

# Inflammatory mediators of neuropathic pain

## Mediadores inflamatórios na dor neuropática

José Oswaldo de Oliveira Júnior<sup>1</sup>, Caio Sander Andrade Portella Junior<sup>2</sup>, Cláudia Panossian Cohen<sup>3</sup>

DOI 10.5935/1806-0013.20160045

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Pro-inflammatory chemical mediators and algogenic substances seem to be confused by the sharing of their actions and by interactions in painful and inflammatory presentation. This study aimed at presenting a review of major inflammatory chemical mediators and place them in neuropathic pain pathophysiology.

**CONTENTS:** Inflammation is the homeostatic response of vascularized tissues to remove harmful agents and restore their normal functions. Nervous system (central and/or peripheral) diseases and injuries may induce neuropathic pain and may also modify inflammatory process nervous mediation. In such pathological conditions, there might be pain without restrict link with admittedly harmful or painful stimuli, as well as there might be inflammation without restrict link with the presence of harmful agents and the need to remove them. Chemical mediators involved in neuropathic pain and inflammation pathophysiology modulate the presentation of both.

**CONCLUSION:** Studies on inflammation offer evidences to support the important role of their chemical mediators in neuropathic pain pathogenesis. In peripheral and central sensitization, a thin borderline between reversibility or not of neuropathic pain may be respected or exceeded by inflammatory mediators actions.

**Keywords:** Adenosine triphosphate, Bradykinin, Chemical mediators, Chemokines, Citokines, Eicosanoids, Histamine, Inflammation, Neuropathic pain, Neurotrophic factors.

### RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Mediadores químicos pró-inflamatórios e substâncias algogênicas parecem se confundir pelo compartilhamento de suas ações e pelas interações no quadro doloroso e inflamatório. O objetivo deste estudo foi apresentar uma revisão sobre os principais mediadores químicos inflamatórios e situá-los na fisiopatologia da dor neuropática.

**CONTEÚDO:** A inflamação é a resposta homeostática de tecidos vascularizados no sentido de remoção de agentes lesivos e restauro de suas funções normais. Doenças e lesões no sistema nervoso (central e/ou periférico) podem causar dor neuropática, e, também modificar a mediação nervosa do processo inflamatório. Nessas condições patológicas a dor pode ocorrer sem o vínculo restrito com estímulo reconhecidamente nocivo ou doloroso, assim como ocorrer quadro inflamatório sem o vínculo restrito com a presença de agentes lesivos e a necessidade de removê-los. Os mediadores químicos envolvidos na fisiopatologia da dor neuropática e da inflamação modulam o quadro de ambas.

**CONCLUSÃO:** Os estudos sobre inflamação oferecem evidências para embasar a importância do papel dos seus mediadores químicos na patogênese da dor neuropática. Na sensibilização periférica e, também na central uma fronteira tênue entre a reversibilidade ou não do quadro neuropático pode ser respeitada ou ultrapassada pelas ações de mediadores inflamatórios.

**Descritores:** Bradicina, Citocina, Dor neuropática, Eicosanóides, Fatores neurotróficos, Histamina, Inflamação, Mediadores químicos, Quimiocinas, Trifosfato de adenosina.

### INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta homeostática de tecidos vascularizados no sentido de remoção de agentes lesivos e restauro de suas funções normais<sup>1</sup>. Doenças e lesões no sistema nervoso (central e/ou periférico) (SNC, SNP) podem causar dor neuropática (DN), e, também modificar a mediação nervosa do processo inflamatório. Nessas condições patológicas a dor pode ocorrer sem o vínculo restrito com estímulo reconhecidamente nocivo ou doloroso, assim como ocorrer quadro inflamatório sem o vínculo restrito com a presença de agentes lesivos e a necessidade de removê-los.

DN é fruto da regeneração imperfeita do SNP e/ou SNC<sup>2</sup>. A inflamação é parte fundamental da tentativa de restauro celular/tecidual e pode receber a modulação de um sistema nervoso íntegro ou defeituoso. A própria causa original da inflamação pode ou não ser também da DN, a interação dos processos inflamatórios e neuropáticos ocorrerá inexoravelmente.

Conforme o tempo de sua resolução a inflamação pode ser aguda ou crônica. Na aguda, alterações vasculares resultam no acúmulo de fluidos e células polimorfonucleares no local da lesão. A migração dos elementos figurados do sangue parece ser orientada pela concentração de prostaglandinas que modificaria a afinidade dos receptores das cadeias externas de moléculas de adesão. As respostas inflamatórias agudas podem ser sistêmicas e incluir hipertermia, leucocitose, catabolismo proteico e síntese hepática de proteínas plasmáticas como a proteína C-reativa<sup>1</sup>. Na inflamação crônica são característicos o infiltrado celular (linfocítico e macrofágico), e a ocorrência simultânea de lesão e reparação.

A dor é integrante dos primeiros quatro sinais clássicos da inflamação juntamente com rubor, tumor e calor. Atualmente, são reconhecidos como decorrentes de série de eventos quimicamente mediados, como alterações locais de fluxo e de permeabilidade vascular, infiltrado de leucócitos e liberação de substâncias algogênicas<sup>3</sup>.

Na maioria das vezes, esses fenômenos levam à resolução do processo; entretanto, nos casos em que a inflamação evolui para a cronicidade pode haver destruição tecidual e o aparecimento do quinto e mais deletério sinal inflamatório: a perda da função<sup>3</sup>.

O processo inflamatório é multimediado e às vezes até mesmo estereotipado, mas, pode mostrar respostas diferentes em função da natureza do agente lesivo, do tipo celular que predomina em determinados infiltrados e da participação de diferentes mediadores químicos<sup>3</sup>.

### DOR E SENSIBILIZAÇÃO

A dor, em geral, é a percepção desagradável de uma sensação nociceptiva. A dor não é um evento isolado, mas, sim uma sucessão de eventos de modos linear e não linear, que leva a um estado de hiperatividade defensiva, elevando a chance de detectar novos estímulos e otimizando o sistema de defesa<sup>4</sup>.

A dor é um sintoma, uma queixa. A dor existe se existir a sua queixa. É sem dúvidas uma manifestação de expressão verbal, e em sentido mais amplo corporal. Seu estudo não deve permitir uma dissociação do biológico, do cultural e do psíquico, no entanto, as alterações decorrentes dos dois últimos são perceptíveis não apenas no sistema nervoso central<sup>4</sup>.

### A sensibilização à dor e a inflamação na periferia e no sistema nervoso periférico

Na periferia, substâncias liberadas durante a lesão tissular, que normalmente são encontradas em concentração relevante apenas no interior das células, agem como sensibilizadoras dos receptores dolorosos periféricos. Receptores ativos se tornam hiperativos, enquanto os chamados silentes passam para a condição de ativo. Ocorre redução global dos limiares dos nociceptores<sup>4</sup>. As substâncias liberadas para o interstício são chamadas de algogênicas e difundem-se de modo osmótico para áreas vizinhas. Na difusão osmótica passiva os efeitos das substâncias ativas são proporcionais à medida que se distanciam do fulcro inicial. As substâncias algogênicas são chamadas de pró-inflamatórias pois podem pro-

1. Fundação Antônio Prudente, Escola de Cancerologia Celestino Bourroul, Departamento de Terapia Antálgica, Cirurgia Funcional e Cuidados Paliativos, São Paulo, SP, Brasil.

2. Hospital Deputado Luis Eduardo Magalhães, Serviço de Neurocirurgia, Porto Seguro, BA, Brasil.

3. Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Grupo de Dor, São Paulo, SP, Brasil.

Conflitos de interesse: não há - Fontes de fomento: não há.

#### Endereço para correspondência:

José Oswaldo de Oliveira Júnior  
Rua Pedroso Alvarenga, 1062, conjunto 55, 5º andar  
04531-004 São Paulo, SP, Brasil.  
E-mail: jo.oliveirajr@yahoo.com.br

mover dilatação e alteração da permeabilidade vascular, causar rubor, calor e edema, além de facilitação da detecção de estímulos potencialmente lesivos.

Dentre as substâncias algogênicas se destacam as prostaglandinas do tipo E<sub>2</sub> que, pela potência e interação com outras substâncias a partir de concentrações mínimas, têm efeito sensibilizante periférico e deflagram potenciais de ação centrípetos ou ortodrípicos dos nociceptores<sup>4,5</sup>.

A citólise oferece membranas celulares para a degradação, uma outra fonte de substâncias pró-inflamatórias e algogênicas. Seus metabólitos incluem as prostaglandinas e prostaciclina, leucotrienos, tromboxanos, entre outros, que participam da chamada “sopa inflamatória”<sup>4,6</sup>.

Os nociceptores recebem os estímulos dolorosos e, após transduzi-los, transmitem-nos rumo ao segundo neurônio sensitivo localizado no corno posterior da substância cinzenta medular.

Os nociceptores interagem como o meio quando estão excitados, produzindo e liberando substâncias algogênicas (pró-inflamatórias) especiais, como as taquicinas A, B e a substância P, um polipeptídeo relacionado como o gene da calcitonina e a somatostatina. Essas substâncias liberadas no interstício também se difundem por osmose e agem a distância como as outras substâncias algogênicas e pró-inflamatórias, reduzindo também os limiares dos nociceptores. Agem também em células vizinhas, fazendo-as degranular e liberar substâncias pró-inflamatórias e algogênicas. A função secretora dos nociceptores é prova da ação inflamatória neurogênica<sup>4,6</sup>.

Os receptores dolorosos possuem também receptores próprios, como os que detectam a presença de enzimas proteolíticas, em especial as triptases. A estimulação dos receptores de triptases exerce potente efeito no aumento da produção de agentes pró-inflamatórios e algogênicos pelos nociceptores.

#### A sensibilização à dor e a inflamação no sistema nervoso central

A sensibilização central compreende aumento da função neuronal individual (celular) e de circuitos nociceptivos (multicelulares, neuronais e glias) causados por incremento da excitabilidade da membrana e da eficácia sináptica e também por redução da inibição e da plasticidade do sistema nervoso somatossensitivo em resposta a uma inflamação periférica, atividade anormal ou lesão nervosa. Ocorre depois de um estímulo nociceptivo intenso ou repetitivo<sup>4</sup>.

Na ausência de lesão tecidual ou após seu reparo e cicatrização, o estado de alerta, de limiar diminuído à dor, e de inflamação, retorna, gradativamente, com o tempo a seu estado inicial menos ativado. O sistema pode retornar a um estado superalerta em condições nas quais o risco de uma nova lesão se torna elevado, como no caso da detecção de novos estímulos nociceptivos intensos, repetidos e, ainda, persistentes<sup>4</sup>.

Tal sensibilização é expressão da plasticidade sináptica que ocorre no SNC deflagrada por estímulos nociceptivos persistentes.

Na cronicidade pode haver um estado persistente de facilitação, potenciação, aumento e/ou amplificação. Lesões e doenças que comprometem o SNC, em especial o somatossensitivo, também podem criar ambientes semelhantes com resultados variados. Ocorre redução de influências inibitórias nos neurônios sensitivos do corno dorsal da substância cinzenta medular e alterações sinápticas e intracelulares que culminam com a produção permanente de sinalização de presença de estímulos dolorosos na via, mesmo na ausência de verdadeira estimulação periférica, isto é, de modo espontâneo.

Neurônios nociceptivos de segunda ordem que possuem comportamento dinâmico e ajustável na dependência de seu nível de sensibilização habilitam sinapses antes silenciosas que transmitem estímulos não dolorosos (alodínea) e também outras que conduzem estímulos originários de outras áreas do corpo fora do território representado pelo segmento medular no qual ele se encontra (dores referidas). Esses neurônios (em inglês: wide dynamic range neuron - WDR) são considerados unidades de convergência e são recrutados durante a sensibilização central, mesmo na manutenção da integridade do sistema nervoso<sup>3,4</sup>.

Em situações neuropáticas, relacionadas com lesões ou doenças, cenários bioquímicos podem criar atalhos que abreviam e reduzem o conjunto de etapas que são observadas na cronicidade.

Situações de hiperatividade neuronal por comprometimento do sistema nervoso somatossensitivo, podem gerar dores neuropáticas e em algumas vezes, de modo concomitante também quadros inflamatórios. A DN resultante é, em grande parte, criada e sustentada pela cascata do processo inflamatório.

#### Panorama geral

Mediadores inflamatórios difusos são liberados tanto por células do sistema imune infiltrativas e residentes, assim como por células glias com função imune, as quais ativam ou sensibilizam os nociceptores, assim levando a uma atividade do sistema

nociceptivo aberrante. Mediadores químicos pró-inflamatórios podem agir sobre células glias vizinhas, ou levar a um aumento da migração das células do sistema imunológico, ocasionando liberação, à distância, de mais mediadores<sup>6</sup>.

As mudanças são detectadas tanto no SNC quanto no SNP, e, a interação com o que os componentes da via transmissão da dor criam as condições para lesões ao sistema nervoso, mimetizando a excitotoxicidade demonstrada em outras situações de agressão. Alterações inflamatórias neurogênicas identificadas na periferia, junto às terminações nociceptoras, em condições de preservação do sistema nervoso, também são observadas no gânglio da raiz dorsal, região dorsal da substância cinzenta espinal e em algumas áreas do cérebro associadas a dor, após lesão nervosa periférica<sup>4</sup>.

O fenômeno doloroso compreende uma longa e crescente lista de mediadores inflamatórios, que inclui a bradicinina, eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), trifosfato de adenosina (ATP), histamina, citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, TNF, interleucina-1β e IFNγ), quimiocinas (citocina quimiotática ligante 2, CCL2; fractalkine), neurotrofinas (fator de crescimento do nervo, NGF, fator neurotrófico cerebral, BDNF) e espécies reativas de oxigênio<sup>6,7</sup>.

Construindo uma tendência de equilíbrio bioquímico muitos mediadores, como endorfinas derivadas de células imunológicas, citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGFB) e alguns fatores neurotróficos (fator neurotrófico glial, GDNF), mostram efeitos opostos aos mediadores algogênicos<sup>8</sup>.

#### Conceituação geral

Mediadores químicos inflamatórios são substâncias liberadas em uma área tecidual lesada ou por células adequadamente ativadas que coordenam o processo da resposta inflamatória. São os maiores determinantes do seguimento da neuroinflamação no sistema nervoso lesionado ou doente, e mostram uma contribuição importante para a DN.

#### DETALHAMENTO DOS PRINCIPAIS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NO FENÔMENO DOLOROSO

##### Bradicininas

A bradicinina é uma molécula nonapeptídea (peptídeo formado por nove aminoácidos) de baixo peso molecular, da família das cininas vasoativas, que possui meia vida plasmática curta e níveis baixos na circulação sanguínea.

A atividade biológica das bradicininas é mediada por duas vias de receptores, nomeadas de receptores B1 (B1R) e B2 (B2R)<sup>7</sup>. A ativação de ambos os receptores pela bradicinina induz inflamação via liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da permeabilidade vascular.

O receptor de bradicinina B2 é constitutivamente expressado pelos tecidos periférico e central, enquanto o receptor B1 é induzido e regulado conforme a evolução dos quadros infecciosos, inflamatório ou traumático. No sistema nervoso, por exemplo, o receptor B2 é encontrado, em situações normais, em vários tipos de células, incluindo neurônios sensitivos e células microglicais, enquanto o receptor B1 é sensibilizado nas células microglicais, astrócitos e neurônios, após a lesão dos tecidos<sup>9</sup>. Estudos de DN em modelos animais mostram que ambos receptores de bradicinina desempenham um papel de hipersensibilização da dor. O B2 isolado contribui para a fase aguda da resposta inflamatória e nociceptiva, enquanto que os dois (B1 e B2) são importantes para o processo de DN central e transição para dor crônica<sup>9,10</sup>.

As bradicininas contribuem para a DN pela sensibilização dos terminais periféricos dos nociceptores e potencializam a transmissão sináptica glutamatergica no medula espinal<sup>11</sup>. Também contribuem para perpetuar a cascata inflamatória das citocinas e quimiocinas, assim como para estimular a liberação de histamina pelos mastócitos<sup>6,7</sup>.

Injeções experimentais intraplantares de agonistas dos receptores B1 ou B2 aumentam a resposta a dor<sup>12</sup>, enquanto que a injeção de antagonistas causam inibição da hiperalgesia nos modelos para DN<sup>13</sup>.

Confirmando o importante papel da bradicinina como mediador inflamatório central na DN é a redução da hiperalgesia secundária a lesão nervosa obtida com a deleção do gene responsável pelos receptores B1 em camundongos<sup>14,15</sup>.

##### Trifosfato de adenosina

O complexo painel dos sistemas purinérgicos e a sua importância em muitos mecanismos fisiopatológicos somente nos últimos anos está emergindo e despertando maior interesse científico. O meio científico resistiu muito tempo até admitir que um metabólito tão comum como o nucleotídeo o ATP pudesse ter ações que extrapolassem sua participação conhecida no metabolismo energético<sup>16</sup>.

Na verdade, o ATP é uma molécula multifuncional envolvida também na transdução de sinal pelas células. O ATP quando liberado no extracelular após destruição celular participa no controle modulatório da atividade neuronal. A mediação da sensibilidade dolorosa pela ativação de receptores de membranas ionotrópicos (P2X, canal iônico) e metabotrópicos (P2X, ligado a proteína G)<sup>17</sup>.

O ATP pode facilitar a transmissão da dor por meio de alguns mecanismos: ativação de receptores nas fibras C causando aumento da excitabilidade axonal no nervo periférico; ativação da via aferente primária no terminal pré-sináptico na medula espinhal; e indução da liberação de mediadores algicos como BDNF e citocinas pró-inflamatórias gliais, para ativar e sensibilizar os nociceptores<sup>6</sup>.

Modelos de DN em que a aplicação de antagonista de receptores A-317491, P2X3 e P2X2/3 ou com tratamento com oligonucleotídeo de sentido inverso de P2X3, provoca redução na expressão de proteína no gânglio da raiz dorsal (GRD) e na medula espinhal que atenua tanto a hiperalgia térmica quanto a alodínea mecânica em ratos com lesão de nervo periférico, indicando ação do receptor P2X3 na DN.

Os receptores P2X4, P2X7 e P2Y12 expressos na microglia aparecem como novo e importante papel na etiologia da DN. A ativação deles pelo ATP está relacionado com a resposta microglial frente à lesão de nervo periférico que contribui para hiperexcitabilidade dos neurônios da substância cinzenta dorsal medular e com os sintomas da DN.

A ativação microglial na medula é um importante processo patológico, ocorre em menos de 4 horas após uma lesão do nervo periférico, e é fortemente correlacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e hiperalgia<sup>6</sup>.

Estudos farmacológicos, genéticos e comportamentais recentes demonstram que os receptores purinérgicos P2X4 são necessários e suficientes para a DN. A expressão dos mesmos está aumentada nas células microgliais da medula após a lesão nervosa e a administração subaracnóideia dessas células previamente estimuladas por ATP em animais induz alodínea, semelhante a causada por lesão no nervo periférico<sup>18,19</sup>.

O mecanismo pela qual a estimulação dos receptores P2X4 da microglia produz DN envolve mudanças eletrofisiológicas fenotípicas nos neurônios da lâmina I no corno dorsal da medula espinhal. A ativação destes receptores promove a liberação de BDNF, que causa desinibição nos neurônios do corno dorsal por interromper a homeostase do íon Cloro intracelular<sup>20</sup>. P2X4 pode, com segurança, ser considerado um importante mediador da sinalização neurônio-microglia e o seu bloqueio reverte a hiperalgia.

A ativação dos receptores P2X7 nas células imunes (mastócitos, macrófagos, linfócitos T e microglia) induz uma rápida ativação e secreção de interleucina 1β (IL-1β)<sup>21</sup>. Ratos tratados com antagonista de P2X7 mostraram redução da hiperexcitabilidade à dor, enquanto a sensibilização dos receptores P2X7 é detectada nos GRD e em nervos periféricos de pacientes com DN<sup>22</sup>. A variação da sequência genética que codifica os receptores P2X7 afeta a formação de poros, promovendo a sensibilidade à dor crônica tanto em ratos quanto em humanos, indicando a possibilidade de nova estratégia para o controle das dores crônicas<sup>23</sup>. Os receptores P2Y12 também ativam a microglia e contribuem para a DN. A ativação destes receptores promove o envolvimento da células microgliais com axônios mielinizados na substância cinzenta medular dorsal<sup>24</sup>. A inibição desses mesmos receptores usando antagonistas do P2X12 ou deleção genética do gene P2ry12, alivia a hiperalgia em modelos animais com DN<sup>25</sup>. O antagonista de receptor P2X12, clopidogrel, é utilizado clinicamente para prevenção de formação de coágulos sanguíneos, que pode acelerar a triagem dos agentes terapêuticos na DN. Assim sendo, o sistema purinérgico é um promissor conjunto de alvos terapêuticos para o controle dos processos nociceptivo e inflamatório na DN.

### Eicosanóides

Os eicosanóides perfazem uma numerosa família de compostos com grande potência e largo espectro de atividade biológica. São produtos de oxigenação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. Um desses ácidos, o araquidônico, constituinte das membranas celulares, é o mais abundante e importante precursor dos eicosanóides.

A clivagem (também conhecida como liberação ou mobilização) do ácido araquidônico das membranas celulares que torna esse ácido graxo de 20 carbonos passível de ser oxigenado. Embora a clivagem possa ocorrer sem a morte celular, é na lesão e degeneração que ocorre a maior disponibilidade para o ácido ser metabolizado; e, destarte, seus metabólitos se constituem em sinalizadores de estímulos lesivos ou potencialmente lesivos<sup>4,6,7</sup>.

A oxigenação do ácido araquidônico é documentada em quatro diferentes vias: a catalisada pelas ciclo-oxigenases (COX), a pela lipoxigenase, a pela epoxigenase, e a via dos isoprostanos.

Depois de clivado da membrana celular pela fosfolipase A<sub>2</sub>, o ácido araquidônico pode ser convertido a prostaglandinas pela via das ciclo-oxigenases (COX) ou a leucotrienos (LT) pela via das lipoxigenases.

### Produtos das enzimas endoperóxido sintases (ciclooxigenases ou COX)

A via das COX consiste na ação de pelo menos duas isoformas enzimáticas: COX-1 e COX-2.

A COX-1 é a forma expressada constitutivamente encontrada na maioria dos tecidos, promovendo a homeostase (embora sua expressão possa ser elevada após um traumatismo celular); enquanto a forma COX-2, cuja expressão em repouso é baixa, a tem rapidamente incrementada pela ação de mediadores inflamatórios (citocinas) após lesão.

As prostaglandinas PGE2 e PGI2 são os principais produtos da via das COX, e, são predominantemente ativados pelos receptores PE (PE1-4 para PGE2 e receptores PI para PGI2)<sup>4</sup>. Estas prostaglandinas ativam fibras aferentes sensitivas e promovem a nocicepção na medula espinhal pela despolarização dos neurônios do tipo WDR e bloqueiam a inibição neuronal feita pela glicina<sup>5,26,27</sup>.

As expressões da COX-2 e da PGE2 aumentam drástica e demoradamente (meses) após lesão nervosa, tanto no local da lesão quanto na medula espinhal.

O uso de inibidores não-seletivos da COX, COX-2 e antagonista PE1 localmente ou por via intratecal, causam alívio da hiperexcitabilidade e dor nos modelos de DN. A observação clínica, reprisada em modelos animais, responsabilizam a infiltração de macrófagos como a principal fonte de COX-2 após uma lesão nervosa, e demonstraram que a expressão de receptores PE1 no macrófago também está incrementada de modo anormal, sugerindo um ciclo inflamatório vicioso<sup>6</sup>.

A prostaglandina do tipo E2 recentemente foi relacionada com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e fatores neurotróficos, BDNF, em lesões nervosas no GRD, além de contribuir para o meio de mediadores algicos<sup>6,27</sup>. Na prática, o uso dos inibidores das COX é ineficaz na DN, apesar da comprovada ação generalizada dessas enzimas e de seus produtos (em especial, as prostaglandinas) no desenvolvimento e manutenção da DN e a eficácia dos inibidores enzimáticos (das COX) no tratamento da dor inflamatória. O aparente paradoxo permanece ainda não esclarecido<sup>6,28</sup>.

### Produtos da lipoxigenases

O metabolismo do ácido araquidônico também é catalisado pelas lipoxigenases (LOX): 5-, 12-, e 15-lipoxigenase produzindo os ácidos hidroperoxieicosatetraenicos (HPETE) que por sua vez são convertidos de modo rápido em derivados hidroxilados (HETE) e em leucotrienos<sup>6</sup>.

O interesse da via das lipoxigenase, também conhecida como via da inflamação alérgica, se deve a procura do aumento da compreensão e da possibilidade de melhora terapêutica da asma, do choque anafilático e da doença cardiovascular.

Os leucotrienos (LT), constituem um grupo de mediadores químicos lipídicos, formados pela inserção de oxigênio em várias posições dentro do ácido araquidônico. A 5-lipoxigenase (5-LOX), enzima presente nas células inflamatórias (leucócitos, polimorfonucleares, basófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos), catalisa a formação de LTA<sub>4</sub>, que junto com seus metabólitos (LTB<sub>4</sub>, Cisteinil LT ou cisLT, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) são os mais largamente estudados<sup>6,29</sup>.

A ativação dessas células inflamatórias induz o aumento do íon livre de cálcio nos respectivos citoplasmas e libera o ácido araquidônico para a oxigenação pela 5-LOX (por sua vez ativada pela sua própria proteína ativadora, a 5-LOX FLAP) que produz uma substância intermediária instável, um tipo de epóxido, o leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Neste ponto o epóxido pode ser convertido no diidroxi leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ou sofrer conjugação com glutadiona. Na conjugação há formação do leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), que sofre na sua porção glutatiônica recém conjugada, a ação de diversas peptidases (uma verdadeira degradação sequencial) formando LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>. Os últimos dois produtos e o C<sub>4</sub> são chamados de cisteinil leucotrienos ou peptidoleucotrienos.

A ação dos LT nos receptores específicos para LT na superfície da muitas células imunológicas e gliais; BLT1 é o receptor com afinidade para o LTB<sub>4</sub>, enquanto o BLT2 é o de menor afinidade para o LTB<sub>4</sub> e outros LT; CisLT 1 e 2 são os receptores seletivos<sup>29</sup>.

O LTB<sub>4</sub> exerce forte quimiotaxia nos neutrófilos que expressam BLT (1 e 2). Injeções intraplantares de LTB<sub>4</sub> produz hiperalgia pela indução da liberação de outros leucotrienos (8R e 15S-diHETE), que sensibilizam nociceptores podendo contribuir para a DN. A inibição da 5-LO confirma os achados comentados no parágrafo anterior e reduz a hiperalgia resultante da liberação de NGF induzido por LTB<sub>4</sub><sup>6,7</sup>.

O antagonista dos cisLT, zaflurcaste, reduz a hiperexcitabilidade e dor em modelos de dor inflamatória<sup>29</sup>.

Nos modelos de DN provocada pela lesão de nervo periférico, são encontradas populações microgliais medulares ativadas. Estudos recentes mostraram que estas células microgliais possuem um aumento na expressão de 5-LO e cisLT1, juntamente com um aumento nos receptores BLT1<sup>30</sup>.

Coroando o conjunto de evidências sobre o papel desses mediadores químicos inflamatórios em situações de DN, a aplicação intratecal de inibidores da 5-LO (antagonistas da BLT1) causa a desativação da microglia. Quando adicionados os inibidores da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK), conseguem reverter a hipersensibilidade mecânica<sup>30</sup>.

Os agentes desenvolvidos para bloquear a síntese (zileuton) e a sinalização (montelukaste, zafirlucaste e pranlukaste) dos leucotrienos mostram, na clínica, sucesso terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias, como a asma, sua eficácia para o tratamento da DN ainda continua sem comprovação científica.

### Histamina

A histamina é uma amina endógena biogênica, que medeia efeitos pleiotróficos por meio de quatro subtipos distintos de receptores ligados à proteína G, designados de H1 a H4, que são expressados de diversas maneiras em cada tipo de célula. Nos seres humanos a histamina atua como importante mediador das reações alérgicas imediatas e inflamatórias, apesar de desempenhar um papel modesto na anafilaxia. Exercendo efeitos fisiológicos e patológicos complexos, causando efeitos amplos, em parte deles indesejáveis, a histamina nunca foi adotada como fármaco para tratamento de doenças, dando lugar para agonistas ou antagonistas seletivos de certos subtipos de seus receptores.

A fonte clássica de histamina são os mastócitos, nos quais ela é estocada nos grânulos citosólicos e liberados por exocitose para exercer diversas ações em resposta a variados estímulos. A histamina não proveniente dos mastócitos deriva de múltiplas fontes tais como leucócitos circulantes (especialmente os eosinófilos, embora com concentrações 10 vezes menores) e neurônios. As células gástricas que produzem histamina são chamadas de histaminócitos e no SNC de neurônios histaminérgicos. Acredita-se que a degranulação dos mastócitos no sistema nervoso é desencadeada por lesão tecidual ou pela elevação de adenosina ou bradicinina em resposta a lesão mecânica<sup>6,7</sup>.

Os processos imunológicos representam o mecanismo mais importante de liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos. Essas células, quando sensibilizadas por anticorpos IgE fixados em sua superfície, respondem a antígenos com liberação de histamina e/ou outros mediadores (por citólise ou exocitose).

A histamina, uma vez liberada, tem a capacidade de sensibilizar nociceptores, resultando em hiperálgia. O tratamento com estabilizador de mastócitos, o cromoglicato, previne o desenvolvimento de hiperálgia, um efeito em parte secundário à menor liberação de histamina<sup>31</sup>. O tratamento local do nervo lesado com antagonistas de receptores H1 e H2 alivia a hiperálgia. A leve analgesia dos anti-histaminérgicos é demonstrada clinicamente na dismenorréia, trigeminalgia, síndrome da dor talâmica e na dor oncológica, apesar de ser geralmente associado a opioides<sup>8</sup>.

Uma nova geração de anti-histaminérgicos, agindo em receptores H3 e H4, são atualmente testados em DN, produzindo resultados conflitantes. A ativação periférica e espinhal de receptores H3 inibe a nocicepção induzida por formalina<sup>32</sup>. A administração sistêmica de antagonistas de receptores H3 reduz a sensibilidade mecânica em modelos experimentais de DN<sup>33</sup>. Apesar do pouco conhecimento sobre o mecanismo de antinocicepção do anti-H3, já os estão experimentando na clínica. Os efeitos sobre o bloqueio de receptores H4 em modelos de DN também ainda não estão claros. Um estudo demonstrou que o tratamento com agonistas de H4 bloqueiam a hipersensibilidade mecânica<sup>8</sup>, enquanto outros mostraram que o uso sistêmico de antagonistas H4 tem um efeito dose-dependente e reversível de hipersensibilidade mecânica<sup>33</sup>.

O efeito da histamina é claramente demonstrado sobre a DN, no entanto, há necessidade de número maior de estudos antes de se considerar o uso de agonistas/antagonistas seletivos de histamina no tratamento da DN<sup>6</sup>.

### Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos representam a família de proteínas de importância central no funcionamento, diferenciação e sobrevivência do sistema nervoso, bem como sinaptogênese e plasticidade sináptica.

O fator de crescimento neuronal é membro da superfamília de neurotrofinas (NT), que inclui BDNF, NT-3 e NT-4/5.

O fator de crescimento nervoso (do inglês: nerve growth factor, NGF) é uma das neurotrofinas mais estudadas, regula a sobrevivência, o desenvolvimento e o trofismo de populações específicas de neurônios, e é reconhecida como um dos mediadores mais importantes da dor. A elevação dos níveis de NGF ocorre após a lesão de nervos em modelos animais<sup>34</sup> e em diversas situações críticas envolvendo

dor, como artrite e cefaleia crônica.

A liberação de fator de crescimento nervoso promove o processo de sensibilização periférica de diferentes maneiras, tais como pela modulação da expressão de outros mediadores inflamatórios, receptores e ionóforos.

Sua administração em modelos animais controle e pessoas previamente saudáveis provoca rápida hiperálgia<sup>35</sup>. Em modelos experimentais com lesão nervosa a administração de anti-NGF neutraliza anticorpos com completa reversão da hipersensibilidade e hiperálgia<sup>36</sup>.

Anticorpos monoclonais, tendo como alvo o NGF, foram envolvidos em diversos estudos. Um exemplo é o tanezumab, um anticorpo monoclonal, anti-NGF, testado para diversos tipos de dor, incluindo osteoartrite de joelho e lombalgia crônica. Os resultados quanto ao controle da dor são promissores, com maior efetividade do que anti-inflamatórios não esteroides, no entanto, muitos pacientes apresentaram efeitos adversos como alteração na sensibilidade periférica além de piora progressiva da osteoartrite com necrose óssea<sup>37</sup>. O NGF possui grande efeito no reparo tecidual, na angiogênese e na proliferação celular, daí as dúvidas quanto ao benefício de terapias anti-NGF no controle da dor crônica<sup>38</sup>. Por outro lado, no momento, com a vasta gama de anti-NGF em teste, torna-se prematuro concluir algo sobre sua aplicação no tratamento da dor crônica que sempre incorpora mecanismos neuropáticos.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: brain-derived neurotrophic factor – BDNF) é considerado uma neurotrofina pró-nociceptiva desde a demonstração de sua capacidade de sinalizar para a microglia e neurônios na medula espinhal, mediando dor aberrante.

A lesão de nervos periféricos provoca ativação de receptores P2X4 da microglia espinhal. A produção de trifosfato de adenosina (ATP) causada pela ativação desses receptores leva ao influxo celular de íons de cálcio livre, o que, por sua vez causa fosforilação secundária e ativação de determinada enzima de 38kDa (do inglês: mitogen-activated protein kinase de 38kDa - p38MAPK), que subsequentemente leva ao aumento de exocitose de BDNF dependente da elevação e sensibilização dos receptores solúveis das proteínas específicas de ancoragem e fusão vesicular (do inglês: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor - SNARE).

A liberação de BDNF pelas células microgliais ativadas, causa a desinibição dos neurônios nociceptivos de segunda ordem presentes na lâmina I de Rexed da substância cinzenta da medula espinhal ao romper a homeostasia do cloro intracelular. A modificação induzida pela liberação do BDNF transforma a função dos neurônios locais, antes predominantemente inibitória (ou gabaérgica), e, um terço dos neurônios passa a ter ação excitatória<sup>39</sup>.

Duas vias de liberação do BDNF na DN foram descritas recentemente. A primeira é dependente de triptase (enzima proteolítica) derivada de mastócitos, que ativa receptores PAR2 (do inglês: protease activated receptor tipo 2) e promove a expressão de P2X nas células microgliais, sobre a qual a exposição do ATP significativamente aumenta a síntese e atividade do BDNF<sup>6</sup>.

Há cerca de uma década e meia, os inibidores de PAR2 foram considerados os novos analgésicos do Século XXI, mas, esses receptores encontrados na superfície dos receptores nociceptivos periféricos, são os mais potentes indutores da liberação periférica de substâncias algogênicas (mediadores químicos pró-inflamatórios) responsáveis pela inflamação neurogênica.

Na porção posterior da substância cinzenta medular o cenário bioquímico se repete e são encontradas as mesmas substâncias ou mediadores, acrescidos dos aminoácidos excitatórios. No entanto, a pesquisa daqueles então promissores analgésicos não progrediu pelos efeitos adversos causados pelos mesmos receptores localizados em outros locais<sup>40</sup>. Na segunda via, o BDNF é liberado no gânglio trigeminal por via TNF de maneira atividade-dependente<sup>6,41</sup>.

Os resultados encontrados elucidam as diversas formas que o BDNF pode ser inibido, mas estratégias ainda devem ser investigadas para controle da DN.

O GDNF produzido pelos astrócitos e células da glia tem ação antinociceptiva no SNC, a despeito da ação pró-nociceptiva no sistema periférico<sup>6</sup>. O tratamento subaracnóideo com GDNF reverte a DN por meio do aumento da expressão da somatostatina, um neuropeptídeo com propriedade analgésica<sup>42</sup>.

Outro mecanismo de potencial antinociceptivo do GDNF subaracnóideo é por meio do decréscimo da ativação dos astrócitos no corno posterior da medula depois da lesão nervosa<sup>43</sup>, porém estudos clínicos com o uso de GDNF recombinante em portadores da doença de Parkinson foram suspensos devido aos efeitos adversos.

### Citocinas e quimiocinas

Citocinas são pequenas proteínas regulatórias produzidas por uma grande variedade de células incluindo leucócitos, sobre condições fisiológicas e patológicas.

Elas modulam a interação célula a célula além de regular as respostas inflamatórias e imunes locais.

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, com capacidade de quimiotaxia, que orientam a migração de leucócitos para o local da lesão. Quimiocinas, outras citocinas e seus receptores são amplamente expressados no SNC e há uma crescente evidência de suas ações na DN.

Em modelos de DN há muitas citocinas inflamatórias envolvidas, tais como IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 e INF- $\gamma$ , enquanto citocinas de ação anti-inflamatória, tais como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  têm ação analgésica.

A homeostase imune é normalmente mantida pela liberação endógena de citocinas anti-inflamatórias, particularmente a IL-10, que faz retroalimentação negativa ao suprimir genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e seus receptores. Entretanto se o sistema nervoso central sofre lesão há a liberação de IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6 e há retroalimentação positiva para ativação das cascatas inflamatórias.

Muitas citocinas pró-inflamatórias contribuem indiretamente para a dor devida a sua habilidade de potencializar a produção de mediadores algioênicos como a PGE-2<sup>44</sup>.

A interação se estreita quando estuda-se o efeito no estado da afinidade dos atracadouros externos das moléculas de adesão dos elementos figurados do sangue<sup>45</sup>. Há forte evidência sobre a ação direta de algumas citocinas em receptores presentes nos nociceptores.

Citocinas, incluindo as quimiocinas liberadas após lesão nervosa podem modular a permeabilidade da barreira hematoencefálica espinal por meio do aumento da circulação de IL-1 $\beta$  e CCL2<sup>46</sup>. A infiltração espinal de células imunes está aumente relacionada a liberação de citocinas.

O balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias após a lesão no sistema nervoso é essencial tanto para a sua própria recuperação e o desenvolvimento de DN. Pacientes com síndrome da dor complexa regional, neuropatia dolorosa e lesão raquimedular têm aumento sistêmico de liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 além de decréscimo nos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4, enquanto aqueles com neuropatia indolor têm elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias<sup>46</sup>.

A modulação das citocinas ao bloquear citocinas pró-inflamatórias e/ou aumentando citocinas anti-inflamatórias são eficazes no controle da dor e trazem a tona a discussão sobre os efeitos das citocinas na DN.

## CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

### Fator de necrose tumoral

O fator de necrose tumoral (FNT), provavelmente é a citocina pró-inflamatória mais estudada e atua por meio de dois receptores: o constantemente expresso TNFR1 e o induzível TNFR2.

O FNT inicia várias vias de sinalização: ativam o fator nuclear (FN-KB, que induz a transcrição de genes codificados de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente desencadeando uma cascata inflamatória<sup>47</sup>.

Muitos estudos em animais corroboram com o papel dos FNT nas dores neuropáticas, no entanto, as ações dos receptores TNFR1 e TNFR2 continuam necessitando elucidação. Estudos comportamentais, farmacológicos e eletrofisiológicos confirmam a significativa contribuição do FNT na sensibilização do SNP e SNC. Quando FNT é aplicado em um nervo ciático saudável e no GRD (gânglio da raiz dorsal) ocorre disparos ectópicos de A $\delta$ , A $\beta$  e fibras C assim como baixando o limiar mecânico necessário para ativar a fibra C<sup>8</sup>. Após lesão no sistema nervoso, FNT endógenos são lançados por células de mastócitos e de Schwann, que é seguida por uma segunda onda de FNT lançados por infiltrados neutrofílicos e de macrófagos<sup>8</sup>, com a elevação dos FNT correlaciona-se a dor e hipersensibilidade. O FNT aumenta a permeabilidade vascular na pele glabra aumentando a infiltração de leucócitos e consequentemente a resposta inflamatória. Esses efeitos apoiam a teoria que sugere que os FNT são sensibilizadores periféricos. Lesões nervosas também desencadeiam aumento do FNT na parte dorsal da medula espinal, que eleva a expressão dos canais de sódio NAV 1.3 e NAV 1.8<sup>53</sup>, assim como aumenta a corrente excitatória pós-sináptica por meio dos receptores AMPA e NMDA<sup>49</sup>, ambos suscetíveis a sensibilização central.

A interferência na sinalização dos FNT, utilizando anticorpos neutralizantes ou antagonistas de seus receptores, pode atenuar a DN<sup>8</sup>. Na última década, o tratamento com anti-FNT (infliximab, etanercept) transformou o positivamente o tratamento de doenças inflamatórias graves, como a artrite reumatóide, as doenças inflamatórias intestinais e a psoríase. Esses fármacos mostram efetividade em reverter hiperalgesia em modelos de ratos com dores e em ratos com dores neuropáticas por lesão nervosa<sup>52</sup>.

### Interleucina-1 $\beta$

Interleucina-1 $\beta$  é a segunda citocina pró-inflamatória mais importante, que quando aplicada em nervos saudáveis, gânglio das raízes dorsais e na coluna dorsal da medula reduzem o limiar de ativação e promovem disparos espontâneos do potencial de ação, assim causando dor e hipersensibilidade<sup>6,8</sup>. Na proximidade de uma lesão nervosa periférica, a IL-1 $\beta$  é rapidamente liberada pelas células de Schwann assim como pelos macrófagos locais e os infiltrados.

Na medula espinal, a lesão nervosa ativa as células microgliais e as astrocíticas, e essa ativação resulta em aumento de 15 vezes nos níveis de IL-1 $\beta$ , um efeito completamente revertido com um inibidor glial, a propentofina, que também normaliza a dor e hipersensibilidade<sup>53</sup>.

O mecanismo de incremento de dor das IL-1 $\beta$  inclui: o reforço das correntes de sódio voltagem-dependente nos receptores dolorosos pela "via p38"; o aumento das correntes de excitação por meio a fosforilação dos receptores NMDA e AMPA; e redução espontânea de GABA e glicina inibidora de corrente na medula espinal<sup>49</sup>.

Há efetividade analgésica no bloqueio dos receptores de IL-1 ou interferindo com a sinalização da IL-1 $\beta$  via anticorpos neutralizantes em modelos de DN<sup>8</sup>.

O uso de antagonista de IL-1, anakinra, foi clinicamente aprovada para artrite reumatóide e pode trazer benefícios também para pacientes com DN.

Um estudo recente<sup>54</sup> destacou o potencial da IL-1 $\beta$  na regeneração nervosa, uma vez que foi demonstrado evidente prejuízo que o uso da IL-1 $\beta$  em ratos causa na recuperação da função do nervo lesado. A possibilidade terapêutica advém do provável benefício de bloquear essa interleucina.

### Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6, em geral, tem atividade pró-inflamatória, porém em certas circunstâncias pode ser moduladora e provocar resposta anti-inflamatória. Com a lesão de nervo periférico, a IL-6 é liberada por células de Schwann e macrófagos, assim como por neurônios e células da glia no GRD e medula espinal. O aparecimento das IL-6 ocorre, predominantemente, na cascata com o FNT e a IL-1 $\beta$ , no entanto quem vem primeiro ainda é um debate.

O papel da IL-6 na modulação da dor nociceptiva aguda é contraditória, sua aplicação periférica em animais causa efeitos algícos e antálgicos<sup>8</sup>. No laboratório, em modelos de DN fica óbvia a capacidade da IL-6 em promover a dor quando ratos com a deleção genética dessa interleucina recebem tratamento com anticorpo neutralizante da mesma e é obtida redução da dor induzida pela lesão nervosa.

Após uma lesão nervosa, a IL-6 aumenta a respostas algícas dos mediadores como a BDNF e substância P, que promovem excitação neuronal.

Todos os receptores de citocinas compartilham um mesmo projeto arquitetônico que compreende um grande domínio extracelular exposto para a conexão com o ligante específico (a citocina), e, unido por uma única hélice transmembrana, um domínio intracelular. No caso da interleucina-6 a resposta induzida pela sua ligação no domínio externo se inicia com a dimerização do receptor que atrai uma unidade de tirosina quinase citosólica (Jak) para se associar e então fosforilar o dímero do receptor. O alvo para fosforilação no domínio interno do receptor de IL-6 é uma proteína específica da família de fatores de transcrição (Stats). A Stat específica se liga ao grupamento fosfotirosina no complexo receptor-Jak, sendo ela própria fosforilada. A Stat já fosforilada migra em direção ao núcleo celular e ativa a expressão gênica e promove lesão nervosa induzida por ativação da microglia na região dorsal da medula espinal.

A possibilidade terapêutica analgésica surge do bloqueio desta via com uma esperada redução do difusão da neuroinflamação na medula espinal e atenuação da dor e hipersensibilidade<sup>57</sup>.

Em humanos saudáveis, os níveis de IL-6 são muito baixos, mas podem aumentar durante condições inflamatórias dolorosas. Anticorpos contra IL-6r (tocilizumab) foi aprovado para AR, e um estudo recente tem demonstrado a efetividade do tocilizumab para tratamento de dor radicular e dores de coluna baixa causada por estenose espinal<sup>58</sup>. Mais estudos clínicos são necessários para avaliar os efeitos diretos da inibição da IL-6 na DN.

### Outras citocinas inflamatórias

Outra citocina pleiotrópica, IFN- $\gamma$ , foi associada a dores crônica a partir de que sua aplicação. A IFN- $\gamma$  pode causar sensibilização de neurônios e causar disparos espontâneos, assim como reduzir o tônus inibitório. IFN- $\gamma$  também está associada a ativação das células microgliais, desta forma a ablação da sinalização do IFN- $\gamma$  previne a ativação microglial assim como o desenvolvimento de dor e hipersensibilidade após lesão nervosa.

A sinalização dos IFN- $\gamma$  com microglia provoca superestimulação de muitas proteínas, tais como os receptores purinérgicos P2x4 e o receptor de quinase

CCR2<sup>59,60</sup> que contribuem para o aparecimento da DN.

Propriedades analgésicas de agonistas dos receptores de canabinóides (CBR2) são associadas a inibição reversível das células microgliais em ativar os sinalizadores de IFN- $\gamma$ <sup>60</sup>. No geral, as IFN- $\gamma$  estão envolvidas na patogênese da DN, principalmente por meio do efeito central em neurônios e microglia.

As IL-15 são expressas em neurônios lesados e em infiltrados de macrófagos em nervos lesionados, assim como em reciprocidade nos macrófagos e células microgliais reativas na medula espinhal. Estes estão envolvidos no desenvolvimento da DN por meio da promoção de macrófagos e células T no lado das lesões nervosas e na medula espinhal<sup>61</sup>.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida predominantemente por células Th17, mas também por neutrófilos, células T citotóxicas e células gliais e tem papel importante nas desordens inflamatórias do sistema nervoso como a esclerose múltipla<sup>7,8</sup>.

A administração de IL-17 em ratos de laboratório induziu comportamento de dor<sup>63</sup>. Após lesão nervosa, a IL-17 aumenta a degeneração nervosa com pico por volta do sétimo dia e são encontradas nas células T do nervo lesado<sup>62</sup>.

A dor e a hipersensibilidade são reduzidos em ratos que tem deficiência de Rag (família de enzimas de endonucleases de restrição que clivam DNA reconhecendo o local pela identificação de sequências de pares das bases) do tipo 1 nas células T, com falha na expressão da IL-17 e da IL-17 em ratos<sup>63,64</sup>. Este efeito reduz juntamente as células T e o infiltrado de macrófagos no nervo ciático e diminuindo a atividade glial da medula espinhal<sup>63</sup>. Desta forma é crescente as evidências de que as IL-17 estão envolvidas na manutenção da DN.

A IL-18 é um membro da família das citocinas IL-1, que são expressas em inflamações crônicas e são ativadas por meio de receptores de IL-18 (IL-18r). Estes são expressos por pico de astrócitos após 7 dias da lesão nervosa. Contudo, anticorpos neutralizantes contra a IL-18 e IL-18R reduzem, apenas, parcialmente a dor e a hipersensibilidade, apesar da redução do número de astrócitos reativos<sup>64</sup>. Um estudo mais recente demonstrou que ervas utilizadas na medicina japonesa (Bushi), diminuíram a fase de manutenção da DN por meio da supressão de IL-18 e IL-1 $\beta$  evocada ERK1/2-fosforilação em astrócitos, desta forma reduzindo a ativação deles<sup>61</sup>. No momento, ainda é cedo para afirmar que o bloqueio do IL-18 é uma boa estratégia terapêutica para o alívio das dores neuropáticas, e mais estudos são necessários.

## CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS

### Interleucina-10

Interleucina-10, liberadas pelas células T ativadas, células B, macrófagos e mastócitos, é uma poderosa citocina anti-inflamatória, inibindo a liberação de citocinas, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF<sup>6,8</sup>.

Se for comparado o fluxo catabólico com o de um rio, as substâncias a serem degradadas estariam na localização da nascente enquanto seus metabólitos finais estariam na sua foz. Nesse contexto, o mecanismo da supressão da IL-10, a jusante do seu receptor, ocorre por meio da indução de SOCS3m, que por sua vez inibe genes normalmente ativados pela via JAK-STAT3, assim como, pela inibição da via NF- $\kappa$ B<sup>6,8</sup>.

Após a lesão do nervo, a expressão da IL-10 aumenta rapidamente (1 hora) na área da lesão, e até 24 horas no DRG. IL-10 subaracnóide e interneural podem significativamente atenuar a hipersensibilidade da dor induzida pela lesão do nervo, associado com a redução da infiltração por células imunológicas e diminuir a expressão da IL-1 $\beta$  e adenosina<sup>8</sup>.

Tanto agonista reverso do receptor de adenosina 2A e CBR2 estabilizam a via de hipersensibilidade da dor induzida pela liberação da IL-10<sup>66,67</sup>.

A IL-10 possui efeitos analgésicos decorrentes de sua capacidade de inibir as citocinas pró-inflamatórias.

### Interleucina-4 (IL-4)

A interleucina 4, uma citocina anti-inflamatória prototípica, é liberada pelos mastócitos ativados e algumas populações de células T. Ela consegue inibir a maioria das citocinas inflamatórias e pode suprimir a ativação de macrófagos e das células microgliais.

O tratamento prévio dos nervos com IL-4 pode desensibilizá-los para as respostas aos estímulos dolorosos provocadas pelas substâncias sabidamente algogênicas (mediadores pró-inflamatórios), como as bradicininas e TNF<sup>8</sup>.

A IL-4 em ratos com deleção genética (-/-) sem lesões nervosas provoca aumento da sensibilidade à estimulação mecânica, e, surpreendentemente, essa interleucina em ratos selvagens (com genética íntegra) as lesões nervosas seguem não exibindo aumento da hipersensibilidade a dor comparado com tipos selvagem<sup>68</sup>.

Essa discrepância parece ocorrer porque a IL-4 nos ratos que tiveram uma super compensação da expressão de outras citocinas anti-inflamatórias, como as IL-10 e IL-13.

Tanto as fases de estabilização quanto de manutenção da lesão do nervo induziram a hipersensibilidade a dor onde foi reduzida pela terapia de genes IL-4, a qual é associada com a diminuição da liberação espinhal de IL-1 $\beta$  e PGE2, assim como a redução no fosforilado p38 MAPK, indicativo de redução do número de células microgliais ativadas<sup>69</sup>. Alguns efeitos analgésicos da IL-4 ocorrem também pela via de regulação positiva dos receptores opióides  $\mu$  e  $\delta$ <sup>6,8</sup>.

### Fator de crescimento tumoral-beta (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  tem uma ampla variedade de funções imunológicas, embora ela seja considerada um imunossupressor. TGF- $\beta$  inibe profundamente a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas, influencia na diferenciação de células T e promove a geração de células T reguladoras da imunossupressão.

Depois da lesão nervosa periférica, a aplicação de TGF- $\beta$  pela via subaracnóide atenua significativamente tanto o desenvolvimento e como a manutenção/estabilização da dor<sup>69</sup>. O fator também promove nessas mesmas condições a diminuição da ativação das células microgliais e astrócitos, assim como a redução da expressão da quimiocina CCL2.

O TGF- $\beta$  e a IL-10 podem aumentar a integridade da barreira hematoencefálica (do inglês: blood-spinal cord barrier – BSCB), assim reduzindo a infiltração adicional das células imunológicas no corno dorsal.

A proteína morfogenética óssea, e a proteína inibidora ligada a membrana chamada *activina* (do inglês: bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor – ambas conhecidas pela sigla BAMBI) são inibidoras naturais da família de fatores de crescimento tumoral. Animais com deleção genética das BAMBI apresentam níveis aumentados de TGF- $\beta$  ativados e redução da dor aguda, assim como da DN induzida por lesão nervosa<sup>71</sup>. O efeito antinociceptivo do TGF- $\beta$  pode envolver também o sistema opioide uma vez que as proteínas precursoras de peptídeos opióides endógenos também mostraram incremento nas medulas dos mesmos camundongos com deleção dos genes responsáveis pelas BAMBI<sup>71</sup>. A TGF- $\beta$  parece ativar a supressão glial, inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promover a expressão da analgesia de opióides endógenos.

A modulação dessas citocinas anti-inflamatórias merecem uma investigação como potencial terapêutico nas dores neuropáticas<sup>6</sup> e nas dores crônicas em geral.

### Quimiocinas

As quimiocinas são conhecidas como citocinas chamadas de quimio-atrativas (ou quimio-atraentes), que controlam a migração de leucócitos, funcionando como coordenadores de tráfego celular durante reações imunológicas e inflamatórias. As quimiocinas e seus receptores são importantes nas doenças inflamatórias que acometem o sistema nervoso mediando a migração dos leucócitos dentro das áreas nervosas de inflamação.

Na verdade, existe pequeno conflito na nomenclatura e na classificação adotadas e já consagradas pelo costume, uma vez que alguns mediadores que não são citocinas também controlam o movimento dos leucócitos, e, muitas citocinas verdadeiras não se restringem a essa função.

Acima de quatro dezenas de quimiocinas foram identificadas, e a classificação delas pode ser simplificada em dois grupos levando em consideração se os resíduos de cisteína principais da cadeia polipeptídica são adjacentes (quimiocinas C-C) ou separados por outro resíduo (C-X-C). As do primeiro grupo são implicadas em quadros crônicos e as do segundo grupo em agudos.

Os principais tipos de células do sistema nervoso, como neurônios, glia e células progenitoras neurais, expressam várias quimiocinas e seus receptores.

Evidências acumuladas sobre a quimiocinas mostram envolvimento da migração neural e proliferação celular durante o desenvolvimento cerebral, modulação da transmissão sináptica, doenças neurodegenerativas e dor<sup>8</sup>.

Quando estudada no cenário de DN, a produção de quimiocinas leva a uma maior sensibilidade à dor tanto indiretamente pela atração de leucócitos, como diretamente pela excitação de neurônios nociceptivos.

Quimiocinas e seus respectivos receptores foram implicados na DN. As duplas (ligante + receptor) consideradas principais são as duas comentadas a seguir.

### CCL2 (MCP-1)/CCR2

A expressão da citocina CCL2 e seu respectivo receptor (CCR2), nos neurônios e células gliais na GRD já esta bem documentada<sup>8,72</sup>. Utilizando modelo de DN de compressão crônica do GRD foi demonstrado aumento da expressão do CCR2 e CCL2 tanto nos neurônios lesados como nos saudáveis (sem compressão). A aplicação de CCL2 nos neurônios sensitivos lesados *in vitro* produz

efeitos excitatórios potentes<sup>73</sup>. Após a lesão do nervo ciático achados similares de aumento da expressão de CCL2 em neurônios do GRD e dentro do endoneuro são evidentes<sup>74</sup>.

No entanto, a expressão de CCL2/CCR2 na medula espinal é controversa, diversas linhas de evidências demonstram que CCR2 é de ocorrência constitutiva nos neurônios da medula espinal e se tornam hiperativos depois de uma lesão nervosa<sup>75</sup>.

A sinalização de CCL2 /CCR2 na medula espinal é um ponto crítico para ativação da glia espinal, e existe a possibilidade dessa quimiocina produzida no GRD ser transportada para as terminações proximais desses neurônios pseudo-unipolares na região dorsal da substância cinzenta. A administração intratecal de anticorpos neutralizantes de CCL2 em animais com lesão nervosa evidenciou redução da ativação da micrógliia e inibição do comportamento de dor<sup>76</sup>.

Corroborando com estes achados, ratos sem os CCR2 apresentaram pouca DN após lesão nervosa, resultado de diminuição de infiltração de macrófagos, de ativação de células da glia espinal e uma diminuição da sensibilização neuronal<sup>77</sup>. Ativação dos CCR2 nos neurônios do GRD e a liberação de CCL2 no sistema nervoso da medula espinal contribuem para o aumento da excitação dos neurônios nociceptivos e promoção da DN. Antagonistas de CCR2 poderão ter valor terapêutico<sup>6,78,79</sup>.

### CX3CL1 (fractalcina)/CX3CR1

Fractalcina é uma citocina expressa na superfície externa das células dos neurônios espinais e dos aferentes sensoriais da medula<sup>80</sup>. Na parte dorsal da medula, os receptores de fractalcina são primariamente expressos por micrógliia e estão super-funcionantes após lesão nervosa<sup>81</sup>.

O padrão de expressão do CX3CL1/CX3CR1 sugere o envolvimento deles na sinalização neuronal e micrógliia na medula espinal.

A ligação de CX3CL1 com CX3CR1 ativa a P38 MAPK induzindo a ativação microglial e a síntese de citocinas pró-inflamatórias tais como FNT, IL-1b e IL-6<sup>75</sup>. Isto, por sua vez, contribui com a plasticidade das sinapses e a hiperativação neuronal medular.

Estudos comportamentais demonstram que fractalcina subaracnóidea produz dor e hipersensibilidade dose dependente, enquanto injeção de anticorpos neutralizantes CX3CR1 retarda e reduz a resposta nociceptiva em modelos de DN<sup>82</sup>. O bloqueio do CX3CR1 de ratos reduz a dor e hipersensibilidade com redução da ativação glial espinal depois de uma lesão nervosa periférica<sup>83</sup>. As evidências sugerem que liberação de fractalcina (CX3CL1) pelos neurônios, em resposta a uma lesão ou a um mediador inflamatório, induz a ativação da glia e a facilitação da dor.

### CONCLUSÃO

Há uma crescente produção de evidências obtidas em estudos pré-clínicos demonstrando que mediadores inflamatórios desempenham papéis fundamentais na patogênese da DN.

No SNP, mediadores inflamatórios estão hiperregulados pelas células residentes e pelos leucócitos infiltrados após lesão do nervo periférico, induzindo sensibilização periférica. No SNC, na medula espinal, mediadores inflamatórios contribuem amplamente para ativação das células gliais depois de uma lesão nervosa, provocando sensibilização central.

A modulação e o direcionamento intencional destes mediadores, inibindo a pró-inflamação e aumentando mediadores anti-inflamatórios, podem ser considerados estratégias terapêuticas importantes no tratamento da DN. No entanto, também a produção científica recente alerta para a dificuldade que existe na translação dos resultados obtidos nesse campo de pesquisa em animais para a aplicação em humanos.

### REFERÊNCIAS

- Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*. 2016;81-90.
- Oliveira Jr JO. Aspectos referentes à fisiopatologia comparada entre dor neuropática e espasticidade. *Rev Dor*. 2000;2(1):30.
- Dawes JM, Anderson DA, Bennett DL, Bevan S, McMahon SB. Inflammatory mediators and modulators of pain. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 2013;6:48-67.
- Oliveira Jr JO. A cronificação da dor. O papel dos analgésicos anti-inflamatórios como os inibidores da ciclo-oxigenase do tipo 2 e dos anticonvulsivantes como os gabapentinóides na transição da dor aguda para crônica. *Revisão clínica. Discutindo a dor*. 2014;71-7.
- Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):414-21.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G. Pathophysiology of neuropathic pain: inflammatory mediators. In Toth C, Moulin DE, (editors). *Neuropathic Pain*. Cambridge University Press: New York;

- 2013;(7):77-89p.
- Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*. 2006;51(2):240-64.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*. 2010;229(1-2):26-50.
- Talbot S, Théberge-Turmel P, Liazoghli D, Sénécal J, Gaudreau P, Couture R. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent (Nalpa-Bodipy)-des-Arg-1-bradykinin. *J Neuroinflammation*. 2009;6:11.
- Rashid MH, Inoue M, Matsumoto M, Ueda H. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(3):1158-64.
- Wang H, Kohno T, Amaya F, Brenner GJ, Ito N, Allchorne A, et al. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*. 2005;25(35):7986-92.
- Wener MF, Kassuya CA, Ferreira J, Zampronio AR, Calixto JB, Rae GA. Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology*. 2007;53(1):48-57.
- Luiz AP, Schroeder SD, Chichorro JG, Calixto JB, Zampronio AR, Rae GA. Kinin B(1) and B(2) receptors contribute to orofacial heat hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction injury in mice and rats. *Neuropeptides*. 2010;44(2):87-92.
- Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araújo RC, Bader M, Pesquero JB, et al. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *J Neurosci*. 2005;25(9):2405-12.
- Moalem G, Grafe P, Tracey DJ. Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience*. 2005;134(4):1399-411.
- Keppel Hesselink JM. The terms 'autacoid', 'hormone' and 'chalone' and how they have shifted with time. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2016; [Epub ahead of print].
- Gu JG, MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*. 1997;389(6652):749-53.
- Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, et al. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- $\alpha$  release from rat microglia. *J Neurochem*. 2000;75(3):965-72.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778-83.
- Trang T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Eur J Neurosci*. 2012;24(2):354-61.
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic M, Chong C, Wade C, Chandran P, et al. The antihyperalgesic activity of a selective P2X7 receptor antagonist, A-839977, is lost in IL-1 $\alpha$  knock-out mice. *Behav Brain Res*. 2009;204(1):77-81.
- Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, et al. Disruption of the P2X7 purinergic gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2005;114(3):386-96.
- Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, Ritchie J, et al. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med*. 2012;18(4):595-9.
- Maeda M, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Kiyama H. Nerve injury-activated microglia engulf myelinated axons in a P2Y12 signaling-dependent manner in the dorsal horn. *Glia*. 2010;58(15):1838-46.
- Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K. P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2008;28(19):4949-56.
- Ma W, Chabot JG, Vercauteren F, Quiron R. Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiol Aging*. 2010;31(7):1227-37.
- Naidu RK, Pham TM. Pain Management. In *Basic Clinical Anesthesia*. New York: Springer; 2015. 265-96p.
- Namaka M, Gramlich CR, Ruhlen D, Melanson M, Sutton J, Major J. A treatment algorithm for neuropathic pain. *Clin Ther*. 2004;26(7):951-79.
- Jain NK, Kulkarni SK, Singh A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. *Eur J Pharmacol*. 2001;423(1):85-92.
- Okubo M, Yamada H, Kobayashi K, Noguchi K. Leukotriene synthases and the receptors induced by peripheral nerve injury in the spinal cord contribute to the generation of neuropathic pain. *Glia*. 2010;58(5):599-610.
- Zuo Y, Perkins NM, Tracey DJ, Geczy CL. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*. 2003;105(3):467-79.
- Cannon KE, Leurs R, Houng LB. Activation of peripheral and spinal histamine H3 receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;88(1):122-9.
- Sanna MD, Stark H, Lucarini L, Ghelardini C, Masini E, Galeotti N. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK, and P38 MAPK phosphorylation. *Pain*. 2015;156(12):2492-504.
- Ossipov MH. Growth factors and neuropathic pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2011;15(3):185-92.
- Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Clauwudry V, Flexner C, Wachsman M, et al. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol*. 1994;36(2):244-6.
- Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, et al. Antibodies to nerve growth factor reserve established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(1):282-7.
- Katz N, Borenstein DG, Birbara C, Bramson C, Nemeth MA, Smith MD, et al. Efficacy and safety of tanezumab in the chronic low back pain. *Pain*. 2011;152(10):2248-58.
- Hill R. Blocking the effects of NGF as a route to safe and effective pain relief—fact or fancy? *Pain*. 2011;152(10):2200-1. *Autor replay in Pain*. 2012;153:128-9.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal antigen gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005;438(7070):1017-21.
- Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D. The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain. *Physiol Res*. 2016. [Epub ahead of print].
- Balkowiec-Iskra E, Vermehren-Schmaedick A, Balkowiec A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases brain-derived neuropathic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience*. 2011;180:322-33.
- Adler JE, Nico L, VandeVord P, Skoff AM. Modulation of neuropathic pain by a glial-derived factor. *Pain Med*. 2009;10(7):1229-36.
- Guo J, Jia D, Jin B, Xu F, Yuan X, Shen H. Effects of glial cell line-derived neuropathic factor intrathecal injection on spinal dorsal horn glial fibrillary acidic protein expression in a rat model of neuropathic pain. *Int J Neurosci*. 2012;122(7):388-94.
- Maseda D, Johnson E, Crofford L. Production of inflammatory cytokines is regulated by mPGES-1-Dependent PGE2 in T cells. *Inflammatory Bowel Dis*. 2016;22:549-130.
- Oliveira Jr JO, Amorim Filho BD. The integrins and the painful phenomenon. *Rev Dor*. 2006;7(1):710-5.

46. Echeverry S, Shi XQ, Rivest S, Zhang J. Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *J Neurosci*. 2011;31(30):10819-28.
47. Wei XH, Zang Y, Wu CY, Xu JT, Xin WJ, Liu XG. Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. *Exp Neurol*. 2007;205(2):471-84.
48. Junger H, Sorkin LS. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain*. 2000;85(1-2):145-51.
49. Kawasaki Y, Zhang J, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of Interleukin-1beta, Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*. 2008;28(20):5189-94.
50. Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Brauer R, Gajda M, Richter F, et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1193:60-9.
51. Sommer C, Schaferns M, Marziniak M, Toyka KV. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2001;6(2):67-72.
52. Korhonen T, Karppinen J, Paimela L, Malmivaara A, Lindgren KA, Bowman C, et al. The treatment of disc-herniation-induced sciatica with infliximab: one-year follow-up results of FIRST II, a randomized controlled trial. *Spine*. 2006;31(24):2759-66.
53. Whitehead KJ, Smith CG, Delaney SA, Curnow SJ, Salmon M, Hughes JP, et al. Dynamic regulation of spinal pro-inflammatory cytokine release in rat in vivo following peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun*. 2010;24(4):569-76.
54. Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci*. 2011;31(35):12533-42.
55. Murphy PG, Ramer MS, Borthwick L, Gaudie J, Richardson PM, Bisby MA. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci*. 1999;11(7):2243-53.
56. Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Kondo T, Ozaki M, Kishioka S. The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;592(1-3):87-92.
57. Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2010;30(16):5754-66.
58. Ohtori S, Miyagi M, Eguchi Y, Inoue G, Orita S, Ochiai N, et al. Efficacy of epidural administration of anti-interleukin-6 receptor antibody onto spinal nerve for treatment of sciatica. *Eur Spine J*. 2012;21(10):2079-84.
59. Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. IFN-gamma receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(19):8032-7.
60. Racz I, Nadal X, Alferink J, Baños JE, Rehnelt J, Martín M, et al. Interferon-gamma is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain. *J Neurosci*. 2008;28(46):12136-45.
61. Gómez-Nicola D, Valle-Argos B, Suardiaz M, Taylor JS, Nietro-Sampedro M. Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. *J Neurochem*. 2008;107(6):1741-52.
62. Kleinschnitz C, Hofstetter HH, Meuth SG, Braeuninger S, Sommer C, Stoll G. T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. *Exp Neurol*. 2006;200(2):480-5.
63. Kim CF, Moalem-Taylor G. Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice. *J Pain*. 2011;12(3):370-83.
64. Miyoshi K, Obata K, Kondo T, Okamura H, Noguchi K. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J Neurosci*. 2008;28(48):12775-87.
65. Shibata K, Sugawara T, Fujishita K, Shinozaki Y, Matsukawa T, Suzuki T, et al. The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. *PLoS One*. 2011;6(8):e23510.
66. Loram LC, Harrison JA, Sloane EM, Hutchinson MR, Sholar P, Taylor FR, et al. Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain. *J Neurosci*. 2009;29(44):14015-25.
67. Wilkerson JL, Gentry KR, Dengler EC, Wallace JA, Kerwin AA, Armijo LM, et al. Intrathecal cannabidiol CB(2)R agonist, AM1710, controls pathological pain and restores basal cytokine levels. *Pain*. 2012;153(5):1091-106.
68. Üçeyler N, Topuzoglu T, Schiesser P, Hahnenkamp S, Sommer C. IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. *PLoS One*. 2011;6(12):e28205.
69. Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain*. 2006;2:6.
70. Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. Transforming growth factor-beta 1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain*. 2009;5:16.
71. Tramullas M, Lantero A, Díaz A, Morchón N, Merino D, Villar A, et al. BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. *J Neurosci*. 2010;30(4):1502-11.
72. Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther*. 2010;126(1):56-68.
73. White FA, Sun J, Waters SM, Ma C, Ren D, Ripsch M, et al. Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(39):14092-7.
74. Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res*. 2004;48(4):463-9.
75. Gao YJ, Zhang L, Samad OA, Suter MR, Yasuhiko K, Xu ZZ, et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci*. 2009;29(13):4096-108.
76. Thacker MA, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LD, et al. CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur J Pain*. 2009;13(3):263-72.
77. Abbadie C, Lindia JA, Cumiskey AM, Peterson LB, Mudgett JS, Bayne EK, et al. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(13):7947-52.
78. Old EA, Nicol LS, Malcangio M. Recent advances in neuroimmune interactions in neuropathic pain: the role of microglia. *An Introduction to Pain and its relation to Nervous System Disorders*. 2016;123T. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118455968.ch4/summary>
79. Thakur M, McMahon SB. Symptoms and pathology in neuropathic pain. An introduction to pain and its relation to nervous system disorders, 2016:89-121. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118455968.ch3/summary>
80. Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci*. 2004;20(5):1150-60.
81. Lindia JA, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain*. 2005;6(7):434-8.
82. Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenapp J, O'Connor KA, et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci*. 2004;20(9):2294-302.
83. Staniland AA, Clark AK, Wodarski R, Sasso O, Maione F, D'Acquisto F, et al. Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J Neurochem*. 2010;114(4):1143-57.