et al. Review: The neurobiology of varicella zoster virus infection. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, n. 5, p. 441-63, Aug 2011. ISSN 0305-1846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01167.x> >.

GNANN, J. W., JR. New antivirals with activity against varicella-zoster virus. **Ann Neurol**, v. 35 Suppl, p. S69-72, 1994. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HALFORD, W. P.; GEBHARDT, B. M.; CARR, D. J. Acyclovir blocks cytokine gene expression in trigeminal ganglia latently infected with herpes simplex virus type 1. **Virology**, v. 238, n. 1, p. 53-63, Nov 10 1997. ISSN 0042-6822 (Print)0042-6822. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1997.8806> >.

HEILIGENHAUS, A. et al. CD4+ T-cell type 1 and type 2 cytokines in the HSV-1 infected cornea. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 237, n. 5, p. 399-406, May 1999. ISSN 0721-832X (Print)0721-832x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HERMAN, M. et al. Heterozygous TBK1 mutations impair TLR3 immunity and underlie herpes simplex encephalitis of childhood. **J Exp Med**, v. 209, n. 9, p. 1567-82, Aug 27 2012. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111316> >.

HIGA, K.; SHONO, S.; NITAHARA, K. [Postherpetic neuralgia]. **Masui**, v. 59, n. 11, p. 1342-9, Nov 2010. ISSN 0021-4892 (Print)0021-4892. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOMMA, Y.; BRULL, S. J.; ZHANG, J. M. A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. **Pain**, v. 95, n. 3, p. 239-46, Feb 2002. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HU, P. et al. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 5, p. 599-616, Jul 2007. ISSN 0889-1591 (Print)0889-1591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.013> >.

HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 23-38, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Distinct functional types of macrophage in dorsal root ganglia and spinal nerves proximal to sciatic and spinal nerve transections in the rat. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 590-605, Dec 2003. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00307-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00307-8) >.

JANDER, S. et al. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 975-82, Apr 1998. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JAVED, S. et al. Possible association of lower rate of postherpetic neuralgia in patients on anti-tumor necrosis factor-alpha. **J Med Virol**, v. 83, n. 11, p. 2051-5, Nov 2011. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22182> >.

JAY, G. W.; BARKIN, R. L. Neuropathic pain: etiology, pathophysiology, mechanisms, and evaluations. **Dis Mon**, v. 60, n. 1, p. 6-47, Jan 2014. ISSN 0011-5029. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.12.001> >.

JOHNSON, A. J.; CHU, C. F.; MILLIGAN, G. N. Effector CD4+ T-cell involvement in clearance of infectious herpes simplex virus type 1 from sensory ganglia and spinal cords. **J Virol**, v. 82, n. 19, p. 9678-88, Oct 2008. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01159-08> >.

JOHNSON, R. W. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. Optimal treatment. **Drugs Aging**, v. 10, n. 2, p. 80-94, Feb 1997. ISSN 1170-229X (Print)1170-229x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35093019> >.

JUNG, B. F. et al. Risk factors for postherpetic neuralgia in patients with herpes zoster. **Neurology**, v. 62, n. 9, p. 1545-51, May 11 2004. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KHANNA, K. M. et al. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 593-603, May 2003. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIEFER, R. et al. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 64, n. 2, p. 109-27, Jun 2001. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KIGUCHI, N. et al. CC-chemokine MIP-1alpha in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 484, n. 1, p. 17-21, Oct 22 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.085> >.

KIM, D. et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **J Biol Chem**, v. 282, n. 20, p. 14975-83, May 18 2007. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607277200> >.

KNIPE, D. M. et al. Molecular genetics of herpes simplex virus. VI. Characterization of a temperature-sensitive mutant defective in the expression of all early viral gene products. **J Virol**, v. 38, n. 2, p. 539-47, May 1981. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KODUKULA, P. et al. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. **J Immunol**, v. 162, n. 5, p. 2895-905, Mar 1 1999. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUCHERYAVYKH, Y. V. et al. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. **Glia**, v. 55, n. 3, p. 274-81, Feb 2007. ISSN 0894-1491 (Print)0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20455> >.

KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; KODA, H. Involvement of EP3 subtype of prostaglandin E receptors in PGE2-induced enhancement of the bradykinin response of nociceptors. **Brain Res**, v. 632, n. 1-2, p. 321-4, Dec 31 1993. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Possible involvement of the EP2 receptor subtype in PGE2-induced enhancement of the heat response of nociceptors. **Neurosci Lett**, v. 175, n. 1-2, p. 71-3, Jul 4 1994. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KURT-JONES, E. A. et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 5, p. 1315-20, Feb 3 2004. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308057100> >.

LEE, I. O.; SEO, Y. The effects of intrathecal cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, or nonselective inhibitors on pain behavior and spinal Fos-like immunoreactivity. **Anesth Analg**, v. 106, n. 3, p. 972-7, table of contents, Mar 2008. ISSN 0003-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e318163f602> >.

LI, H. et al. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. **Immunology**, v. 117, n. 2, p. 167-76, Feb 2006. ISSN 0019-2805 (Print)0019-2805. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02275.x> >.

LIMA, G. K. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. **Am J Pathol**, v. 177, n. 5, p. 2433-45, Nov 2010. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100121> >.

LINDENLAUB, T. et al. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. **Brain Res**, v. 866, n. 1-2, p. 15-22, Jun 2000. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIU, H. et al. TLR4-MyD88/Mal-NF-kB axis is involved in infection of HSV-2 in human cervical epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80327, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080327> >.

LIU, T. et al. Gamma interferon can prevent herpes simplex virus type 1 reactivation from latency in sensory neurons. **J Virol**, v. 75, n. 22, p. 11178-84, Nov 2001. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.22.11178-11184.2001> >.

LIU, T.; VAN ROOIJEN, N.; TRACEY, D. J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 25-32, May 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIU, Z. et al. HSV-1 activates NF-kappaB in mouse astrocytes and increases TNF-alpha and IL-6 expression via Toll-like receptor 3. **Neurol Res**, v. 35, n. 7, p. 755-62, Sep 2013. ISSN 0161-6412. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/016164113x13703372991516> >.

\_\_\_\_\_. [Interleukin-6 and immune state in children with nephrotic syndrome]. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 27, n. 4, p. 408-10, Dec 1996. ISSN 0257-7712 (Print)0257-7712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOESER, J. D. Low back pain. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**, v. 58, p. 363-77, 1980. ISSN 0091-7443 (Print)0091-7443. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Herpes zoster and postherpetic neuralgia. **Pain**, v. 25, n. 2, p. 149-64, May 1986. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, May 8 1999. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01311-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01311-2) >.

LOKENS GARD, J. R. et al. Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. **J Neurovirol**, v. 7, n. 3, p. 208-19, Jun 2001. ISSN 1355-0284 (Print)1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LU, X.; RICHARDSON, P. M. Inflammation near the nerve cell body enhances axonal regeneration. **J Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 972-8, Apr 1991. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LUNDBERG, P. et al. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. **J Virol**, v.

82, n. 14, p. 7078-88, Jul 2008. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00619-08> >.

MA, W.; EISENACH, J. C. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 691-704, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MANSUR, D. S. et al. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. **Am J Pathol**, v. 166, n. 5, p. 1419-26, May 2005. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62359-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62359-0) >.

MARK, K. E. et al. Topical resiquimod 0.01% gel decreases herpes simplex virus type 2 genital shedding: a randomized, controlled trial. **J Infect Dis**, v. 195, n. 9, p. 1324-31, May 1 2007. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/513276> >.

MARQUES, C. P. et al. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. **J Neurovirol**, v. 14, n. 3, p. 229-38, May 2008. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/13550280802093927> >.

\_\_\_\_\_. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. **J Immunol**, v. 181, n. 9, p. 6417-26, Nov 1 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MENASRIA, R. et al. Both TRIF and IPS-1 adaptor proteins contribute to the cerebral innate immune response against herpes simplex virus 1 infection. **J Virol**, v. 87, n. 13, p. 7301-8, Jul 2013. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00591-13> >.

MENSAH-NYAGAN, A. G. et al. Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 Suppl 1, p. S169-77, Dec 2009. ISSN 1873-3360. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19577851> >.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MILLER, C. S.; DANAHER, R. J.; JACOB, R. J. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 4, p. 541-62, 1998. ISSN 1045-4411 (Print)1045-4411. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, Jan 2009. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2533> >.

MOALEM, G.; XU, K.; YU, L. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 3, p. 767-77, 2004. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.035> >.

MOORE, R. A. et al. Gabapentin for chronic neuropathic pain and fibromyalgia in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, p. Cd007938, 2014. ISSN 1361-6137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD007938.pub3> >.

MORIN, N. et al. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **J Neuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 164-71, Mar 2007. ISSN 0165-5728 (Print)0165-5728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.12.009> >.

MOTT, K. et al. Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 48, n. 12, p. 5605-15, Dec 2007. ISSN 0146-0404 (Print)0146-0404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-0894> >.

MURATA, Y. et al. Changes in pain behavior and histologic changes caused by application of tumor necrosis factor-alpha to the dorsal root ganglion in rats. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 31, n. 5, p. 530-5, Mar 1 2006. ISSN 0362-2436. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.brs.0000201260.10082.23> >.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 135, n. 2, p. 145-53, Mar 17 1987. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAMAKA, M. et al. A treatment algorithm for neuropathic pain. **Clin Ther**, v. 26, n. 7, p. 951-79, Jul 2004. ISSN 0149-2918 (Print)0149-2918. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NISHIYAMA, T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 50, n. 2, p. 228-33, Feb 2006. ISSN 0001-5172 (Print)0001-5172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.2006.00921.x> >.

NURMIKKO, T. J.; RASANEN, A.; HAKKINEN, V. Clinical and neurophysiological observations on acute herpes zoster. **Clin J Pain**, v. 6, n. 4, p. 284-90, Dec 1990. ISSN 0749-8047 (Print)0749-8047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OHARA, P. T.; TAUSCHER, A. N.; LAVAIL, J. H. Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea. **Brain Res**, v. 899, n. 1-2, p. 260-3, Apr 27 2001. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

OPSTELTEN, W. et al. The impact of varicella zoster virus: chronic pain. **J Clin Virol**, v. 48 Suppl 1, p. S8-13, May 2010. ISSN 1386-6532. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(10\)70003-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(10)70003-2) >.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745-57, 2000. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PETHO, G.; REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiol Rev**, v. 92, n. 4, p. 1699-775, Oct 2012. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00048.2010> >.

PLACEK, B. J.; BERGER, S. L. Chromatin dynamics during herpes simplex virus-1 lytic infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 223-7, Mar-Apr 2010. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.012> >.

PORTENOY, R. K.; DUMA, C.; FOLEY, K. M. Acute herpetic and postherpetic neuralgia: clinical review and current management. **Ann Neurol**, v. 20, n. 6, p. 651-64, Dec 1986. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410200602> >.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F. Y.; DELEO, J. A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 467-73, Jul 2004. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03514.x> >.

RAJASAGI, N. K. et al. CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. **J Virol**, v. 83, n. 10, p. 5256-68, May 2009. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01997-08> >.

SANCHO-SHIMIZU, V. et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. **J Clin Invest**, v. 121, n. 12, p. 4889-902, Dec 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci59259> >.

SASAKI, A. et al. Different roles of nitric oxide synthase-1 and -2 between herpetic and postherpetic allodynia in mice. **Neuroscience**, v. 150, n. 2, p. 459-66, Dec 5 2007. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.067> >.

\_\_\_\_\_. Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 3, p. 266-73, Nov 2008. ISSN 1347-8613 (Print)1347-8613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SATO-TAKEDA, M. et al. Major histocompatibility complex haplotype is associated with postherpetic pain in mice. **Anesthesiology**, v. 104, n. 5, p. 1063-9, May 2006. ISSN 0003-3022 (Print)0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAWYNOK, J. Topical analgesics for neuropathic pain: preclinical exploration, clinical validation, future development. **Eur J Pain**, v. 18, n. 4, p. 465-81, Apr 2014. ISSN 1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00400.x> >.

SCHAEFFER, H. J. et al. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. **Nature**, v. 272, n. 5654, p. 583-5, Apr 13 1978. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SCHAFERS, M. et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp Neurol**, v. 185, n. 1, p. 160-8, Jan 2004. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 414-23, Nov 19 2008. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.08.067> >.

\_\_\_\_\_. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. **Neurosci Lett**, v. 347, n. 3, p. 179-82, Aug 28 2003. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SERGERIE, Y.; RIVEST, S.; BOIVIN, G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. **J Infect Dis**, v. 196, n. 6, p. 853-60, Sep 15 2007. ISSN 0022-1899 (Print)0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1086/520094> >.

SHAW, S. K. et al. Activated polymorphonuclear cells promote injury and excitability of dorsal root ganglia neurons. **Exp Neurol**, v. 210, n. 2, p. 286-94, Apr 2008. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.024> >.

SHERIDAN, B. S. et al. Reevaluating the CD8 T-cell response to herpes simplex virus type 1: involvement of CD8 T cells reactive to subdominant epitopes. **J Virol**, v. 83, n. 5, p. 2237-45, Mar 2009. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01699-08> >.

SHIMAOKA, M. et al. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 1, p. 307-11, Jan 1996. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.153.1.8542135> >.

SHIMELD, C. et al. Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. **J Neuroimmunol**, v. 61, n. 1, p. 7-16, Aug 1995. ISSN 0165-5728 (Print)0165-5728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIBILIA, J. [Corticosteroids and inflammation]. **Rev Prat**, v. 53, n. 5, p. 495-501, Mar 1 2003. ISSN 0035-2640 (Print)0035-2640. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIMMONS, A.; NASH, A. A. Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. **J Virol**, v. 52, n. 3, p. 816-21, Dec 1984. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOMMER, C. [Animal studies on neuropathic pain: the role of cytokines and cytokine receptors in pathogenesis and therapy]. **Schmerz**, v. 13, n. 5, p. 315-23, Oct 15 1999. ISSN 0932-433X (Print)0932-433x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s004829900038> >.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp Neurol**, v. 151, n. 1, p. 138-42, May 1998. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1998.6797> >.

SORKIN, L. S. et al. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 255-62, Nov 1997. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ST LEGER, A. J.; HENDRICKS, R. L. CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. **J Neurovirol**, v. 17, n. 6, p. 528-34, Dec 2011. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-011-0062-1> >.

STANKUS, S. J.; DLUGOPOLSKI, M.; PACKER, D. Management of herpes zoster (shingles) and postherpetic neuralgia. **Am Fam Physician**, v. 61, n. 8, p. 2437-44, 2447-8, Apr 15 2000. ISSN 0002-838X (Print)0002-838x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STOCK, A. T. et al. Rapid recruitment and activation of CD8+ T cells after herpes simplex virus type 1 skin infection. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 1, p. 143-8, Jan 2011. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2010.66> >.

STRANGFELD, A. et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. **Jama**, v. 301, n. 7, p. 737-44, Feb 18 2009. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.146> >.

STRAUS, S. E. et al. NIH conference. Varicella-zoster virus infections. Biology, natural history, treatment, and prevention. **Ann Intern Med**, v. 108, n. 2, p. 221-37, Feb 1988. ISSN 0003-4819 (Print)0003-4819. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUNG, C. S. et al. Minocycline and fluorocitrate suppress spinal nociceptive signaling in intrathecal IL-1beta-induced thermal hyperalgesic rats. **Glia**, v. 60, n. 12, p. 2004-17, Dec 2012. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22415> >.

SVENSSON, A. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 3 confer natural resistance to human herpes simplex virus type 2 infection. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 8, p. 1717-24, Aug 2012. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.042572-0> >.

SYRIATOWICZ, J. P. et al. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**, v. 94, n. 2, p. 587-94, 1999. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKASAKI, I. et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of a mouse model of acute herpetic pain. **Jpn J Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 319-26, Aug 2000. ISSN 0021-5198 (Print)0021-5198. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 95-101, May 2000. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

\_\_\_\_\_. Effects of analgesics on delayed postherpetic pain in mice. **Anesthesiology**, v. 96, n. 5, p. 1168-74, May 2002. ISSN 0003-3022 (Print)0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, Feb 2004. ISSN 1044-5323 (Print)1044-5323. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TANGA, F. Y.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J. A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 16, p. 5856-61, Apr 19 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501634102> >.

TEAGUE, O.; GOODPASTURE, E. W. Experimental Herpes Zoster. **J Med Res**, v. 44, n. 2, p. 185-200.7, Dec 1923. ISSN 0097-3599 (Print)0097-3599. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

UCEYLER, N.; TSCHARKE, A.; SOMMER, C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 5, p. 553-

60, Jul 2007. ISSN 0889-1591 (Print)0889-1591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.003> >.

VERJANS, G. M. et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 9, p. 3496-501, Feb 27 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610847104> >.

VERRI, W. A., JR. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p. 116-38, Oct 2006. ISSN 0163-7258 (Print)0163-7258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001> >.

VILLALBA, M. et al. Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 3, p. 371-9, Aug 2012. ISSN 0300-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-012-0247-0> >.

WANG, J. P. et al. Role of specific innate immune responses in herpes simplex virus infection of the central nervous system. **J Virol**, v. 86, n. 4, p. 2273-81, Feb 2012. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.06010-11> >.

WATANABE, D. et al. The role of polymorphonuclear leukocyte infiltration in herpes simplex virus infection of murine skin. **Arch Dermatol Res**, v. 291, n. 1, p. 28-36, Jan 1999. ISSN 0340-3696 (Print)0340-3696. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WATANABE, K. et al. Etanercept attenuates pain-related behavior following compression of the dorsal root ganglion in the rat. **Eur Spine J**, v. 20, n. 11, p. 1877-84, Nov 2011. ISSN 0940-6719. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-011-1854-y> >.

WATSON, C. P. et al. The prognosis with postherpetic neuralgia. **Pain**, v. 46, n. 2, p. 195-9, Aug 1991. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WELLER, T. H. Varicella and herpes zoster. Changing concepts of the natural history, control, and importance of a not-so-benign virus. **N Engl J Med**, v. 309, n. 23, p. 1434-40, Dec 8 1983. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198312083092306> >.

WHITLEY, R. J. et al. Acyclovir with and without prednisone for the treatment of herpes zoster. A randomized, placebo-controlled trial. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. **Ann Intern Med**, v. 125, n. 5, p. 376-83, Sep 1 1996. ISSN 0003-4819 (Print)0003-4819. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 617-53, May 2000. ISSN 0023-6837 (Print)0023-6837. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. **Anesth Analg**, v. 94, n. 4, p. 962-7, table of contents, Apr 2002. ISSN 0003-2999 (Print)0003-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

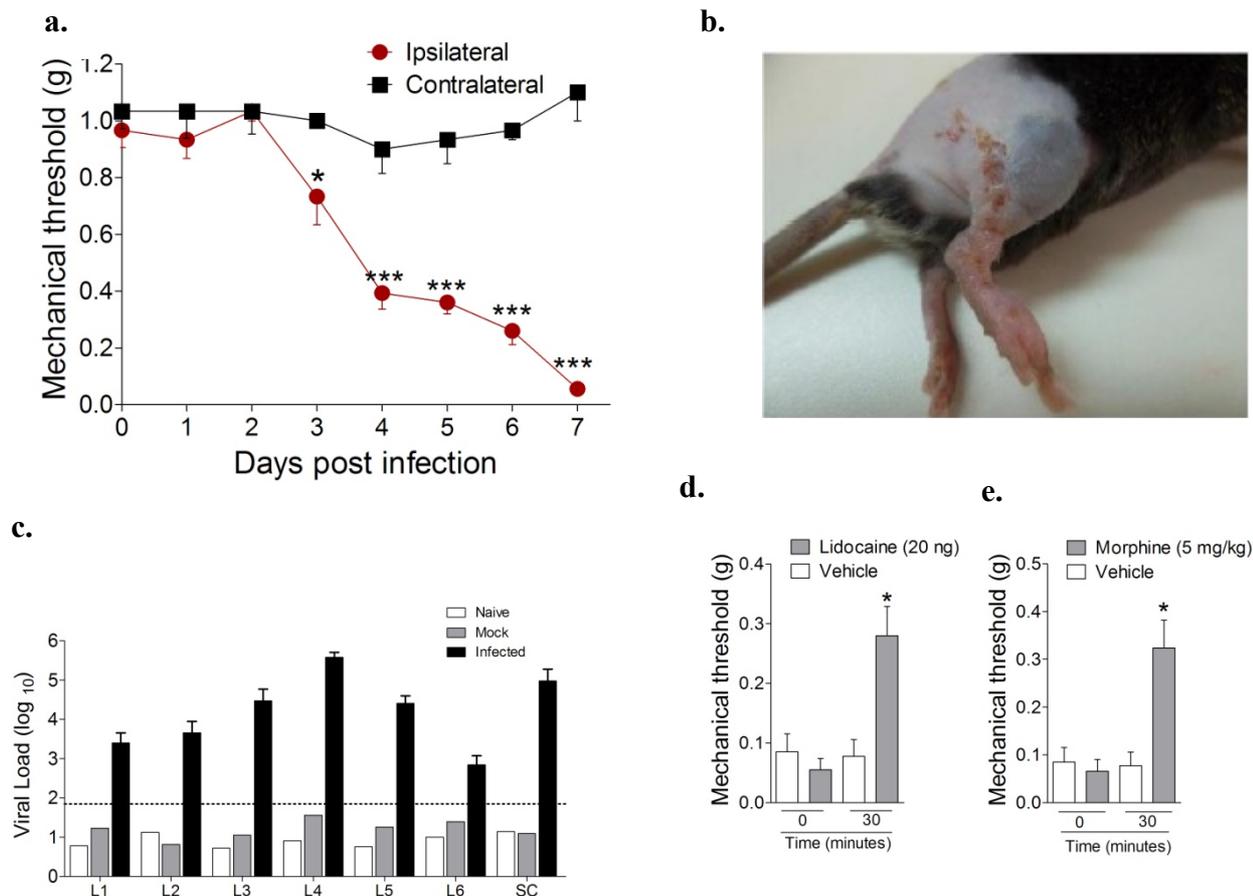
YANG, C. A. et al. Association of TLR3-hyporesponsiveness and functional TLR3 L412F polymorphism with recurrent herpes labialis. **Hum Immunol**, v. 73, n. 8, p. 844-51, Aug 2012. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.008> >.

ZHENG, M. et al. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Mediated Cell Survival Promotes HSV-1 Induced Murine ARN. 05/01/2005 2005. Disponível em: < <http://abstracts.iovs.org/cgi/content/abstract/46/5/2791> >.

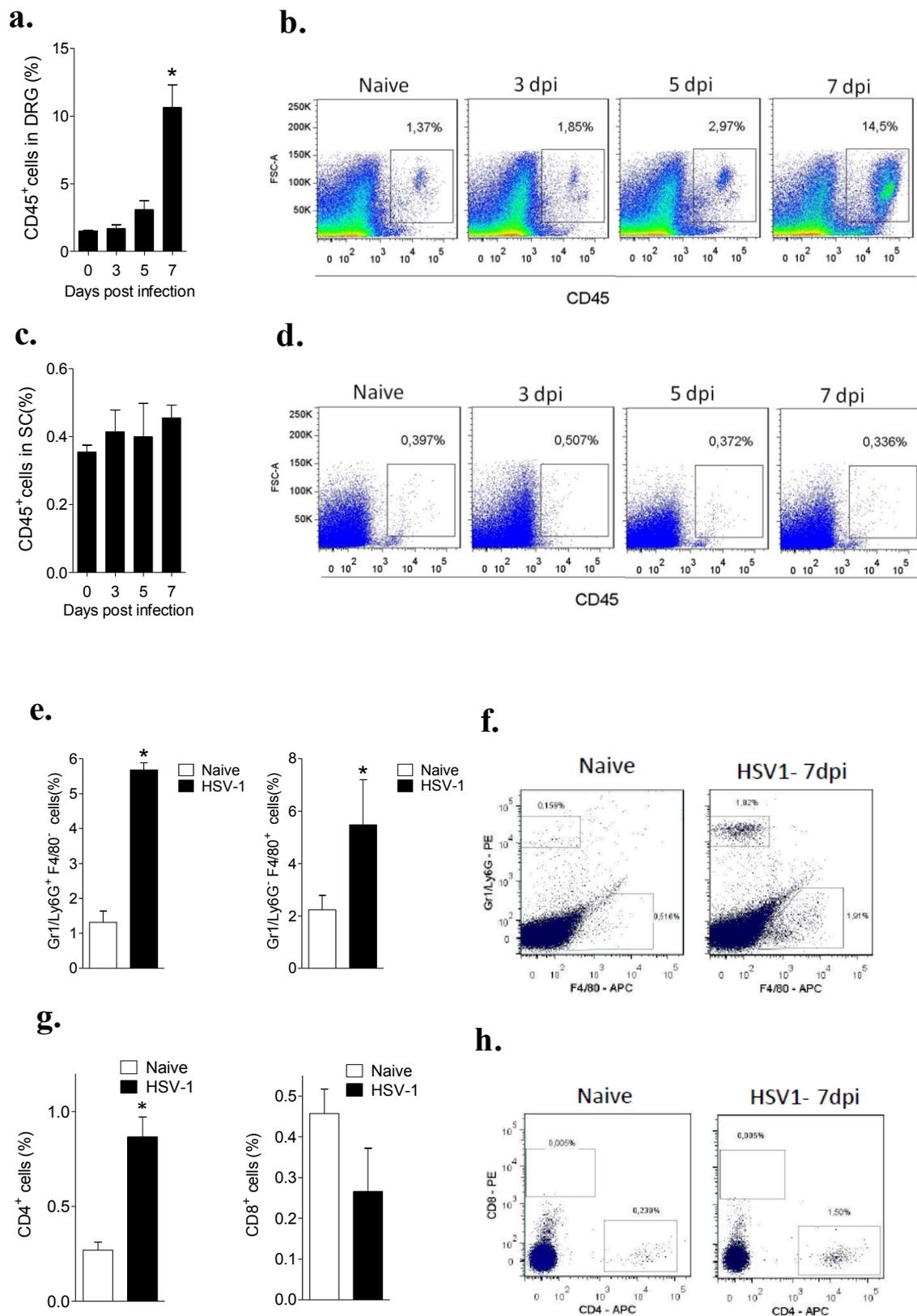
ZHOU, C. J. et al. Changes in the distribution of peanut agglutinin (PNA) binding molecules during muscle reinnervation following nerve crush injury. **Arch Histol Cytol**, v. 62, n. 3, p. 261-72, Aug 1999. ISSN 0914-9465 (Print)0914-9465. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHOU, Y. et al. Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 13, p. 2916-25, Oct 2009. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.22110> >.

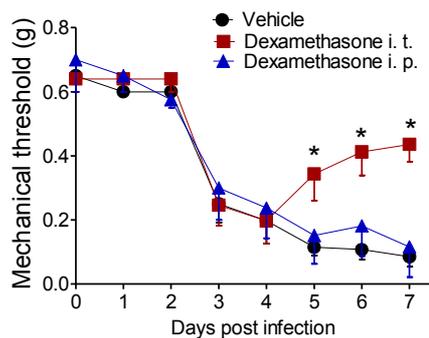
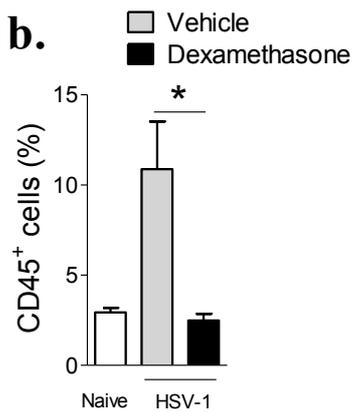
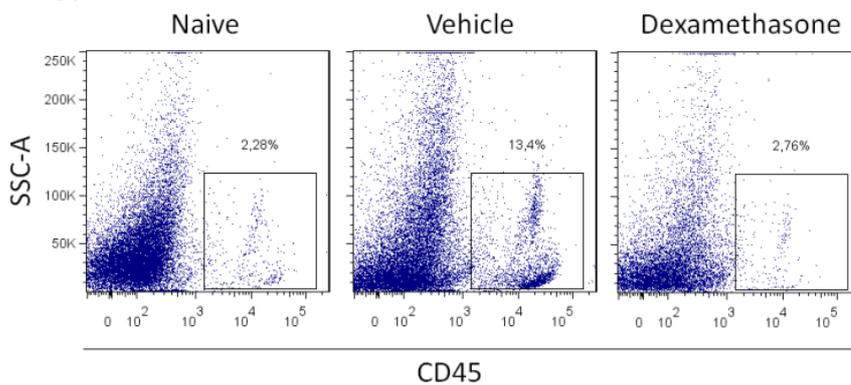
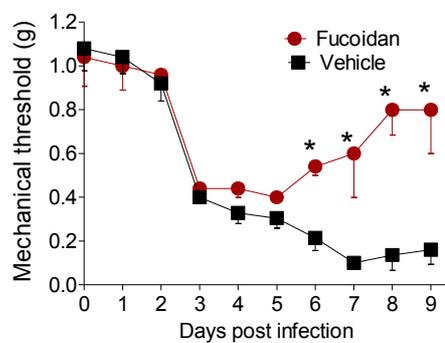
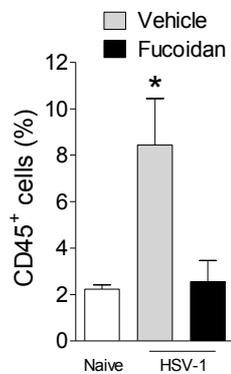
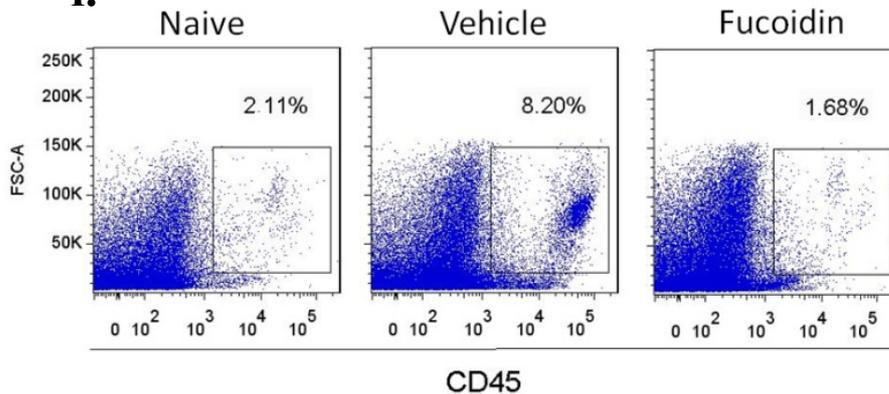
## Figures and Legends



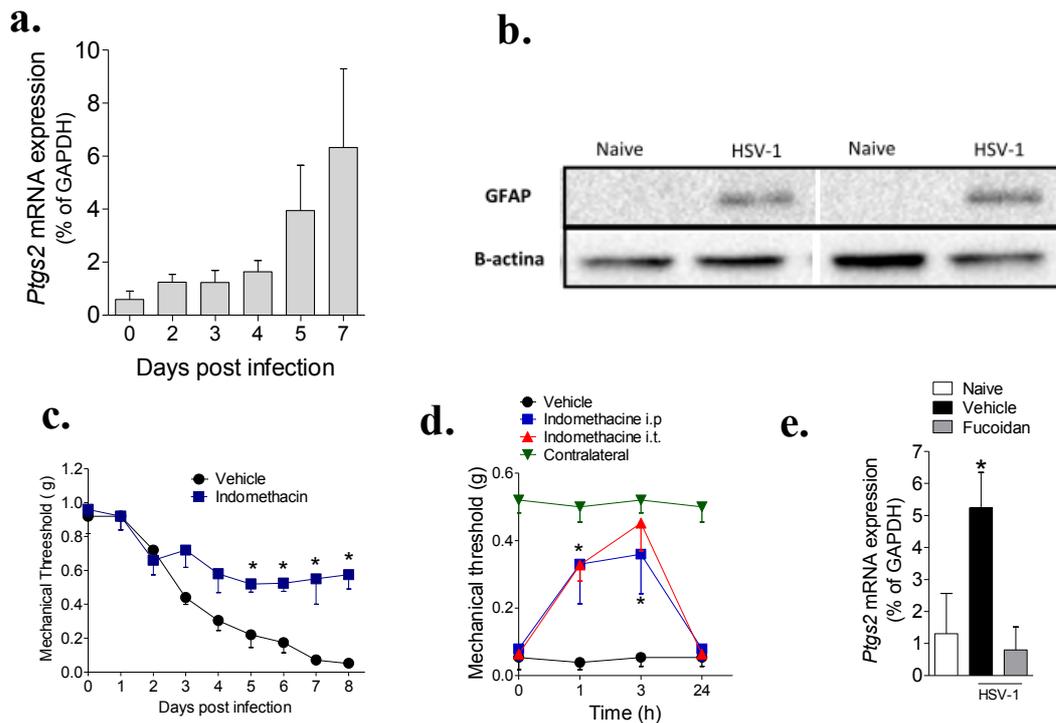
**Figure 1. Characterization of herpetic hyperalgesia in mice.** Mice were inoculated with HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units) on the shin of the right hind paw. (a) Values of mechanical nociceptive thresholds of infected C57BL/6 mice at 7 dpi. (b) Representative picture of skin zosteriform lesion at 7 dpi. (c) Viral load of L2, L3, L4, L5 and L6 dorsal root ganglion of infected mice at 7 dpi. (d) Infected C57BL/6 mice were treated with lidocaine (20 ng, subcutaneous) or morphine (5 mg/kg, intraperitoneal) at 7 dpi. Values of mechanical nociceptive thresholds before and 30 minutes after treatment. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



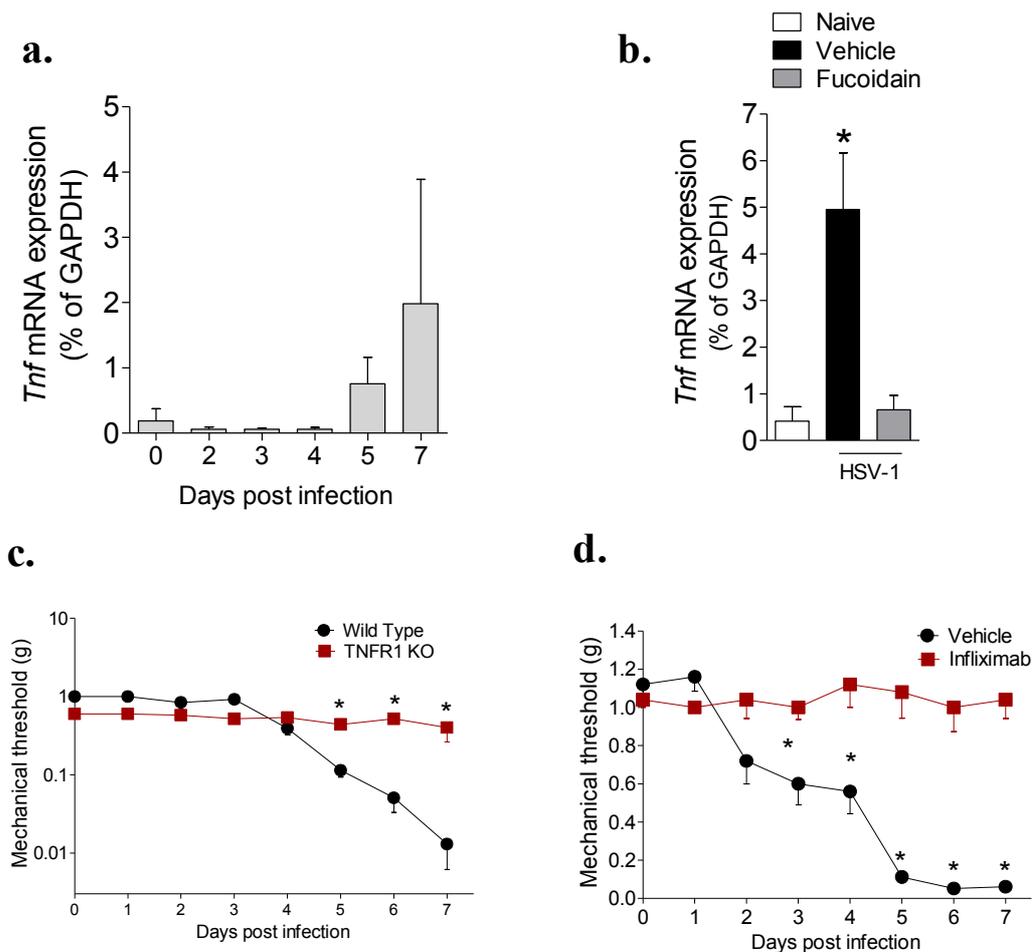
**Figure 2. Leukocyte infiltration during acute HSV-1 infection.** Mice were inoculated with HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units) on the shin of the right hind paw. At 3,5 and 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 and spinal cord were collected, and flow cytometry was performed. (a) Leukocyte (CD45+) infiltration in DRGs. (b) Representative dotplot of leukocyte infiltration in DRGs. (c) Leukocyte (CD45+) infiltration in spinal cord. (d) Representative dotplot of leukocyte infiltration in spinal cord. (e) Neutrophil (Gr1/Ly6-G+/F4/80- cells) and macrophage (Gr1/Ly6-G-/F4/80+ cells) infiltration in DRGs. (f) Representative dotplot of neutrophil and macrophage infiltration in DRGs. (g) T CD4+ lymphocyte (CD4+/CD8- cells) and T CD8+ lymphocyte (CD4-/CD8+ cells) infiltration in DRGs. (h) Representative dotplot of T CD4+ and T CD8+ lymphocyte infiltration in DRGs. DRG=dorsal root ganglion; SC=spinal cord. \* $p < 0,001$ .

**a.****b.****c.****d.****e.****f.**

**Figure 3. The inflammation in DRGs is important for herpetic hyperalgesia maintenance.** Mice were inoculated with HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units) on the shin of the right hind paw. (a) Mice were treated daily with dexamethasone (5 $\mu$ g), intratechally (i.t.) or intraperitoneally (i.p.), or saline (vehicle) from 2th dpi to 7 dpi. Values of mechanical nociceptive thresholds of vehicle and treated mice (intrathecal and intraperitoneal) from 0 to 7 dpi. (b) At 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 were collected, and flow citometry was performed. Leukocyte (CD45+) infiltration in DRGs of vehicle and mice treated with dexamethasone (5 $\mu$ g, intrathecal). (c) Representative dotplot of leukocyte infiltration in DRGs of vehicle and dexamethasone treated mice. (d) Infected mice were treated daily with fucoidan (20 mg/kg, intravenous) or saline (vehicle) from 2th dpi to 9 dpi. Values of mechanical nociceptive thresholds of vehicle and treated mice (intrathecal and intraperitoneal) from 0 to 9 dpi. (e) At 9 dpi, DRGs L4, L5 and L6 were collected, and flow citometry was performed. Leukocyte (CD45+) infiltration in DRGs of vehicle and mice treated with fucoidan. (f) Representative dotplot of leukocyte infiltration in DRGs of vehicle and fucoidan treated mice. \* $p < 0,01$ .



**Figure 4. Prostaglandins are related to the genesis and maintenance of herpetic hyperalgesia.** Mice were inoculated with HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units) on the skin of the right hind paw. (a) At 0, 2, 3, 4, 5 and 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 were collected and RT-PCR was performed using primers for murine COX-2 gene (*Ptgs2*). Relative expression to *Gapdh* gene. (b) COX-2 protein expression of infected mice at 7 dpi. (c) Infected mice were treated daily with indomethacin (10  $\mu$ g, intrathecal) or saline (vehicle) from 2th dpi to 8 dpi. Values of mechanical nociceptive thresholds of vehicle and treated mice from 0 to 8 dpi. (d) At 7 dpi, infected mice were treated with indomethacin intratechally (i.t. - 10 $\mu$ g), indomethacin intraperitoneally (i.p.- 5 mg/kg) or vehicle (saline). Values of mechanical nociceptive thresholds of vehicle and treated mice (i.t. and i.p.) were obtained before and after treatment (1, 3 and 24 h). (f) Infected mice were treated daily with fucoidan (20 mg/kg, intravenous) or saline (vehicle) from 2th dpi to 7 dpi. At 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 of treated, vehicle and naïve mice were collected and RT-PCR was performed using primers for murine COX-2 gene (*Ptgs2*). Relative expression to *Gapdh* gene. \* $p < 0,01$ .



**Figure 5. TNF- $\alpha$  is essential to the development and maintenance of herpetic hyperalgesia.** Mice were inoculated with HSV-1 ( $2 \times 10^5$  plaque-forming units) on the shin of the right hind paw. (a) At 0, 2, 3, 4, 5 and 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 were collected and RT-PCR was performed using primers for murine TNF- $\alpha$  gene (*Tnf*). Relative expression to *Gapdh* gene. (b) Infected mice were treated daily with fucoidan (20 mg/kg, intravenous) or saline (vehicle) from 2th dpi to 7 dpi. At 7 dpi, DRGs L4, L5 and L6 of treated, vehicle and naïve mice were collected and RT-PCR was performed using primers for murine TNF- $\alpha$  gene (*Tnf*). Relative expression to *Gapdh* gene. (c) Values of mechanical nociceptive thresholds of wild type and TNFR1 KO mice. Values are expressed as log<sub>10</sub>. (d) Infected mice were treated daily with infliximab (1  $\mu$ g, intrathecal) or saline (vehicle) from 2th dpi to 7 dpi. Values of mechanical nociceptive thresholds of vehicle and treated mice from 0 to 7 dpi.